



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

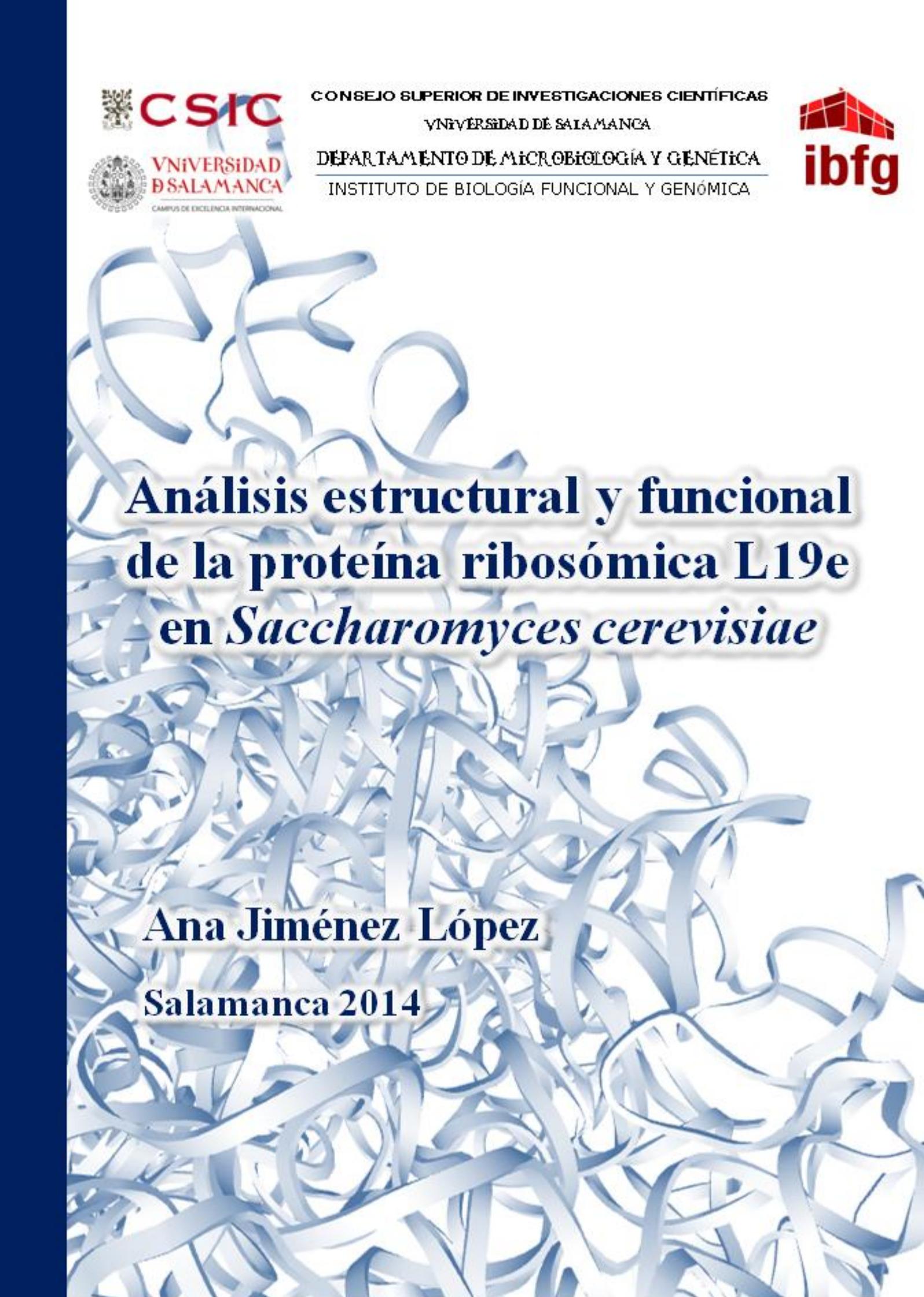


ibfg



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA



Análisis estructural y funcional de la proteína ribosómica L19e en *Saccharomyces cerevisiae*

Ana Jiménez López

Salamanca 2014



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

“Análisis estructural y funcional de la proteína ribosómica L19e”

**Memoria presentada por Ana Jiménez López
para optar al grado de Doctora en Farmacia**

Salamanca, 2014

DRA. MERCEDES TAMAME GONZÁLEZ, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

CERTIFICA:

Que ha dirigido el trabajo titulado “**Análisis funcional y estructural de la proteína ribosómica L19e**” realizado por la licenciada **Ana Jiménez López**, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) para optar al grado de **Doctora en Farmacia**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo.: Dra. Mercedes Tamame González
Directora de la Tesis

DR. FERNANDO LEAL SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA:

Que ha sido tutor del trabajo titulado “**Análisis funcional y estructural de la proteína ribosómica L19e**” realizado por la licenciada **Ana Jiménez López**, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), para optar al grado de **Doctora en Farmacia**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo.: Dr. Fernando Leal Sánchez
Tutor de la Tesis

DR. LUIS ROMÁN FERNÁNDEZ LAGO, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Análisis funcional y estructural de la proteína ribosómica L19e**”,
presentada por la Licenciada **Ana Jiménez López** para optar al grado de **Doctora en Farmacia**,
ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Mercedes Tamame González, en el Instituto de
Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca
(Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente
certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo.: Dr. Luis Román Fernández Lago
Director del Departamento de Microbiología y Genética

A mi familia

“Lo importante es no dejar de hacer preguntas; la curiosidad tiene su propia razón de existir”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS



Son muchas las personas a las que las quiero agradecer tanto la ayuda como el cariño que me han prestado para conseguir llegar hasta este punto del camino.

A la Dra. Mercedes Tamame, por haberme admitido en su laboratorio e introducirme al trabajo científico, así como por su dedicación a la dirección de esta Tesis y sus valiosas enseñanzas y consejos.

Al Dr. Fernando Leal como tutor, por su disposición y su buen humor en todo momento.

Al Dr. Rafael Giraldo del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, por su inestimable contribución a la interpretación de datos en la estructura del ribosoma, por su atención y su tiempo.

Al Dr. Jesús de la Cruz, del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla, por haberme permitido hacer una pequeña estancia en su laboratorio, así como a los demás miembros del mismo, especialmente a Juanjo y Reyes, por su acogida y por la ayuda que me prestaron.

A los Doctores John Woolford, Jelena Jakovljevic y Michael Gamalinda, del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad *Carnegie Mellon* de Pittsburgh, por su asesoramiento para investigar el ensamblaje de ribosomas y por la colaboración mantenida durante este tiempo.

Al Dr. Diosinio Martín-Zanca, del IBFG, por sus sugerencias para la obtención de genotecas mutantes y por sus valiosas recomendaciones.

A mis compañeros del IBFG, ya amigos, del Lab. P.1.12. A Pilar Martín-Marcos, por su colaboración en la interpretación de los defectos traduccionales y por sus buenas ideas y consejos. A Álvaro, con quien he compartido tema de trabajo y discusiones científicas, por su ayuda en algunas tareas experimentales. Y a Rosana y a Julia, por todos los momentos que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. A todos ellos, gracias por sus consejos, su ayuda y por todas las charlas del día a día. En este punto también incluyo al grupo de café de los *Ramones*, especialmente a Laura, Sergio R., Héctor, Sergio A. y David. A ellos también gracias por su amistad. Y a Sofía, Rebeca, Raúl, Maruán y Sonia, que con su buena compañía han hecho que los días de biblioteca fuesen más amenos.

A todos los demás compañeros del IBFG, a los científicos, tanto doctores como no doctores, y a todo el personal administrativo y técnico, quienes se han volcado para echarme una mano a la hora de resolver diferentes problemas cuando lo he necesitado. Todos ellos han contribuido de una forma u otra al desarrollo de esta Tesis.

A los *Amigüitos*, a mi piñita y a mis farmacéuticas, que tan buenos ratos me han hecho pasar a lo largo de estos años, que espero que sean muchísimos más, por haber estado siempre ahí y ofrecerme tanto sus ánimos como su alegría.

A mi familia, y más especialmente a mis padres y hermanos, por todo su cariño, su apoyo incondicional y la confianza que han depositado en mí siempre.

A Carlos, mi gran apoyo, por animarme y estar siempre a mi lado durante todos estos años.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. El ribosoma	2
1.1. Características de los ARN ribosómicos de <i>S. cerevisiae</i>	6
1.2. Características de las proteínas ribosómicas de <i>S. cerevisiae</i>	7
2. La proteína ribosómica L19e	10
2.1. Genes que codifican L19e en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.2. Estructura de L19e en <i>S. cerevisiae</i>	15
2.3. Localización de L19e en el ribosoma eucariótico	15
2.4. Proteínas ortólogas de L19e	20
2.5. Interacciones físicas y genéticas de L19e	22
2.6. Funciones extra-ribosómicas de L19e	23
a. L19e y ciclo celular	24
b. L19e y enfermedades humanas	25
3. Biogénesis de ribosomas	26
3.1. Factores de ensamblaje que participan en la biogénesis de ribosomas	27
3.2. Procesamiento de los precursores del ARN ribosómico	28
3.3. Ensamblaje de subunidades ribosómicas	31
a. Pre-partículas 90S	31
b. Pre-partículas 43S	31
c. Pre-partículas 66S	32
3.4. Transporte núcleo-citoplasmático de subunidades pre-ribosómicas	35
3.5. Maduración final de las subunidades 60S y 40S en el citoplasma	36
3.6. Degradación de precursores aberrantes de los ARNr	39
3.7. Regulación de la biogénesis de ribosomas	39
4. Traducción	41
4.1. Inicio de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	41
a. Formación del complejo de pre-iniciación 43S	41
b. Unión al ARNm y <i>scanning</i>	42
c. Reconocimiento del AUG	42
d. Unión de la subunidad 60S	43
4.2. Elongación de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	44
4.3. Terminación de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	45
4.4. Regulación traduccional en <i>S. cerevisiae</i>	45
4.5. Regulación traduccional de <i>GCN4</i>	46

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO	52
OBJETIVOS	53
RESULTADOS	54
<u>CAPÍTULO I: GENERACIÓN DE MUTACIONES DE PÉRDIDA PARCIAL DE FUNCIÓN DE L19e</u>	54
a. Clonación de los genes parálogos <i>RPL19A</i> y <i>RPL19B</i> de <i>S. cerevisiae</i>	54
b. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> adecuadas para la selección de mutantes pLOF de L19e	57
1. Análisis del fenotipo de crecimiento de las cepas de levadura construidas	58
2. Análisis de los transcritos de diversos alelos <i>RPL19</i>	61
3. Mutagénesis aleatoria de <i>RPL19B_{Δi}</i>	63
4. Obtención de transformantes de levadura y selección de mutantes viables y letales	65
4.1. Obtención de transformantes de levadura de la Plasmoteca 1: [<i>rpl19b*_{Δi}</i> , <i>CEN6 URA3</i>]	65
4.2. Obtención de transformantes de levadura de las demás Plasmotecas: [<i>rpl19b*_{Δi}</i> , <i>CEN6 LEU2</i>]	65
5. Recuperación y caracterización de plásmidos portadores de alelos <i>rpl19b*_{Δi}</i> y del fenotipo <i>slg</i>	66
6. Mutagénesis dirigida de <i>RPL19B_{Δi}</i>	71
6.1. Sustituciones de aminoácidos en el dominio C-terminal de L19e	71
6.2. Sustituciones de aminoácidos en el dominio N-terminal de L19e	72
6.3. Obtención de nuevos alelos <i>rpl19b*_{Δi}</i>	73
7. Predicción de alteraciones en L19e y de en la estructura del ribosoma 80S	76
7.1. Alteraciones en la secuencia de aminoácidos de L19e	76
7.2. Alteraciones en las interacciones moleculares de la subunidad 60S y en el ribosoma 80S de <i>S. cerevisiae</i>	77
<u>CAPÍTULO II: ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MUTANTES <i>rpl19b</i></u>	80
1. Fenotipo de mutantes <i>rpl19b*_{Δi}</i>	81
1.1. Fenotipo de crecimiento	86
1.2. Fenotipo celular	87

2. Fenotipo de mutantes <i>pGAL::rpl19b*</i>_{<i>Δi</i>}	87
3. Cuantificación de transcritos <i>rpl19bΔCT</i>	92
4. Respuesta a estrés de mutantes <i>rpl19bΔCT</i>	96
5. Fenotipos de mutantes pseudo-haploinsuficientes de L19e	98
5.1. Fenotipo de crecimiento	98
5.2. Fenotipo celular	101
5.3. Cantidad de transcritos <i>RPL19A</i> y <i>RPL19B</i>	104
<u>CAPÍTULO III: BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS DE MUTANTES <i>rpl19</i></u>	106
1. Procesamiento de los precursores de los ARN ribosómicos en mutantes <i>rpl19</i>.....	106
1.1. Mutantes <i>rpl19bΔCT</i>	108
1.2. Mutantes <i>pGAL::rpl19bΔCT</i>	116
1.3. Reducción de dosis de L19e	117
1.4. Mutantes <i>Δrpl19a Δrpl19b</i>	121
2. Cuantificación de 25S y 18S en mutantes <i>rpl19</i>	124
3. Cuantificación de subunidades maduras 60S y 40S en mutantes <i>rpl19</i>	125
4. Ensamblaje de L19e en pre-ribosomas	127
4.1. Ensamblaje de pre-ribosomas en mutantes <i>rpl19bΔCT</i>	128
5. Transporte intracelular de subunidades 60S en mutantes <i>rpl19bΔCT</i>	131
<u>CAPÍTULO IV: DEFECTOS EN TRADUCCIÓN DE MUTANTES <i>rpl19</i></u>	134
1. Defectos traduccionales de mutantes <i>rpl19ΔCT</i>	134
1.1. Análisis defectos en el inicio de la traducción general de los ARNm	134
1.2. Defectos en elongación de la traducción general de los ARNm	139
2. Defectos traduccionales de mutantes con insuficiencia de L19e	142
2.1. Disminución progresiva de dosis de L19e	142
2.2. Pseudo-haploinsuficiencia de L19e	143
3. Defectos concretos en iniciación de la traducción de mutantes <i>rpl19bΔCT</i>	144
3.1. Unión de subunidades ribosómicas 60S a 40S	144
3.2. Defectos en la fidelidad de la traducción	147
a. Análisis de sensibilidad a antibióticos que afectan a la traducción	147
b. Análisis del mantenimiento del virus <i>Killer</i>	148

c. Reconocimiento del codón óptimo del inicio de la traducción	150
4. Traducción del ARNm GCN4 en mutantes <i>rpl19</i>	153
4.1. Análisis del carácter recesivo o dominante de las mutaciones <i>rpl19bΔCT</i>	155
4.2. Regulación traduccional del ARNm <i>GCN4</i> en mutantes <i>rpl19</i>	157
a. Análisis cualitativo del posible fenotipo Gcd ⁻ de mutantes <i>rpl19</i>	157
b. Análisis cualitativo del posible fenotipo Gcn ⁻ de mutantes <i>rpl19</i>	159
c. Análisis cuantitativo de la represión o desrepresión traduccional de <i>GCN4</i> en mutantes <i>rpl19</i>	160
4.3. Regulación traduccional del ARNm <i>GCN4</i> cuando se sobreexpresa L19e	167
DISCUSIÓN	168
1. Funciones de L19e en el ribosoma eucariótico	168
1.1. Estado del conocimiento	168
1.2. Interpretación de las consecuencias de las mutaciones <i>rpl19</i>	169
2. L19e y la biogénesis de ribosomas	174
2.1. L19e en el ensamblaje y transporte de los pre-ribosomas 66SB	181
3. L19e en el inicio de la traducción	183
3.1. L19e en la regulación traduccional del ARNm <i>GCN4</i>	186
CONCLUSIONES	189
MATERIALES Y MÉTODOS	190
1. Microorganismos utilizados	190
1.1. Levaduras	190
a. Obtención de cepas derivadas de H96 y Hm498 carentes de <i>RPL19A</i> o <i>RPL19B</i>	190
1.2. Bacterias	192
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de los microorganismos empleados	192
2.1. Para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	192
a. Medios ricos	192
b. Medios mínimos definidos	193
c. Medios sólidos	195
d. Suplementos y aditivos	195
e. Condiciones de crecimiento	196
2.2. Para <i>Escherichia coli</i>	196

a. Condiciones de crecimiento	197
3. Materiales y procedimientos generales de biología molecular	197
3.1. Vectores empleados	197
a. Vectores bacterianos	197
b. Vectores bifuncionales en bacteria y levadura o <i>shuttle vectors</i>	198
3.2. Plásmidos	198
a. Clonación de alelos de <i>RPL19</i> en plásmidos centroméricos	198
3.3. Técnicas de transformación de levaduras y de recuperación y purificación de plásmidos	202
a. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	202
b. Recuperación de plásmidos de transformantes de levadura	202
c. Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	202
3.4. Técnicas de manipulación del ADN	203
a. Reacciones enzimáticas	203
b. Análisis y purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	203
c. Amplificación de secuencias de ADN por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	204
d. Mutagénesis al azar	205
e. Mutagénesis dirigida	207
f. Secuenciación de ADN	207
g. Oligonucleótidos empleados en distintas reacciones de PCR y secuenciación del ADN	208
3.5. Técnicas de manipulación y análisis del ARN	209
a. Extracción de ARN total de células de <i>S. cerevisiae</i>	209
b. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	209
c. Electroforesis de ARN en geles capilares	210
d. Hibridación de ARN	210
e. Ensayos de <i>Primer Extension</i>	213
f. Fraccionamiento y obtención de perfiles de polisomas	214
3.6. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas	215
a. Obtención de extractos proteicos	215
b. Precipitación con TAP	216
c. Determinación de la cantidad de proteína	216
d. Electroforesis de proteínas	216
e. Tinción de proteínas con nitrato de plata	217
f. Electrotransferencia de proteínas	217
g. Inmunodetección de proteínas (western-blot)	218
h. Medida de la actividad b-galactosidásica de proteínas de fusión reporteras (<i>GCN4::LacZ</i> o <i>HIS4::LacZ</i>)	219
3.7. Técnicas de tinción y microscopía de levaduras	219
a. Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (DIC).....	219
b. Microscopía de fluorescencia	219
3.8. Análisis bioinformáticos	221

ABREVIATURAS	222
ANEXOS	225
Tabla I. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas y generadas en este trabajo	225
Tabla II. Plásmidos utilizados, descripción y procedencia	229
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para clonación, amplificación y secuenciación ...	232
Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de northern-blot y su secuencia correspondiente	234
Tabla V. Factores de ensamblaje que participan en el procesamiento y maduración de las subunidades ribosómicas 40S y 60S en <i>S. cerevisiae</i>	235
Tabla VI. Reguladores positivos y negativos de la traducción de <i>GCN4</i>	239
BIBLIOGRAFÍA	240

RESUMEN



En este trabajo se han investigado en *Saccharomyces cerevisiae* las funciones primarias de L19e, una proteína esencial componente de la subunidad 60S del ribosoma eucariótico. L19e no existe en el ribosoma bacteriano, aparece evolutivamente en arqueobacterias (L19a) y tiene un dominio adicional cuya longitud varía en diferentes organismos eucariotas. Las características estructurales y la localización de L19e en las estructuras de alta resolución atómica de las subunidades 60S y de los ribosomas de la levadura, protozoos y mamíferos, sugieren podría desempeñar nuevas funciones reguladoras en la biogénesis de los ribosomas y en la traducción.

Para investigar las funciones primarias de L19e se han obtenido mutantes de pérdida parcial de función en *S. cerevisiae* y se han analizado sus fenotipos. Los resultados revelan que algunos determinantes estructurales de L19e se requieren para sus funciones en el procesamiento correcto de los ARN ribosómicos, en el ensamblaje de la subunidad 60S, la traducción global de los ARN mensajeros y la regulación traduccional del ARNm *GCN4*. Utilizando herramientas bioinformáticas se pueden predecir en la estructura del ribosoma de la levadura las alteraciones que causan algunas de las mutaciones en la secuencia o estructura de L19e y las interacciones moleculares que resultan modificadas.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de los Proyectos de Investigación TRACE 2008-0283-0, CSI007A10-2 e INNPACTO IPT-2012-060000, cuyo Investigador Principal es la Dra. Mercedes Tamame González. La Licenciada Ana Jiménez López agradece la financiación recibida a través de un Contrato Predoctoral del Programa de Ayudas para la Contratación del Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (2009/2013), co-financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, y a un contrato asociado al Proyecto INNPACTO IPT-2012-060000 (2013-2014).

INTRODUCCIÓN



1. EL RIBOSOMA

Los ribosomas son orgánulos celulares que constituyen el núcleo principal de la maquinaria traduccional en todos los reinos de la vida. Los ribosomas maduros están formados por ARN ribosómico (ARNr) y proteínas ribosómicas (RP), y realizan dos funciones fundamentales: la descodificación del mensaje genético y la síntesis de proteínas. Un número cada vez mayor de evidencias experimentales indica que los ribosomas 80S desempeñan en eucariotas un importante papel en la regulación de la traducción. En la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* se ha estimado que, en condiciones de crecimiento en medio rico, existen 200.000 ribosomas por célula, que se sintetizan ~2000 ribosomas por minuto y que ocupan el 30-40% del volumen citoplasmático (Warner, 1999).

Los ribosomas están constituidos por dos subunidades, la subunidad mayor LSU (del inglés *large* o **L**) y la menor SSU (*small* o **S**), que en procariotas tienen coeficientes de sedimentación de **50S** y **30S** respectivamente, siendo **70S** el del ribosoma maduro al unirse las subunidades en el codón de inicio de la traducción; y en eucariotas, 60S (el de la LSU) y 40S (el de la SSU), siendo **80S** el ribosoma maduro (**Figura 1**):

- La subunidad LSU o **60S** está constituida por tres ARN ribosómicos (en adelante, ARNr), y en *S. cerevisiae* está compuesta por las moléculas de ARNr 25S (3.396 nucleótidos), 5,8S (158 nucleótidos) y 5S (121 nucleótidos), y por 46 proteínas ribosómicas (RPL). En la subunidad 60S reside la actividad peptidil-transferasa que cataliza la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos.

- La subunidad SSU o **40S** de *S. cerevisiae* se compone del ARNr 18S (1.798 nucleótidos) y 33 proteínas ribosómicas (RPS). Esta subunidad, en la que reside la función descodificadora del mensaje genético, se une a varios factores de inicio de la traducción eucarióticos (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5) formando complejos de pre-iniciación 43S (PIC) junto con el complejo ternario (CT), compuesto por eIF2, GTP y el ARN transferente iniciador-metionina (ARN_t^{Met}). Los PIC 43S reconocen los codones de iniciación de los ARN mensajeros (ARNm), formándose el PIC 48S.

Además, en los ribosomas maduros existen tres “sitios” que abarcan regiones de las dos subunidades y que interaccionan con los ARN de transferencia (ARNt) (**Figura 1**): el **sitio A**, o aceptor, es el que ocupan las moléculas de ARNt de elongación, portadoras del aminoácido entrante (aminoacil-ARNt); el **sitio P**, o donador, es el que ocupa el ARNt iniciador metionina y, posteriormente, el péptido en formación (peptidil-ARNt); y el **sitio E**, es el de salida (*exit*) de los ARNt una vez descargado del aminoácido correspondiente.

Recientemente se ha resuelto la **estructura** con alta resolución atómica (3,0 Å) por difracción de rayos X de cristales puros de ribosomas 80S de la levadura *S. cerevisiae* en dos estados inactivos (Ben-Shem *et al.*, 2011). Este hito se ha logrado deteniendo la iniciación de la traducción en la levadura, mediante la privación breve de glucosa, y así se ha logrado obtener cristales uniformes de alta calidad para realizar difracción de rayos X. Las estructuras del ribosoma eucariótico y sus subunidades, de la levadura y de otros organismos, aportan gran cantidad de información sobre numerosas interacciones moleculares a nivel de átomos de los aminoácidos y de las bases de los ARNr.

Se ha resuelto la estructura de la subunidad 60S del protozoo *Tetrahymena thermophila* (a 3,5 Å) en complejo con el factor de antiasociación de subunidades eIF6 (Klinge *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2012), y la de la subunidad 40S inactiva en complejo con eIF1 y eIF1A (a 3,7-3,9 Å) (Rabl *et al.*, 2011; Weisser *et al.*, 2013). Además, mediante técnicas de crio-microscopía electrónica (*cryo-EM*) se han obtenidos datos complementarios muy útiles sobre estructuras de las subunidades ribosómicas de la arqueobacteria *Haloarcula marismortui* (a 2,4 Å) (Klein *et al.*, 2004), del ribosoma del perro (*Canis lupus familiaris*) (a 8,7 Å) (Chandramouli *et al.*, 2008), del ribosoma del cerdo (*Sus scrofa domestica*) (a 3,4 Å) (Voorhees *et al.*, 2014), y de la subunidad 40S activa de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (a 7,9 - 9 Å), en este caso, unida a factores de iniciación que forman tres complejos funcionales de pre-iniciación de la traducción (PIC1, 2 y 3) (Lomakin and Steitz, 2013). También se ha obtenido la estructura del ribosoma 80S humano (*Homo sapiens*) con una resolución de 4,8-9 Å (Anger *et al.*, 2013). Estos trabajos aportan gran cantidad de información sobre la localización y las interacciones atómicas que se establecen entre los diferentes componentes del ribosoma eucariótico, constituyendo la base estructural para poder interpretar el significado funcional o papel biológico que desempeñan los nuevos elementos que lo forman. Las nuevas funciones se podrían investigar en organismos en los que se pueda realizar un análisis mutacional, ya que se podrán correlacionar los fenotipos de los mutantes con las alteraciones intra e intermoleculares que se interrumpen como consecuencia de las respectivas mutaciones.

La estructura secundaria del ARNr **18S** está bien conservada filogenéticamente en los eucariotas, y consta de 4 dominios estructurales: 5', central, 3' mayor y 3' menor. Estos dominios se pliegan en estructuras terciarias, que junto con las proteínas ribosómicas (RP), forman el cuerpo, hombros, plataforma, cabeza y pico de la subunidad 40S (Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012). Los ARNr **5,8S** y **25S** componentes de la subunidad 60S forman 6 dominios conservados en la predicción de la estructura secundaria (I-VI), que al plegarse en estructuras terciarias, junto con el ARNr **5S** en la subunidad madura, forman la protuberancia central, el tallo ácido (tallo P) y el tallo L1 (Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012; Woolford and Baserga, 2013) (**Figura 1**). Se ha propuesto recientemente que, en *S. cerevisiae*,

los dominios estructurales de la subunidad 60S se formarían y plegarían de forma jerárquica con la ayuda de las proteínas ribosómicas que se van incorporando e interaccionando con los ARNr, comenzando por la región que se orienta hacia el lado del solvente (cara externa), seguida por la formación del túnel de salida del polipéptido, la zona de contacto entre subunidades y, finalmente, la protuberancia central (Gamalinda *et al.*, 2014).

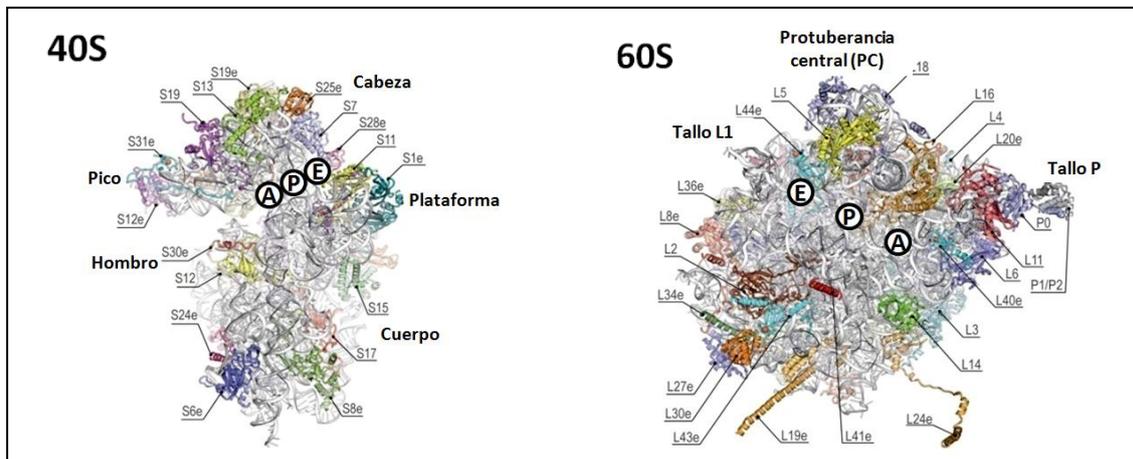


Figura 1. Estructura de las subunidades 40S y 60S del ribosoma de *S. cerevisiae* a una resolución de 3 Å, vistas desde la zona de contacto entre subunidades. Se indica la posición de las proteínas de 40S (S) y de las de 60S (L). Con un círculo blanco se indican los sitios que ocupan los ARNt_e de elongación (A), de iniciación ARNt_e^{Met} (P) y de salida de cada ARNt descargado del aminoácido (E) (Modificado de Ben-Shem *et al.*, 2011).

Durante la evolución, la complejidad del ribosoma eucariótico ha ido incrementando respecto a su homólogo procarionta en 1,0 MDa con nuevos elementos eucarióticos. El ribosoma 70S de la bacteria *Thermus thermophilus* tiene 2,3 MDa, el 80S de *S. cerevisiae* 3,3 MDa, y el ribosoma humano 4,3 MDa (Melnikov *et al.*, 2012). En el ribosoma de levadura 350 KDa corresponden a segmentos de expansión adicionales del ARNr (*eucaryotic expansion segments, eES*), 800 KDa a nuevas RP, y 200 KDa a extensiones carboxilo- o amino- terminales añadidas a muchas RP ya existentes en el ribosoma bacteriano o de arqueobacterias. Algunos de estos nuevos elementos extra del ribosoma eucariota forman nuevos puentes eucarióticos entre las subunidades 60S y 40S (*eukaryotic bridges, eB*) (Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012). El incremento de la complejidad estructural del ribosoma 80S respecto al bacteriano 70S refleja su mayor complejidad funcional, muy probablemente relacionada con la mayor complejidad de la traducción eucariótica y su regulación.

Las estructuras de alta resolución atómica del ribosoma revelan un núcleo de ARNr localizado en cada subunidad, con la mayoría de las RP nuevas, exclusivamente eucariotas (e) localizadas sobre la superficie de ambas subunidades (Melnikov *et al.*, 2012). Sin embargo, la

disposición de los nuevos segmentos de expansión eucarióticos de los ARNr (eES) y la adquisición de nuevas proteínas ribosómicas, o de extensiones añadidas a RPs ya existentes en el ribosoma bacteriano, aparecen localizadas de manera diferente en cada subunidad. Así, en la subunidad **40S** la mayoría de los eES se ubican en la base, mientras que las proteínas S aparecen dispersas, cubriendo uniformemente toda la superficie externa de la partícula (**Figura 2**). Por el contrario, en la subunidad **60S** los nuevos eES y las proteínas L o las extensiones carboxi-terminales añadidas a las de arqueobacterias, tienen una distribución similar, formando un anillo concéntrico localizado en la superficie de la subunidad 60S (**Figura 2**). Este hecho indica una co-evolución en la expansión de los ARNr y la adquisición de nuevas proteínas o la aparición de extensiones adicionales carboxiterminales, lo que sugiere que esta subunidad puede haber adquirido nuevas competencias que desempeñan conjuntamente esos elementos dotando de nuevas funciones al ribosoma eucariótico. Se ha propuesto que entre esas funciones estaría la transmisión de señales alostéricas desde el citoplasma al núcleo del ribosoma que provocarían cambios para determinar una regulación diferencial de la traducción en diferentes situaciones fisiológicas o patológicas en función de las condiciones nutricionales o ambientales (Ben-Shem *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012).

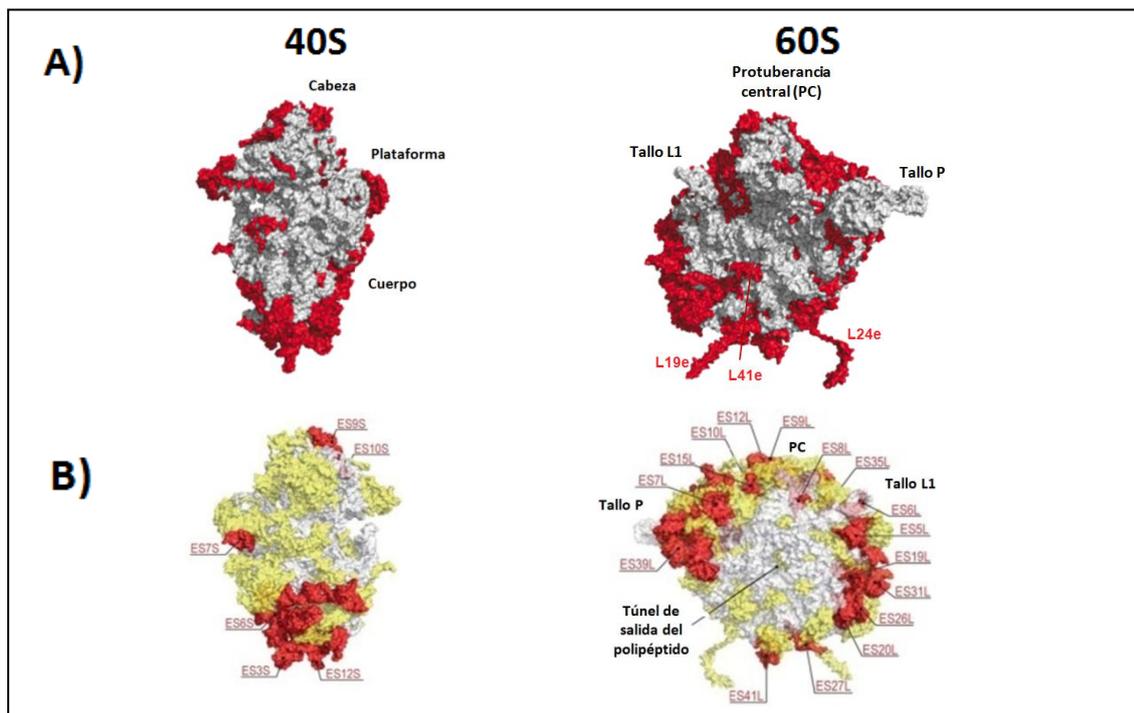


Figura 2. Representación de la estructura de las subunidades 40S y 60S del ribosoma eucariótico. A) Vista desde la superficie de contacto entre ambas subunidades. Se representan en gris las RP y el ARNr conservados en todos los organismos. Se indica la localización de las proteínas L19e, L24e y L41e de 60S, que están implicadas en la formación de puentes entre las subunidades. B) Vista de la cara externa de las subunidades, o del solvente. Se indica la posición de los nuevos eES de los ARNr, representados en rojo. En amarillo, se representan las nuevas RP eucariotas y su localización (Adaptado de Ben-Shem *et al.*, 2011).

En la actualidad, se desconoce la funcionalidad en la biogénesis de las subunidades ribosómicas y en la traducción de los ARNm de la mayor parte de los nuevos elementos del ribosoma eucariótico. Sin embargo, existen resultados experimentales en diferentes sistemas biológicos que sugieren que estos elementos aportan nuevas funciones al ribosoma 80S, y participarían en la interacción con factores solubles para modular la traducción (Melnikov *et al.*, 2012).

1.1. Características de los ARN ribosómicos de *S. cerevisiae*

Los ARNr están codificados en 150-200 unidades de transcripción de ADNr en el Cromosoma XII de *S. cerevisiae* (Petes and Botstein, 1977) (**Figura 3**). Estas unidades, de ~ 9,1 Kbp, representan un 10% del genoma de esta levadura. El ARNr constituye el 80% del ARN total celular (siendo el 15% ARNt y un 5% ARNm). La transcripción del ADNr se produce cíclicamente cada 1,6 segundos, produciendo ~190 moléculas de ARNr (formación de los “árboles de Miller”) (Miller and Beatty, 1969). De las 150-200 unidades de transcripción, sólo la mitad de ellas se transcriben activamente, mientras que la otra mitad se mantiene en un estado inactivo (Toussaint *et al.*, 2005). Estas copias “extra” mantendrían la integridad genética del ADNr al favorecer su reparación por recombinación homóloga (Ide *et al.*, 2010).

Los ARNr **18S**, **5,8S** y **25S** son transcritos por la ARN-polimerasa I (ARN-Pol I) en el nucléolo como un precursor **35S** (6,6 Kbp), que se procesa secuencialmente dando lugar a los ARNr maduros de las subunidades 40S y 60S. En una célula de levadura se sintetizan ~ 2000 ribosomas por minuto, por lo que la ARN-Pol I mantiene una velocidad de extensión de 40-60 nt/s, llevando a cabo un 60% de la transcripción total, siendo la más activa de las 3 ARN-polimerasas eucariotas (Warner, 1999; French *et al.*, 2003; Kos and Tollervey, 2010). Sin embargo, el ARNr **5S** es transcrito por la ARN-polimerasa III (ARN-Pol III) en el núcleo de manera independiente y se incorpora a la subunidad 60S durante su biogénesis (Zhang *et al.*, 2007).

Los ARNr maduros 18S – 5,8S – 25S están codificados en el precursor 35S, separados por secuencias de ARN que se transcriben pero no forman parte de los transcritos maduros, sino que se eliminan por procesamiento endo y exonucleolítico, el **ITS1** y el **ITS2** (*Internal transcribed spacer*). Además, existen dos regiones externas en los extremos de cada transcrito precursor 35S denominadas **5'-ETS** y **3'-ETS** (*External transcribed spacer*) y también son eliminadas por procesamiento endo y exonucleolítico. Se ha descrito que estas secuencias espaciadoras podrían evitar un mal plegamiento o un plegamiento prematuro del pre-ARNr tras su síntesis y quizá durante su procesamiento (van Nues *et al.*, 1995; Lamanna and Karbstein, 2011).

Adicionalmente, en los extremos 5' y 3' del ARNr 5S – codificado también en cada unidad de transcripción de ADNr y adyacente a las secuencias que codifican el ARNr 35S – existen otras dos secuencias que no se transcriben, **NTS1** y **NTS2** (*Non transcribed spacer*) (**Figura 3**).

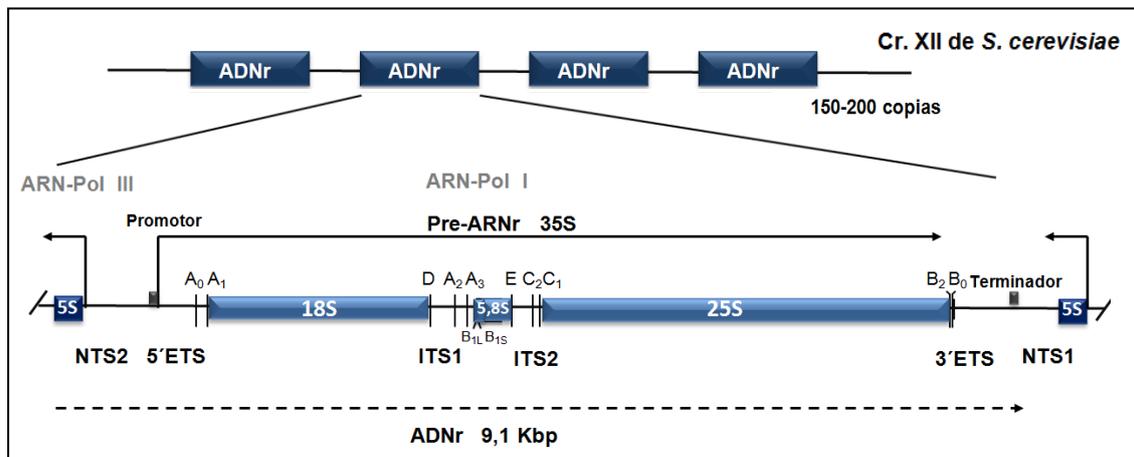


Figura 3. Organización de los loci del ADNr en *S. cerevisiae*.

1.2. Características de las proteínas ribosómicas de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* existen **79 RP** codificadas por **138 genes** (*Ribosomal Protein Genes*, **RPG**) que se transcriben muy activamente y a los que se dedica el 50% de la actividad que realiza la ARN-Polimerasa II (**ARN-Pol II**). Aproximadamente 1/3 de los ARNm codifican las RP, los cuales tienen una vida media corta (menos de 10 min) (Wang *et al.*, 2002). Tanto la transcripción como la traducción de los ARNm y de las RP está regulada de manera coordinada, de modo que todas ellas se sintetizan en cantidades estequiométricas, ya que se ensambla una proteína de cada por ribosoma maduro (Pearson *et al.*, 1982).

Los 138 genes **RPG** constituyen el 2% del genoma de *S. cerevisiae* y contienen 102 **intrones** de unos 400 nt. Tanto por su abundancia como por su riqueza en intrones, los ARNm de las RP consumen un 90% del proceso de escisión de intrones o “*splicing*” en esta levadura (Warner, 1999), ya que solamente 280 de sus 6.600 genes contienen intrones.

En *S. cerevisiae*, 59 de las 79 RP están codificadas por dos **genes parálogos** como consecuencia posiblemente de una antigua duplicación del genoma (Simoff *et al.*, 2009). En algunos casos, estas RP parálogas son idénticas y en otros casos (38 RP) difieren en 1-5 aminoácidos. Se admite que sus funciones no han divergido evolutivamente lo suficiente en esta levadura, por lo que los dos genes parálogos codifican proteínas con funciones primarias formando parte del ribosoma. En otros casos, las duplicaciones génicas terminan generando genes con funciones separadas y diferentes. El 80% de los RPG parálogos poseen intrones

diferentes en secuencia, que van a desempeñar un papel en la regulación intergénica e intragénica de la expresión de los diferentes parálogos bajo diferentes condiciones fisiológicas (Bergkessel *et al.*, 2011; Parenteau *et al.*, 2011; Garre *et al.*, 2013). Todo esto sugiere la posibilidad de que pueda existir una “funcionalidad específica de cada paróloga”, lo que ha dado lugar a que se proponga la existencia de un “**Código Ribosómico**” (Komili *et al.*, 2007). Además, la existencia de distintas poblaciones de **ribosomas heterogéneos** sugiere que podrían especializarse en la traducción de distintos transcritos de ARNm, en función de las necesidades celulares y en determinadas condiciones (García-Marcos *et al.*, 2008; Gilbert, 2011; Xue and Barna, 2012; Bauer *et al.*, 2013). El estudio sistemático de mutantes de delección simple de estos genes de *S. cerevisiae* ha puesto de manifiesto que, aunque en muchos casos ambos parálogos comparten algunos fenotipos, pero no siempre son funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, se han observado defectos específicos de parálogo en la localización del ARNm de *ASH1* en la célula hija emergente (Komili *et al.*, 2007), diferencias en el tamaño celular y en la selección del sitio de gemación (Ni and Snyder, 2001), en la organización de la actina (Haarer *et al.*, 2007), en la esporulación (Enyenihi and Saunders, 2003), la susceptibilidad a virus (Carroll and Wickner, 1995; Ohtake and Wickner, 1995) y diferente sensibilidad a drogas (Komili *et al.*, 2007; Parenteau *et al.*, 2011). Adicionalmente, la heterogeneidad de los ribosomas se debe también al hecho de que las RP son el sustrato de numerosas **modificaciones post-traduccionales** diferenciales, incluyendo la fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación (Kruiswijk *et al.*, 1978; Kruiswijk *et al.*, 1978; Chow *et al.*, 2007).

Las proteínas ribosómicas son pequeñas y básicas y tienen capacidad para interactuar con los ARNr cargados negativamente (con la excepción de las proteínas ácidas P1 α , P1 β , P2 α , P2 β , que forman parte del tallo ribosómico) (Spahn *et al.*, 2001; Cárdenas *et al.*, 2012). En cuanto a su **estructura**, muchas RP constan de un dominio globular que suele localizarse hacia el exterior del ribosoma; de él parten una serie de proyecciones que se introducen entre los ARNr, ayudando a estabilizar y mantener la estructura terciaria de los mismos, además de interactuar con factores de ensamblaje o traducción, dependiendo de cada caso (Spahn *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2009; Armache *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011; Rabl *et al.*, 2011). Por lo tanto, muchas de las RP **esenciales** (64 de las 79) se requieren para el plegamiento y empaquetamiento de los ARNr, y proporcionan finalmente una estructura y soporte adecuado para la síntesis de proteínas (Steffen *et al.*, 2012). Sin embargo, las RP dispensables para la viabilidad celular, al menos en condiciones de laboratorio, también pueden desempeñar funciones adicionales en dichos procesos (DeLabre *et al.*, 2002; Peisker *et al.*, 2008). Todas las RP son consideradas **factores de la biogénesis de ribosomas** (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Ferreira-Cerca *et al.*, 2007; Poll *et al.*, 2009). Así, L7, L8, L17, L33, L35, L37, L40 facilitan el correcto ensamblaje de los pre-ribosomas (Martín-Marcos *et al.*, 2007; Babiano and

de la Cruz, 2010; Fernandez-Pevida *et al.*, 2012; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013; Ohmayer *et al.*, 2013); otras, como L10, facilitan el transporte de los pre-ribosomas del nucléolo al núcleo, y del núcleo al citoplasma (Bassler *et al.*, 2001; Gadal *et al.*, 2001; Tschochner and Hurt, 2003), o protegen las subunidades maduras 60S y 40S de la degradación (Poll *et al.*, 2009).

Tanto las RP esenciales como las dispensables pueden desempeñar funciones esenciales o específicas en el proceso de **traducción** formando parte del ribosoma maduro. Se ha descrito que algunas RPL se requieren para mantener la fidelidad de la traducción, como L5, L11 y L39 (Dresios *et al.*, 2000; Meskauskas and Dinman, 2001; Rhodin *et al.*, 2011); mutaciones que afectan a algunas RP, como es el caso de L41, causan defectos en la actividad peptidil-transferasa de 60S (Dresios *et al.*, 2003). Otras, como L10, participan en el movimiento de rotación de la subunidad 60S sobre la 40S durante la traducción (Sulima *et al.*, 2014). Y otras muchas RP, como L2, L5, L10, L11, L14, L29 y L37, facilitan la unión de las dos subunidades ribosómicas 60S y 40S a través de interacciones directas con el ARNr 18S, con otras RPSs de la subunidad 40S o con factores de traducción, como es el caso de L11 (Eisinger *et al.*, 1997; Spahn *et al.*, 2001; DeLabre *et al.*, 2002; Ben-Shem *et al.*, 2011; Rhodin *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012). Por lo tanto, es predecible que alteraciones de la integridad de determinadas RP o de su cantidad causadas por mutaciones en los correspondientes genes RPG pueden afectar a la biogénesis de las subunidades ribosómicas de forma más o menos grave y también influir en los patrones de síntesis de proteínas globales o particulares.

Se ha descrito que algunas de las RP desempeñan **funciones adicionales extra-ribosómicas** tanto en organismos pluricelulares como en levaduras (Warner and McIntosh, 2009; Xue and Barna, 2012). Las RP participan en procesos tales como la regulación de su propia expresión, como L2, L7, L9, L30, L32, S13 y S14 (Dabeva and Warner, 1993; Malygin *et al.*, 2007; Gudipati *et al.*, 2012; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013); la respuesta a estrés, como L44 (Liu *et al.*, 2014); el desarrollo celular, como L19 o L38 (Hart *et al.*, 1993; Kondrashov *et al.*, 2011); la apoptosis, la reparación del ADN o la transcripción, como P0, S3 y S20 (Wool, 1996; Lindstrom, 2009; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013).

Cabe destacar que mutaciones, una disminución o la sobreexpresión de algunas RP está asociada también con **enfermedades humanas**, especialmente de médula ósea, lo que se engloba bajo el término de **ribosomopatías**. Entre ellas se encuentra la anemia *Diamond-Blackfan (DBA)*, una enfermedad congénita rara que produce aplasia de células rojas. Más del 50-60% de los casos de DBA se producen por mutaciones en genes RPG (Ball, 2011; Gazda *et al.*, 2012; Horos and von Lindern, 2012; Aspesi *et al.*, 2014). Otra enfermedad asociada con defectos en biogénesis de ribosomas es el síndrome de *Shwachman-Diamond (SDS)*, una

enfermedad genética rara que produce también alteraciones de la médula ósea (Burroughs *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010). Además, un aumento o una disminución en la cantidad de algunas RP está relacionada con la aparición o propensión a varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de próstata, de colon, gastrointestinal o de ovario (Shuda *et al.*, 2000; Kondoh *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Kuroda *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013).

2. LA PROTEÍNA RIBOSÓMICA L19e

L19 es una proteína ribosómica de la subunidad mayor del ribosoma, tanto de la subunidad 50S de arqueobacterias, L19a, como de la 60S de eucariotas, L19e, aunque no existen homólogos funcionales (ortólogos) en el ribosoma bacteriano. L19e es **esencial** en *S. cerevisiae* (Song *et al.*, 1996) y está conservada en todos los eucariotas, aunque con diferencias su extremo C-terminal. Existen estudios sistemáticos recientes realizados en *S. cerevisiae* en los que se ha investigado los defectos fenotípicos causados por la falta de L19e en la biogénesis de los ribosomas, determinando en qué pasos de la misma se requiere esta proteína (Poll *et al.*, 2009; Ohmayer *et al.*, 2013). Sin embargo, no se han descrito sus funciones específicas en ese proceso ni la que desempeña en el ribosoma maduro 80S durante la traducción eucariótica.

2.1. Genes que codifican L19e en *Saccharomyces cerevisiae*

En el genoma de *S. cerevisiae* existen dos genes **parálogos** *RPL19A* (*YBR084C-A*) y *RPL19B* (*YBL027W*) con un 94% de similitud en su secuencia de nucleótidos. Ambos difieren tanto en la secuencia y tamaño de sus intrones, que constituyen hasta 1/2 y 1/3 del total de la secuencia génica (506 bp en *RPL19A* y 384 bp en *RPL19B*), como en sus secuencias adyacentes en 5' y las secuencias no codificantes en posición 3', que sugiere una regulación diferencial de su expresión. Los dos genes se localizan en el Cromosoma II (**Figura 4**).

La secuencia del gen *RPL19A* es de 1.076 bp, y contiene una ORF codificante para la proteína L19A de 570 bp y un intrón de 506 bp. Adyacentes al gen *RPL19A* (*YBR084C-A*) se encuentran los genes *MIS1* (*YBR084W*), que codifica la C1-tetrahidrofolato sintasa mitocondrial (Shannon and Rabinowitz, 1988), y el gen *AAC3* (*YBR085W*), que codifica un intercambiador de ADP/ATP de la membrana mitocondrial (Kolarov *et al.*, 1990).

RPL19B tiene 954 bp de las que 570 corresponden a la ORF o secuencia codificante de L19B y 384 bp al intrón. Adyacentes en el genoma al gen *RPL19B* (*YBL027W*) se encuentran los genes *YBL028C*, que codifica una proteína de función desconocida, aunque se predice que podría estar involucrada en la biogénesis de ribosomas (Fleischer *et al.*, 2006); una secuencia de

replicación autónoma *ARS207(ARSII-170)* (Nieduszynski *et al.*, 2006); y el gen *LSM2* (*YBL026W*), que codifica la proteína nuclear Lsm, que se asocia al pequeño ARN nucleolar U6 (snoRNA) (Mayes *et al.*, 1999).

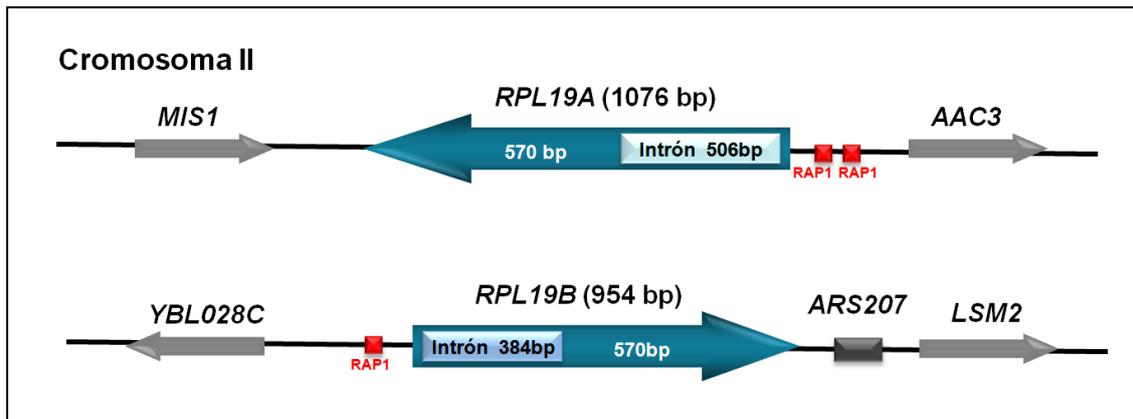


Figura 4. Representación esquemática de los genes *RPL19A* y *RPL19B* y localización en el genoma de *S. cerevisiae*. Se indican las secuencias de reconocimiento del factor de transcripción RAP1, los intrones y sus tamaños, así como los genes adyacentes.

En *S. cerevisiae*, 59 RP están codificadas por dos genes parálogos, y las cantidades de cada proteína en la célula son en muchos casos diferentes en condiciones de crecimiento similares (Komili *et al.*, 2007). Mediante el uso de *microarrays* de expresión que contienen ADN genómico de *S. cerevisiae*, se ha determinado la cantidad neta (*steady state*) de los transcritos de *RPL19A* y *RPL19B* presentes en el ARN total obtenido de células crecidas en medio rico. Los resultados indican que la **cantidad de ARNm** de *RPL19A* por célula es de 17,95 moléculas y 21,4 de *RPL19B*. Además, se ha medido su vida media, siendo 19 min la del ARNm de *RPL19A* y 33 min la del de *RPL19B* (Wang *et al.*, 2002). Estas diferencias de expresión estarían determinadas por los diferentes intrones y/o secuencias reguladoras de ambos genes (Hu *et al.*, 2010).

Mediante ensayos de western-blot usando un epítipo TAP unido a cada RP, y de microscopía electrónica usando una proteína de fusión GFP, se ha cuantificado la **cantidad de cada proteína RP** existente durante el crecimiento en fase logarítmica (en medio rico YEPD) y se ha descrito el nivel neto de las dos parálogas de L19e, determinando que la cantidad de L19B es el doble (~ 2,3X) que la de su paróloga L19A, 97.700 unidades de proteína de L19A por célula y 225.000 unidades de proteína L19B (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Sin embargo, la vida media de ambas proteínas es inversamente proporcional a su cantidad, siendo de 985 min para L19A y de 48 min para L19B (Belle *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, las **secuencias que flanquean en 5'** cada una de las ORF de las RP, se caracterizan por la presencia de sitios de unión al factor de transcripción RAP1 (Bosio *et al.*, 2011). Dichas secuencias suelen ser zonas ricas en timina que sirven como elementos auxiliares para promover una mayor eficiencia de la transcripción de dichos genes. RAP1 (*Repressor-activator protein 1*) es un factor de unión a ADN que puede actuar como activador o como represor de la transcripción de numerosos genes (Shore and Nasmyth, 1987). Se ha descrito que se une a 127 de los 138 promotores de RPG. Concretamente, se predice que en el promotor de *RPL19A* existen 2 sitios de unión para RAP1, uno en posición -418 y otro en -434 respecto al ATG (+1), y un único sitio de unión en el caso de *RPL19B*, en -389 (Lascaris *et al.*, 1999).

Los **intrones** de los RPG también tienen un importante papel en la regulación transcripcional (Pleiss *et al.*, 2007; Meyer and Vilardell, 2009; Hu *et al.*, 2010; Bergkessel *et al.*, 2011; Parenteau *et al.*, 2011; Plocik and Guthrie, 2012). Se ha descrito que los intrones de los distintos genes parálogos RPG ejercen regulación intragénica e intergénica de la expresión del propio gen y del otro parálogo (Parenteau *et al.*, 2011). Este hecho sugiere que los intrones mediarían la regulación diferencial de la expresión de las dos parálogas, pudiendo desempeñar un papel en la adaptación a cambios en las condiciones fisiológicas o ambientales para aumentar la supervivencia celular. Así, la eliminación del intrón de *RPL19A* permite comprobar que éste regula negativamente la transcripción de este gen, pero no existe regulación intergénica ni positiva ni negativa sobre la transcripción del gen parálogo *RPL19B*. Sin embargo, el intrón de *RPL19B* ejerce una regulación positiva intragénica e intergénica, ya que su eliminación reduce la expresión tanto de *RPL19B* como de *RPL19A*. Así mismo, se ha investigado el fenotipo que causa la falta de los intrones de cada uno de los genes parálogos de *RPL19* en el crecimiento celular y la sensibilidad o resistencia a algunas drogas. La falta del intrón de *RPL19B* produce fenotipo de crecimiento lento (*slg*) más acusado que cuando falta el intrón de *RPL19A*. La falta de cualquiera de ambos intrones causa en cada cepa sensibilidad a cafeína; y la falta del intrón de *RPL19B* provoca también sensibilidad al inductor de apoptosis estaurosporina. Sin embargo, el fenotipo que causa la delección de cada uno de los intrones son diferentes de los que provoca la delección de cada uno de los genes parálogos completos (Parenteau *et al.*, 2011).

Al alinear las secuencias codificantes (ORFs) de los genes parálogos *RPL19A* y *RPL19B*, se observa una gran similitud, y solamente difieren en 34 nt en la cadena codificante (**Figura 5**).

<i>RPL19A</i>	ATGGCTAATTTACGTA	CTCAAAAGAGACTT	GCCGTTCTGT	CGTCGGTGT	50
<i>RPL19B</i>	ATGGCTAACTTGCGTA	CTCAAAAGAGACTT	GCCGTTCTGT	TGTCGGTGT	50
	*****	**	*****	*****	
<i>RPL19A</i>	CGGTAAGAGAAAGGTTTGGTTAGATCCAAATGAAACCTCTGAAATTGCTC				100
<i>RPL19B</i>	TGGTAAGAGAAAGGTTTGGTTAGACCCAAACGAAACTTCTGAAATTGCC				100
	*****	*****	*****	*****	*
<i>RPL19A</i>	AAGCCA	ACTCCAGAAACGCCATTAGAAAATTGGTTAAGAACGGTACCATC			150
<i>RPL19B</i>	AAGCCA	ACTCTAGAAATGCCATTAGAAAATTGGTCAAGAACGGAACCATC			150
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	GTAAAGAAGGCCGTTACCGTCCACTCTAAATCCAGAACCAGAGCCCATGC				200
<i>RPL19B</i>	GTCAAGAAGGCCGTTACTGTCCACTCTAAATCTAGAACTAGAGCCCATGC				200
	**	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	TCAATCTAAGAGAGAAGGTCGTCACAGTGGTTACGGTAAGAGAAAGGGTA				250
<i>RPL19B</i>	TCAATCCAAGAGAGAAGGTCGTCACAGTGGTTACGGTAAGAGAAAGGGTA				250
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	ACCAGAGAAGCCCGTTTACCATCCCAAGTTGTCTGGATCAGAAGATTACG				300
<i>RPL19B</i>	ACTAGAGAAGCTCGTTTACCATCCCAAGTCGTCTGGATCAGAAGATTACG				300
	**	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	TGTCTTGAGAAGATTATTGGCTAAGTACCGTGATGCTGGTAAGATTGACA				350
<i>RPL19B</i>	TGTCTTGAGAAGATTATTGGCCAAGTACCGTGACGCTGGTAAGATTGACA				350
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	AGCACTTGTACCATGTTTTGTACAAGGAATCTAAGGGTAACGCTTTCAA				400
<i>RPL19B</i>	AGCATTTGTACCAAGTTTTGTACAAGGAATCCAAGGGTAACGCTTCAAG				400
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	CACAAGAGAGCCTTGGTTGAACACATCATCCAAGCTAAGGCTGATGCTCA				450
<i>RPL19B</i>	CACAAGAGAGCTTTGGTTGAACACATTATTCAAGCTAAGGCTGATGCTCA				450
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	ACGTGAAAAGGCTTTGAACGAAGAAGCTGAAGCTAGAAGATTGAAGAACA				500
<i>RPL19B</i>	ACGTGAAAAGGCTTTGAACGAAGAAGCTGAAGCTAGAAGATTGAAGAACA				500
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	GAGCTGCTCGTGACAGAAGAGCTCAAAGAGTTGCTGAAAAGAGAGATGCT				550
<i>RPL19B</i>	GAGCTGCTCGTGACAGAAGAGCTCAAAGAGTTGCTGAAAAGAGAGACGCT				550
	*****	*****	*****	*****	*****
<i>RPL19A</i>	TTATTGAAGGAAGACGCTTAA				570
<i>RPL19B</i>	TTGCTAAAGGAAGACGCTTAA				570
	**	*	*****	*****	

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las ORFs de *RPL19A* y *RPL19B*. En la figura se marcan en amarillo los nucleótidos en los que difieren ambas secuencias. Con la línea punteada azul se indica la posición de inicio y final del intrón de cada uno de los genes.

Los genes *RPL19A* y *RPL19B* de *S.cerevisiae* codifican dos proteínas **idénticas** de 189 aminoácidos, L19A y L19B, ambas con una masa molecular de 21,704 KDa (*Saccharomyces* Genome Database [www.yeastgenome.org]). La metionina inicial del extremo amino-terminal, tanto de L19A como de L19B, se elimina en su forma madura. Sin embargo, ninguna de estas proteínas se N^α-acetila en su metionina amino-terminal (Kamita *et al.*, 2011).

Mediante ensayos de espectrofotometría de masas, se hizo un análisis global de la **fosforilación** de proteínas por secuenciación de fosfopéptidos (Gruhler *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2008). L19A y L19B tienen varios sitios potenciales de fosforilación, concretamente las serinas S13, S30, S37 (conservada en todos los ortólogos de L19e) y S91; y la treonina T29. Se ha descrito en la secuencia primaria de aminoácidos de L19e una **señal potencial de localización nuclear** (NLS) (Underwood and Fried, 1990; Schaap *et al.*, 1991), que se puede predecir usando el programa cNLS mapper (Kosugi *et al.*, 2009) (**Figura 6**), pues estas proteínas se sintetizan en el citoplasma y han de ser importadas al núcleo y/o al nucleólo para la biogénesis de ribosomas.

L19A y L19B son proteínas **básicas** con un punto isoeléctrico de 11.93. El 29,1% de los aminoácidos son básicos frente a un 15% de residuos ácidos. Además, entre los básicos, 3,7% son histidinas (H), 12,2% lisinas (K) y un 13,2% argininas (R). La mayoría de las proteínas ribosómicas son ácidas en su extremo C-terminal y básicas en su extremo N-terminal. Sin embargo, **L19e posee ambos extremos básicos**, que permiten predecir **interacciones electrostáticas** entre las numerosas argininas (R) y lisinas (K) de su estructura con los grupos fosfato de la cadena principal del ARN, por lo que existirían numerosos contactos proteína-ARN (Klein *et al.*, 2004).

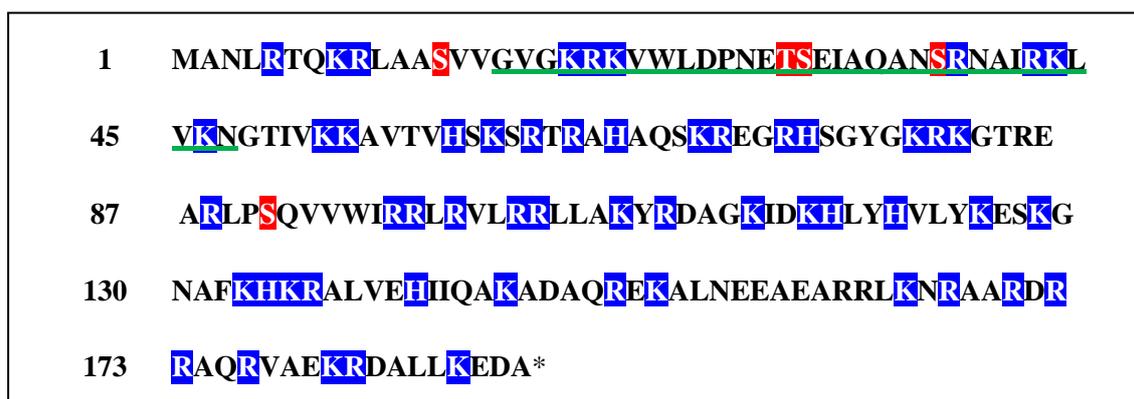


Figura 6. Secuencia de aminoácidos de las proteínas ribosómicas L19A y L19B. En la figura se resaltan en azul los residuos básicos, en rojo los sitios potencialmente fosforilables, y subrayados en verde aquellos que forman parte de la secuencia potencial de localización nuclear de L19e en *S.cerevisiae*.

2.2. Estructura de L19e en *S. cerevisiae*

La estructura bidimensional de L19e permite predecir múltiples α -hélices, entre ellas una larga α -hélice en la zona C-terminal y alguna lámina beta (Jones, 1999). En la estructura terciaria de L19e se predicen, mediante el programa *Discovery Studio* y *UCSF-Chimera*, que existen dos **dominios globulares** diferentes, uno desde la posición 1 a la 57, y otro desde la 82 a la 189, conectados por un puente intermedio sin estructura de este tipo (**Figura 7 B**). L19e se clasifica en el grupo de las proteínas ribosómicas α -helicoidales (Klein *et al.*, 2004).

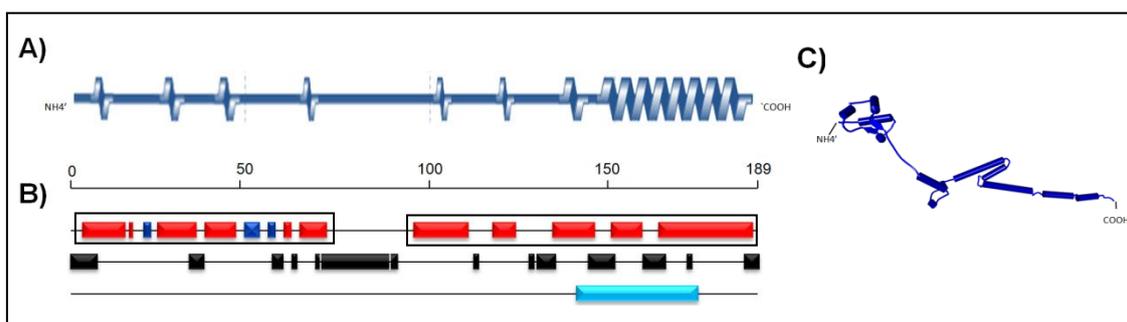


Figura 7. Estructura de L19e en *S. cerevisiae*. A) Estructura bidimensional que muestra las α -hélices de L19e (adaptado de <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/>) B) Dominios similares a otros descritos en la literatura para RP y otras proteínas (Malmstrom *et al.*, 2007). En rojo se representan las α -hélices, en azul las láminas beta, y enmarcados con un cuadrado negro se indican los dos dominios globulares de L19e. Debajo, en negro se indican las regiones desordenadas o sin estructura concreta (Jones and Ward, 2003), y en azul claro una zona de la proteína que se enrolla sobre sí misma (Lupas *et al.*, 1991) (modificado de <http://www.yeastrc.org>). C) Estructura tridimensional de L19e (Programa *Discovery Studio*).

2.3. Localización de L19e en el ribosoma eucariótico

Gracias a la reciente obtención de la estructura con alta resolución atómica de cristales puros de ribosomas eucarióticos (Ben-Shem *et al.*, 2011; Anger *et al.*, 2013; Voorhees *et al.*, 2014) se ha podido predecir la localización de L19e. Además, estos estudios se complementan y completan con los datos y predicciones que derivan de estudios de *cryo-EM* realizados previamente del ribosoma 80S de *S.cerevisiae* (Taylor *et al.*, 2009; Ben-Shem *et al.*, 2010).

De esta forma, en el **extremo C-terminal de L19e** se puede predecir la formación de una larga α -hélice (Jones, 1999) formada por 60 aminoácidos, entre los que abundan los de carácter básico (**Figura 7**). Esta hélice alfa se introduce 40 Å en la subunidad 40S y establece contactos con el ARNr 18S. En concreto, los residuos 159-168 de L19e contactan con la Hélice E del segmento de expansión exclusivamente eucariótico **eES6S** del ARNr 18S, formando el nuevo

puente eucariótico eB12 entre las subunidades mayor y menor del ribosoma (Chandramouli *et al.*, 2008; Ben-Shem *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012) (**Figura 8 A y Tabla 1**).

Residuos de L19e	Residuos del ARNr 18S
R162	Base 815
R163	Base 813
K165	Fosfato 850
N166	Fosfato 815
R167	Fosfato814
R170	Fosfato814
R172	Fosfato 851
R173	Base 855
R176	Fosfato 852
K180	Fosfato 854

Tabla 1. Residuos de L19e que contactan físicamente con el ARNr 18S formando el puente eucariótico eB12 (Ben-Shem *et al.*, 2011).

El segmento de expansión **ES6S** del ARNr 18S está compuesto por 200 nt que forman 3 hélices muy dinámicas y flexibles, pudiendo adoptar diferentes conformaciones (Ben-Shem *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011). Precisamente la zona dinámica de dichas hélices es la zona de unión a la subunidad 40S del factor de inicio de la traducción **eIF4G**, que forma parte del complejo eIF4 de unión al *cap* en el extremo 5' de los ARNm junto a eIF4E, y eIF4A (Rajagopal *et al.*, 2012). eIF4G actúa como un adaptador para el reclutamiento del ARNm, promueve la actividad helicasa y fuerza el *scanning* en dirección 5' → 3' (Marcotrigiano *et al.*, 2001; Sonenberg and Dever, 2003; Marintchev *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011) (**Figura 8 B**). Además, tiene un importante papel en la circularización del ARNm al interactuar directamente con la proteína de unión a colas de poli (A) (PAB1) (Park *et al.*, 2011; Fatscher *et al.*, 2014).

Entre otras, hay dos RP que están implicadas o facilitan los contactos que se establecen entre las dos subunidades ribosómicas y podrían tener un papel muy importante en el movimiento e interacciones entre ambas subunidades durante la traducción y/o en la regulación del proceso: **L19e** y **L24e** (Melnikov *et al.*, 2012) (**Figura 8 C**). Además, en el caso de L24e se ha descrito un papel en la **reiniciación de la traducción** en el virus del mosaico de la coliflor (Nishimura *et al.*, 2004; Thiebeauld *et al.*, 2009) Por otra parte, en el ribosoma 80S también se forma un puente con L41e, que se localiza en el medio de la superficie entre subunidades y se asocia con el ARNr 18S, pero forma menos contactos que L19e o L24e.

El dominio α -helicoidal C-terminal de L19e, además de interactuar con el ARNr 18S, interactúa en la estructura resuelta con otras proteínas de la subunidad 40S, concretamente con **S7e** (los residuos L185 y A189 de L19e contactan físicamente con la R39 y S2 de S7e, respectivamente) y con **S17e** (N156, Q160 y R167 de L19e contacta con la F154, F156, F156 de S17e, respectivamente) (Ben-Shem *et al.*, 2011) (**Figura 8 D**).

Así mismo, una parte del dominio C-terminal de L19e y del segmento de expansión ES6S del ARNr 18S, se encuentran localizados cerca de la zona de entrada y de salida del **túnel del ARNm** (**Figura 8 E**) (Ben-Shem *et al.*, 2010), zona de interacción del ribosoma con otros factores, como STM1, factor que modula el *decapping* del ARNm (Balagopal and Parker, 2009).

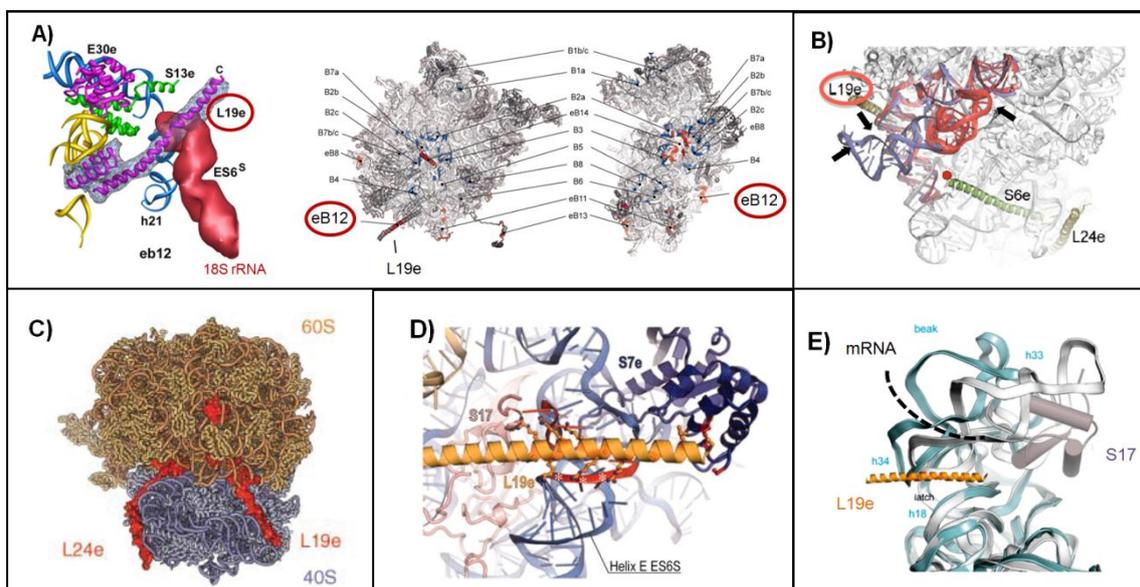


Figura 8. Localización del dominio C-terminal de L19e en el ribosoma. **A)** Formación del puente eucariótico eB12. A la izquierda se muestra en morado la zona C-terminal de L19e y en rojo el ES6 del ARNr 18S en un modelo de *cryo-EM* (Chandramouli *et al.*, 2008). A la derecha se indica con un círculo rojo el puente eB12. También en rojo se indican los residuos concretos de cada subunidad que forman los puentes eucarióticos (Ben-Shem *et al.*, 2011). **B)** Con flechas negras se muestran los posibles residuos del ES6 (en morado y rojo en la estructura) que contactan con el factor de traducción eIF4G. En gris se representa el ARNr, y en amarillo y verde las RPs (Ben-Shem *et al.*, 2011). **C)** Localización de L19e contactando las dos subunidades del ribosoma 80S. En amarillo se representa la subunidad 60S, en azul la 40S y en rojo las RPLs L19e y L24e (Melnikov *et al.*, 2012). **D)** En amarillo se representa la α -hélice C-terminal de L19e en contacto con las proteínas S7e (en azul oscuro) y con S17e (en rosa). En rojo se indica la zona de contacto de L19e con el ARNr 18S, que se representa en azul (Ben-Shem *et al.*, 2011). **E)** Zona del túnel de salida del ARNm. En morado se representa la proteína S17e, en amarillo el extremo C-terminal de L19e, en azul el ARNr 18S de eucariotas y en gris el ARNr 16S de procariotas (Modificado de Ben-Shem *et al.*, 2010).

Para el **extremo N-terminal de L19e** se predice, a partir de los datos estructurales, que se localiza en la zona del **túnel de salida del polipéptido**, formando parte de una especie de anillo concéntrico cerca de las proteínas ribosómicas L17, L22, L25, L26, L31e, L32, L35, L37 y L39e (Becker *et al.*, 2009; Gamalinda *et al.*, 2013) (**Figura 9 A**). Se ha propuesto que estas proteínas proporcionan una especie de plataforma en la que interactúan con proteínas esenciales en la traducción, entre ellas, la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y los complejos proteicos asociados al polipéptido naciente (NAC) (Peisker *et al.*, 2008). Además, en levaduras el extremo N-terminal de L19e se asocia a una proteína *Sec-like* (SEC61), que forma un canal hacia el retículo endoplasmático por el que se conducen proteínas secretoras y de membrana recién sintetizadas por el ribosoma para su modificación en el retículo (Becker *et al.*, 2009). En la estructura de alta resolución del ribosoma porcino publicada recientemente, el residuo N36 de L19e interactúa con la T407 y la R405 del loop 8/9 de SEC61 α (**Figura 9 B**) (Voorhees *et al.*, 2014).

Se ha descrito que además la zona N-terminal de L19e interactúa con el **Dominio III del ARNr 25S**, como también lo hacen L2, L25, L31, L39 y L43 (Ohmayer *et al.*, 2013). Por otra parte, en el ribosoma 50S de la arqueobacteria *Haloarcula marismortui*, el dominio N-terminal de L19a contacta con las hélices H47, H50, H53 y H59 del dominio III del ARNr 23, equivalente en arqueobacterias al ARNr 25S eucariótico (**Figura 9 C**). Además, el dominio C-terminal de L19a interactúa con la hélice H34 del dominio II (en la zona de entrada del ARNm), con H58 del dominio III, con H63 del dominio IV y con el Dominio VI (Klein *et al.*, 2004) (**Figura 9 D**). La interacción de L19e con las hélices H50 y H59 también se ha descrito en mamíferos (Becker *et al.*, 2009).

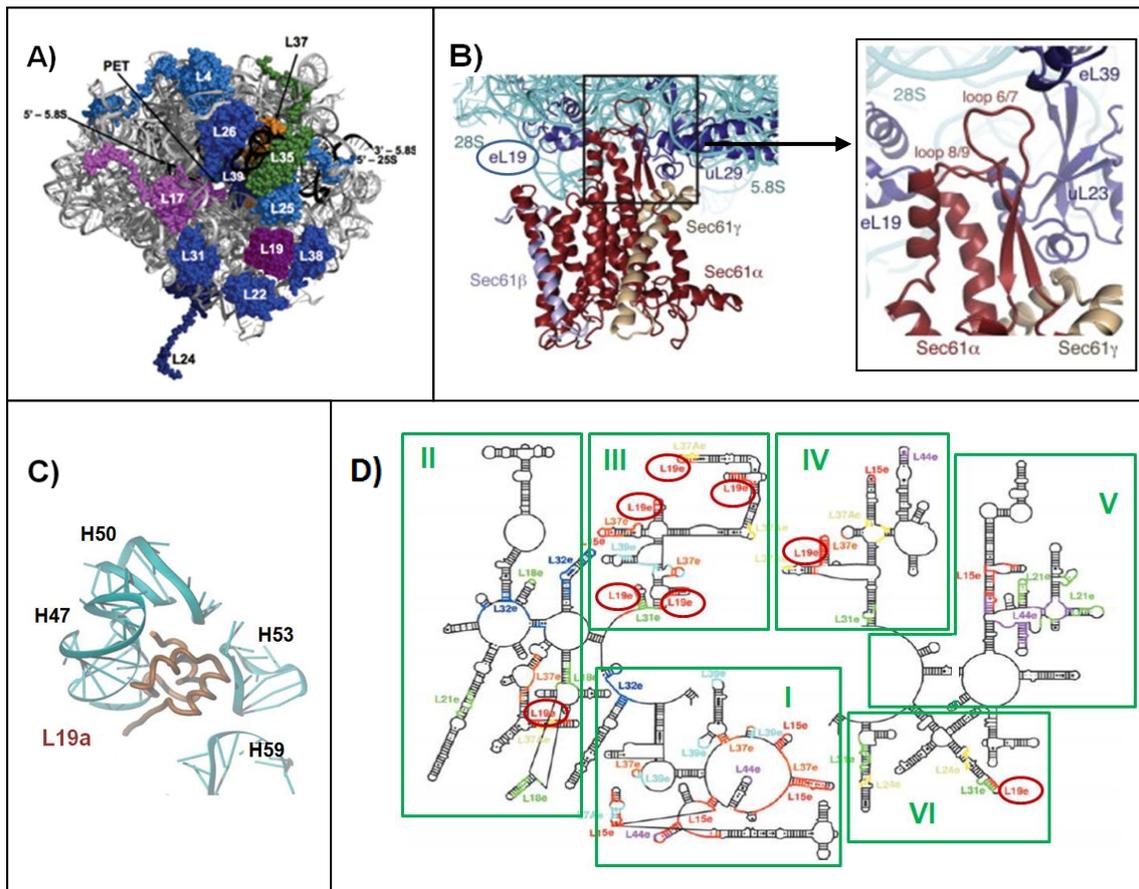


Figura 9. Localización del dominio N-terminal común de L19a y L19e en el ribosoma eucariota y sus contactos con el ARNr 23S en el de *Haloarcula marismortui*. A) Localización L19e (en morado oscuro) en el túnel de salida del polipéptido (PET) en *S.cerevisiae* (Modificado de Gamalinda *et al.*, 2013). B) Interacción de L19e (en morado a la izquierda) con Sec61 α (en granate) en el ribosoma porcino (Voorhees *et al.*, 2014). C) Interacción de la zona N-terminal de L19a (en rojo) con diferentes hélices del 23S ARNr. D) Estructura esquemática del ARNr 23S e interacciones físicas de L19e (marcada con círculos rojos) con su estructura. Las figuras C) y D) representan interacciones de L19a con el ARNr obtenidos de la estructura propuesta para el ribosoma de la arqueobacteria *H. marismortui* (Modificado de Klein *et al.*, 2004).

En lo referente a las interacciones de L19e con el ARNr dentro de la subunidad 60S, se ha descrito que 14 aminoácidos contactan con el Dominio II del ARNr 25S, 51 con el Dominio III, 27 con el Dominio IV y 8 con el Dominio VI; Sin embargo, L19e no contacta ni con los ARNr 5,8S ni con el 5S (Gamalinda *et al.*, 2014) (**Figura 10**).

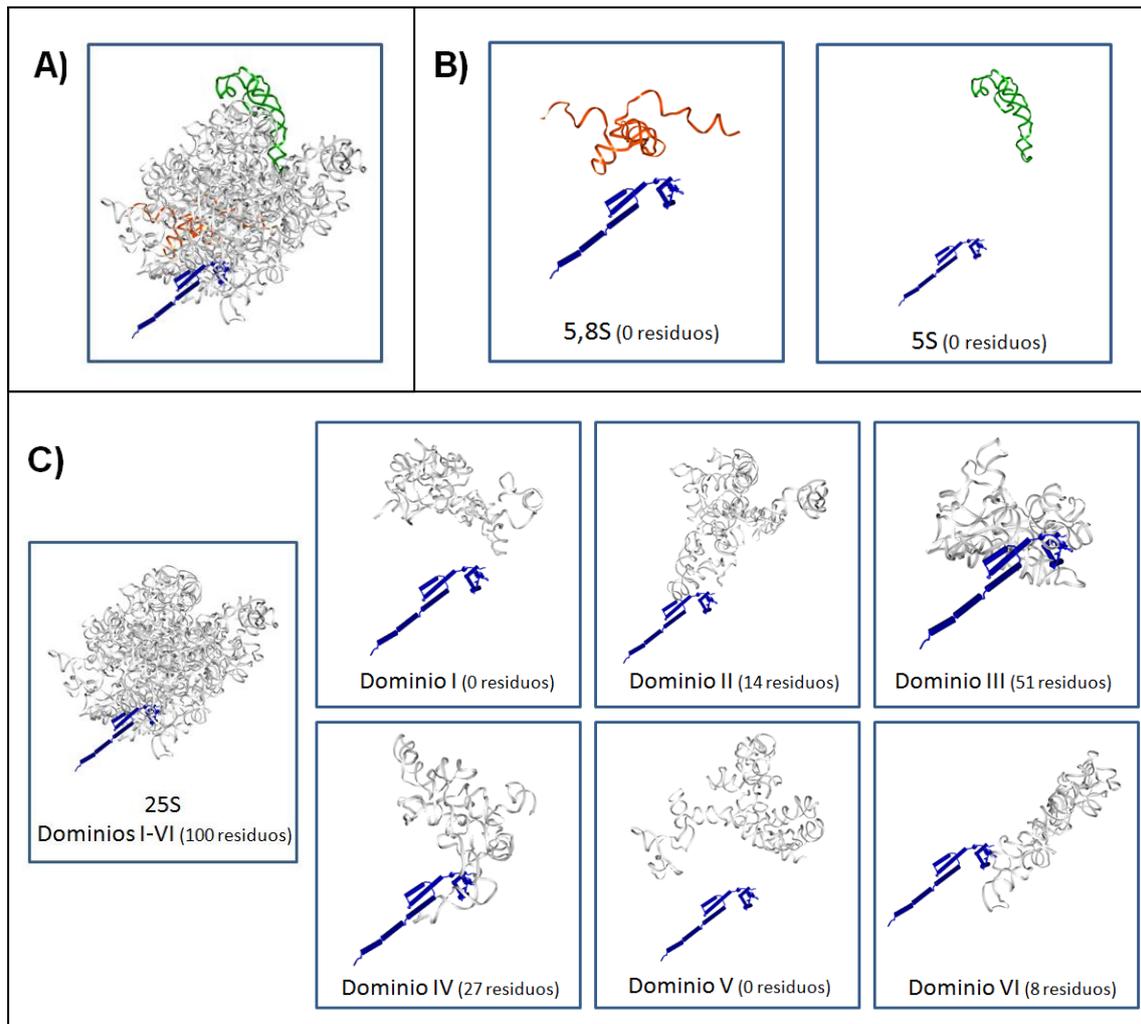


Figura 10. Contactos de L19e con los ARNr 25S, 5,8S y 5S de la subunidad 60S de *S.cerevisiae* (programa *Discovery studio*). **A)** Representación del ARNr 25S (en gris), 5,8S (naranja), 5S (verde) y L19e (azul). **B)** L19e no contacta con 5,8S (en naranja) ni con 5S (verde) **C)** Contactos de L19e (azul) con cada uno de los 6 dominios del ARNr 25S (en gris).

2.4. Proteínas ortólogas de L19e

L19ae forma parte de los ribosomas de arqueobacterias y eucariotas, pero no del bacteriano. Al analizar su estructura, se observa que la longitud del dominio C-terminal de L19e varía según el organismo; así L19e en *S. cerevisiae* tiene 189 aminoácidos (aa), en humanos 196 aa, en plantas como *Arabidopsis Thaliana* 210 aa y en *Drosophila melanogaster* 203 aa. Por el contrario, L19a en arqueobacterias carece de los últimos 50 aa en relación a las L19e de *S. cerevisiae* (**Figura 11**). Por lo tanto, es posible que el extremo C-terminal de L19e permita establecer nuevos contactos eucarióticos más o menos flexibles entre las subunidades ribosómicas, facilitando quizá la rotación entre ellas en el ribosoma 80S al ser más grandes y

complejas en ARNr y proteínas que las bacterianas (Zhang *et al.*, 2009); en cualquier caso, la extensión adicional en eucariotas sugiere que proporcionarían alguna función adicional o en versión mejorada de la que ya habría aparecido para servir a una función ancestral en arqueobacterias, mediadas por una proteína L19a de mucho menor tamaño.

L19 forma parte de la **superfamilia de proteínas L19e**, en la que todos los miembros tienen en común los residuos aminoacídicos 28 al 47 en el extremo N-terminal, que se encuentran en la zona del túnel de salida del polipéptido (**Figura 11 D**). Por otra parte, los residuos 112, 113, 115-119 y 139-149 de L19e constituyen la zona que establece el contacto entre subunidades o nuevo puente eB12. Además, se predicen residuos aminoacídicos concretos de contacto con el ARNr 25S (interacciones proteína-ARNr), que son: 4, 8, 9, 18-24, 26, 29, 38, 42, 53, 55-60, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 72, 74-79, 81-89, 92, 95-97, 100, 101, 103, 110, 117, 118, 120, 121, 124-126, 129, 131, 134, 135 (Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Marchler-Bauer *et al.*, 2011) (**Figura 11 D**).

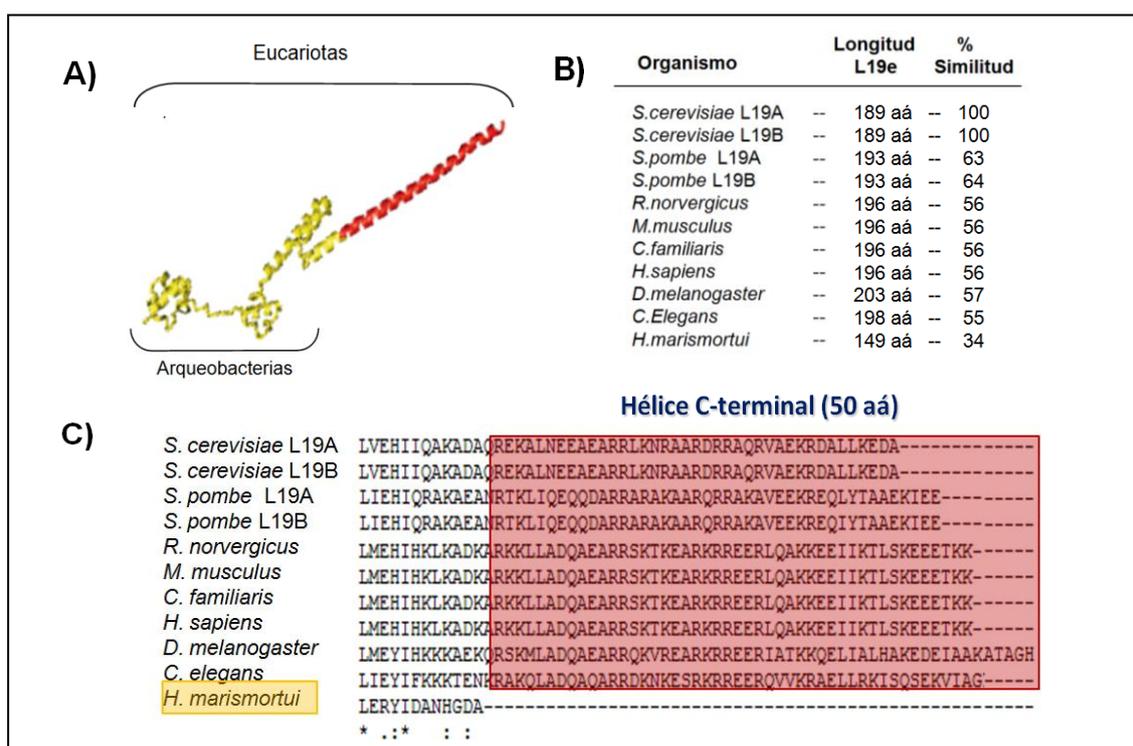
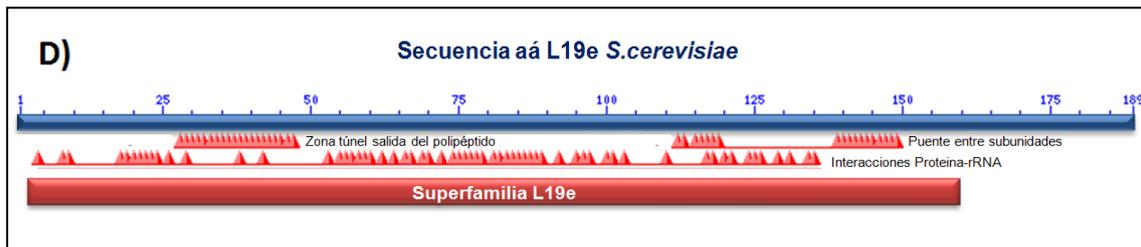


Figura 11. Comparación de L19e de *S. cerevisiae* con las proteínas ortólogas en otros organismos eucariotas. A) Evolución de L19e. A la izquierda en la parte superior, se muestra la estructura terciaria predicha para L19e, donde se representa en amarillo la zona de L19e conservada en arqueobacterias y eucariotas, y en rojo la extensión C-terminal exclusiva de eucariotas (Ben-Shem *et al.*, 2011). En **B)** se compara tanto de la longitud de la proteína como el porcentaje de similitud de las L19e entre las diferentes especies. En **C)** se representa el dominio C-terminal de L19e marcado en rojo, ausente en *H. marismortui*, representada en amarillo.



Continuación Figura 11. D) Super-familia de L19e. En azul se representa la secuencia de aa de L19e en *S.cerevisiae*. Con los triángulos rojos se marcan los residuos específicos que se localizan en la zona del túnel de salida del polipéptido, en el puente eB12 entre subunidades y los involucrados en la interacción proteína-ARNr. El cuadrado rojo indica la zona de L19e conservada en toda la superfamilia (Modificado de <http://www.yeastrc.org/pdr/viewProtein.do?id=528505>).

2.5. Interacciones físicas y genéticas de L19e

Se ha descrito que L19e interacciona física y/o genéticamente con varias proteínas, bien en los pre-ribosomas de 60S con factores de ensamblaje transitoriamente o con otras RP y ARNs, y en el ribosoma maduro (*Saccharomyces Genome Database* [<http://www.yeastgenome.org>]). Algunas de las interacciones más relevantes de L19e que se han descrito recientemente son:

- **Factores de ensamblaje en pre-ribosomas:** ARX1, NOP15, RPL7, RPF2, RRP17.
- **Proteínas ribosómicas de 40S (rpSs):** S1A, S1B, S2, S3, S5, S6A, S6B, S7A, S7B, S13, S14A, S15, S16B, S17A, S17B, S20, S24A, S30A.
- **Proteínas ribosómicas de 60S (rpLs):** L2A, L3, L4A, L4B, L6A, L6B, L8A, L8B, L9A, L10, L11B, L13A, L14B, L15A, L16A, L16B, L17A, L17B, L18B, L20A, L20B, L21A, L21B, L23A, L23B, L24A, L25, L26A, L26B, L28, L29, L30, L31A, L32, L35B, L36A, L36B, L37A, L37B, L42B, P2B.

La mayoría de estas interacciones son **físicas** y han sido determinadas por ensayos de espectrofotometría de masas, de western blot o ensayos de doble híbrido. Sin embargo, otras interacciones como aquellas de L19e con RLP7, RPF2, S6A, S7A, S17A, S17B, L16A, L16B, L35B, L37A y L37B, son **genéticas** (es decir, de letalidad o empeoramiento del crecimiento en relación a los mutantes simples de delección de cada gen). La interacción con S20 es una interacción **letal sintética** (Funspec [<http://funspec.med.utoronto.ca/>]). Además, cuando se reduce la dosis de L3, L9, L17, L18 y L23 en *S.cerevisiae*, la cantidad de L19 disminuye, sugiriendo que podrían ensamblarse conjunta o dependientemente unas de otras en la biogénesis de la subunidad 60S (Gamalinda *et al.*, 2014).

Se han descrito algunas interacciones **letales sintéticas** adicionales de la reducción de L19e (delección de uno de los dos genes parálogos que la codifican) con la delección de genes de proteínas implicadas en la división celular, concretamente de L19A con CLA4, una quinasa involucrada en la formación del anillo de septinas y la citocinesis (Goehring *et al.*, 2003); y de L19B con BIK1, una proteína asociada a microtúbulos (Tong *et al.*, 2004), con CDC12, una proteína de unión al ADN en los telómeros (Addinall *et al.*, 2008), y DEP1, un modulador implicado en el mantenimiento de los telómeros y en la esporulación (Tong *et al.*, 2004).

2.6. Funciones extra-ribosómicas de L19e

En células humanas se ha descrito una función extra-ribosómica de L19e. Se trata de un papel regulador en la señalización de TLR3 (toll-like receptor 3), un receptor que induce la **inflamación** y que se ha relacionado con diversos trastornos inflamatorios e inmunes (Finberg and Kurt-Jones, 2004; Bowie and Haga, 2005). Por otra parte, se ha descrito que en células de glioblastoma se detecta una gran cantidad o acumulación de la proteína L19e que inhibe la producción de las citoquinas IP-10 e IL-8, por lo que L19e podría estar implicada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas (Yang *et al.*, 2011).

L19e posee también una función **pro-apoptótica** descrita en células de cáncer de mama de la línea MCF7. La sobreexpresión de L19e en estas células induce la muerte celular debido al estrés en el retículo endoplasmático. L19e parece que media la inducción de las vías de señalización de respuesta a dicho estrés, incluyendo la auto-fosforilación de la quinasa PERK y del factor de iniciación eIF2 α por ella (Páginas 46 y 51) (Hong *et al.*, 2014).

Por otra parte, en *D. melanogaster*, L19e participa en la regulación del **desarrollo celular**, ya que su ausencia produce lo que se denomina fenotipo *minute*, que consiste en un desarrollo celular más lento, con alas más pequeñas, cerdas más cortas y delgadas, ojos poco desarrollados, viabilidad reducida y menor tamaño corporal, aunque las moscas poseen el mismo número de células (Kongsuwan *et al.*, 1985; Hart *et al.*, 1993; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013).

Finalmente, la carencia de L19A en *S.cerevisiae* se ha descrito como un supresor de *Pma1-10*, un mutante de la ATPasa de membrana plasmática PMA1 que regula el **pH celular**. Cuando falta L19A en la célula, la degradación de *Pma1-10* es más lenta, pudiendo afectar al pH (Liu and Chang, 2009) además de a otros procesos celulares, ya que el pH del medio en el que se encuentre la levadura influye directamente tanto en su crecimiento, como en su fisiología y diferenciación.

a) L19e y ciclo celular:

S.cerevisiae es un organismo unicelular que puede presentar 3 tipos celulares diferentes: células haploides a , células haploides α y diploides a/α , teniendo cada una de ellas un papel determinado en su ciclo de vida en función de las condiciones ambientales. Tanto la fase haploide como la diploide son estables y siguen un ciclo mitótico, reproduciéndose de forma asexual por gemación. Este ciclo mitótico está dividido en varias fases: **G1**, en la que la célula aumenta de tamaño al duplicarse el contenido celular (excepto el ADN) y emerge la célula hija o yema; **S**, donde comienza la replicación del ADN; **G2**, en la cual la célula se prepara para la división y repara posibles errores de la replicación, y **M**, en la que ocurre la división nuclear y la citoquinesis (la célula hija se separa de la célula madre) (**Figura 12 A**).

El ciclo celular, además de por otros factores, puede verse afectado por defectos en biogénesis de ribosomas y en la síntesis de proteínas, ya que en determinadas situaciones se podría alterar la afinidad de los ribosomas por distintos ARNm, entre otros, las proteínas que participan en el ciclo (Zaragoza *et al.*, 1998; Jorgensen *et al.*, 2004). Se ha descrito que la mayoría de las RP de la subunidad 40S se requieren para la progresión del ciclo en la fase G1. Por el contrario, algunas RPs de la subunidad 60S se requieren igualmente para la progresión del ciclo en la fase G1, mientras que otras son necesarias para el paso desde la fase G2 a M. Mediante experimentos de citometría de flujo, usando una cepa WT y otra que expresa sólo el parálogo *RPL19B* desde un plásmido reprimible por glucosa, se ha comprobado que L19e se requiere, junto a otras proteínas de la superficie de 60S, como son L1, L3, L9, L16, L21, L25, L30 y L43, para la progresión de la fase G1 a S, es decir, para el cambio del contenido de ADN de las células de 1N a 2N, lo que sugiere que la falta de L19e produce un **retraso en G1** (Thapa *et al.*, 2013).

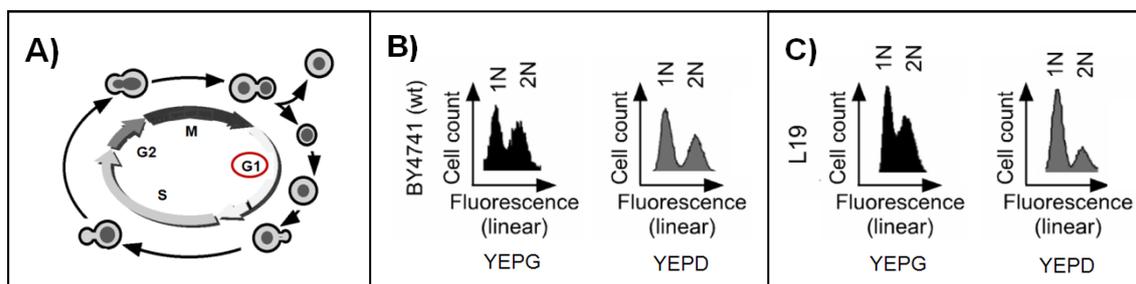


Figura 12. La represión de la expresión de L19e provoca un retraso en la fase G1 del ciclo celular. A) Representación esquemática del ciclo celular en *S. cerevisiae*. B) y C) Experimentos de citometría de flujo en los que cultivos asincrónicos de células creciendo en YEPG (picos negros en el perfil) se transfirieron a YEPD para reprimir la síntesis de la proteína (picos grises). Los picos 1N y 2N corresponden a células sin replicar o con el genoma duplicado, respectivamente (Thapa *et al.*, 2013).

b) L19e y enfermedades humanas:

Recientemente se ha descrito que L19e se encuentra asociada a una ribosomopatía humana, la **DBA** (anemia *Diamond Blackfan*). Así, un cambio de fase del codón de terminación del gen *RPL19* a una nueva posición causa la extensión del extremo C-terminal de la proteína L19e humana, dando lugar a una nueva proteína de 216 aa, con su extremo C-terminal más largo en 20 aa que el de la proteína WT de 196 aa. Se observa además una drástica disminución en la producción de subunidades 60S en células de pacientes con esta mutación que afecta a L19e (Gazda *et al.*, 2012) (**Figura 13**).

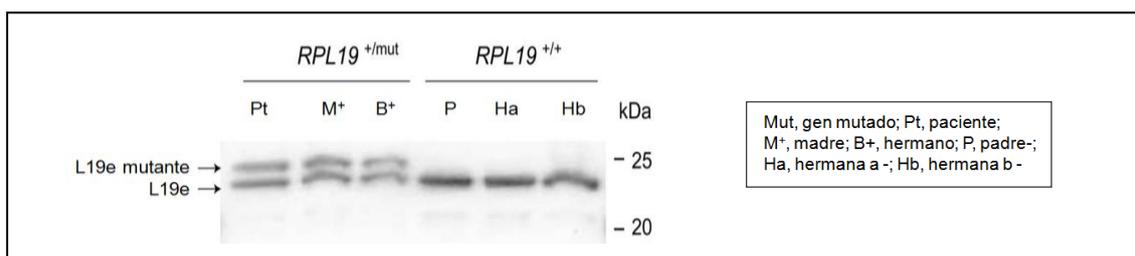


Figura 13. Detección de L19e mutante por western-blot. Se muestran los ARNm de las proteínas L19e de individuos sanos y enfermos miembros de una familia con DBA (Modificado de Gazda *et al.*, 2012).

La cantidad de L19e en líneas celulares de cáncer de próstata es muy elevada. Además, aquellos pacientes que poseen bajos niveles de L19e sobreviven más tiempo. Esto sugiere que *RPL19* podría ser utilizado como **marcador de la prognosis del cáncer de próstata** (Bee *et al.*, 2006). Se ha comprobado que su silenciamiento con ARN de interferencia disminuye la agresividad del fenotipo de proliferación descontrolada en células en cultivo (Bee *et al.*, 2011).

Un incremento en la cantidad de L19e está también correlacionado con el cáncer colorrectal de mal pronóstico, aumentando la cantidad de proteína en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, el aumento de los niveles de L19e se relaciona con un mayor riesgo de padecer el cáncer y también con una supervivencia de los pacientes ya enfermos menor de 48 meses. Por tanto, L19e podría ser también un buen **marcador para la prognosis del cáncer colorrectal** (Huang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010).

Por otra parte, en biopsias de **cáncer de mama** se ha detectado una elevada expresión y co-amplificación del gen *RPL19* junto con el oncogen *ERBB2* (éste aparece amplificado en un 10-40% de los casos de este tipo de cáncer), con el gen de la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), el de la subunidad del proteosoma beta tipo 3 (PSMB3) y el del receptor nuclear del grupo 1, miembro 1 (NR1D1). Todos ellos mapean en el mismo cromosoma en humanos (Cr. XVII). Esto sugiere que el perfil de expresión génica en las biopsias de mama puede llegar a ser un método valioso para la caracterización del cáncer (Dressman *et al.*, 2003).

L19e se ha descrito como un nuevo **antígeno** tumoral en **adenocarcinoma de pulmón** reconocido por linfocitos T citotóxicos autólogos. El silenciamiento de *RPL19* resulta en una inhibición del crecimiento de las células cancerígenas en cultivo. Por tanto, L19e podría ser una diana para una inmunoterapia específica (Kuroda *et al.*, 2010).

L19e es, por tanto, una proteína ribosómica muy relevante desde el punto de vista biológico y médico, por lo que sería de interés determinar cuáles son sus funciones primarias en los procesos de biogénesis de ribosomas y traducción, usando *S. cerevisiae* como organismo modelo.

3. BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

La biogénesis de ribosomas en eucariotas es un proceso que comienza en el nucléolo y en el que ocurren gran cantidad de reordenamientos estructurales. Durante este proceso ocurren concomitantemente el procesamiento endo y exonucleolítico de los pre-ARNr y el ensamblaje de las RP, que son facilitados por numerosos factores de ensamblaje no ribosómicos para dar lugar progresivamente a varias partículas pre-ribosómicas que, según van madurando, se van desplazando del nucléolo al nucleoplasma y al citoplasma, donde ocurren los pasos finales de maduración de los pre-ribosomas.

Las RP, después de haber sido sintetizadas en el citoplasma, son importadas al nucléolo y/o al núcleo para ensamblarse en los pre-ribosomas, donde se requieren para diversos pasos del procesamiento y del plegamiento de los pre-ARNr, y para el transporte de los pre-ribosomas a través de los compartimentos mencionados. Aunque las RP son suficientemente pequeñas para ser transportadas por difusión pasiva, la concentración en el núcleo es mayor que en el citoplasma, y su vida media en el citoplasma oscila entre 30 segundos y 3 minutos, por lo que requieren transporte activo. Muchas de las RP poseen **señales de localización nuclear (NLS, nuclear location signal)** para ser importadas al núcleo (Underwood and Fried, 1990; Schaap *et al.*, 1991). Estas señales son reconocidas por una familia de proteínas denominadas β -importinas o carioferinas (Kap), que interaccionan con las nucleoporinas y con RAN-GTPasas, que median la translocación hacia el interior del núcleo. En *S. cerevisiae*, la carioferina KAP123 es la encargada de unirse a las RP y las transporta al núcleo (Rout *et al.*, 1997). Esta carioferina no es esencial, y se ha descrito que en su ausencia, otras carioferinas se encargan de la importación de las RP al núcleo, como son PSE1/KAP121, SXM1/KAP108, NDM5/KAP119 y MSN5/KAP142 (Yoshida and Blobel, 2001; Sydorsky *et al.*, 2003). Con aproximadamente 150 poros por núcleo (Winey *et al.*, 1997), cada poro puede importar ~1000 RP por minuto, y exportar unas 25 subunidades ribosómicas casi maduras por minuto en *S. cerevisiae* (Warner, 1999).

3.1. Factores de ensamblaje que participan en la biogénesis de ribosomas

La biogénesis de ribosomas es un proceso enormemente dinámico en el que intervienen más de 250 **factores de ensamblaje no ribosómicos** que se asocian y se disocian de los distintos pre-ribosomas cuando han llevado a cabo su función, no encontrándose en las subunidades ribosómicas maduras (Nissan *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2003). Además, tanto estos factores como las RP se ensamblan en los pre-ribosomas en un orden jerárquico (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007; Ohmayer *et al.*, 2013; Gamalinda *et al.*, 2014). La mayoría de estos factores son esenciales y están conservados en todos los eucariotas. Entre ellos se encuentran los siguientes:

- Las **ribonucleasas**, encargadas de procesar distintos precursores de los ARNr maduros. Se dividen en endonucleasas, que producen la hidrólisis en puntos internos específicos de los distintos pre-ARNr, entre ellas **RNT1** (Kufel *et al.*, 1999), **NOB1** (Fatica *et al.*, 2003a) o **MRP** (Lindahl *et al.*, 2009); y exonucleasas, que digieren los ARNr en sentido 5' → 3' o 3' → 5', como **RAT1** (Henry *et al.*, 1994) o **RRP17** (Oeffinger *et al.*, 2009).

- Los **snoRNP** (*small nucleolar ribonucleoparticles*). Se conocen unos 76 snoRNP en *S. cerevisiae*, que son complejos ribonucleoproteicos formados por snoARNs (*small nucleolar ARNs*), cuya función es la unión con el pre-ARNr de destino, sirviendo de andamio para proteínas asociadas, entre las que se encuentran enzimas encargadas de catalizar diversas reacciones de modificación de los pre-ARNr. Los snoRNP llevan a cabo **pseudouridilaciones** y **metilaciones** de ribonucleósidos y existen dos familias (Balakin *et al.*, 1996; Kiss *et al.*, 2010; Watkins and Bohnsack, 2012). Los snoRNP de la familia H/ACA-box, que realizan la conversión de uridinas específicas a pseudouridinas (ψ) en *S. cerevisiae*, como **snR10** y **snR30**, y las modificaciones que realizan son necesarias en las primeras etapas del procesamiento de pre-ARNr. Y los snoRNP de la familia C/D-box, encargados de la **metilación** en 2'-O-ribose en los pre-ARNr de *S. cerevisiae*, como **U3** y **U14**, que se requieren también para los primeros pasos del procesamiento de los pre-ARNr.

- Las **ARN helicasas**, de las que en *S. cerevisiae* se han descrito 19 implicadas en la biogénesis de los ribosomas, que pertenecen a la familia **DEAD-box** (también denominadas SF2) (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Estas enzimas intervienen en reordenamientos estructurales que facilitan el acceso de las nucleasas, modificando la conformación del pre-ARNr, RP y complejos ribonucleoproteicos, para permitir la asociación y/o disociación de otros factores como los snoARNs (Watkins and Bohnsack, 2012). Se han descrito 10 helicasas que participan en la biogénesis de la subunidad 60S (**DBP2**, **DBP3**, **DBP6**, **DBP7**, **DBP9**, **DBP10**, **DRS1**, **MAK5**, **MTR4** y **SBP4**), 7 en la de la subunidad 40S (**DBP4**, **DBP8**, **DHR1**, **DHR2**, **FAL1**, **ROK1** y **RRP3**), y 2 en la de ambas subunidades (**HAS1** y **PRP43**) (Kressler *et al.*, 1998; Dembowski *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2013; Rodríguez-Galan *et al.*, 2013).

- Las **Chaperonas de ARN**, que facilitan el plegamiento y los reordenamientos estructurales de los ARNr maduros, como **NOP15** y **CIC1**. Además, las RP pueden actuar también como chaperonas al unirse y estabilizar la estructura secundaria y terciaria del ARNr (Kovacs *et al.*, 2009; Woodson, 2011). Las **chaperonas de ensamblaje de proteínas ribosómicas** se requieren para facilitar la asociación de algunas RP a los pre-ribosomas.

- Las **RLP** (*ribosomal like proteins*) corresponden a algunos factores de actuación en *trans* que poseen motivos de unión a ARNr muy similares a los de algunas RP y en algunos casos tienen ciertas secuencias de áa prácticamente idénticas a secuencias primarias de ciertas RP. Algunas RLP se unen a pre-partículas ribosómicas y las RP se encuentran solamente en las subunidades maduras, por lo que podrían ser marcadores de posición que impiden un ensamblaje prematuro de las RP en los pre-ribosomas, como es el caso de **IMP3** (Lee and Baserga, 1999), **MRT4** (Rodríguez-Mateos *et al.*, 2009), **RLP7** (Babiano *et al.*, 2013) y **RLP24** (Saveanu *et al.*, 2003), que poseen similitud con las RP S9, P0, L7 y L24, respectivamente.

- Las **GTPasas** y las **AAA-ATPasas** contribuyen a disociar y/o incorporar RP o factores de ensamblaje y en los reordenamientos estructurales de los pre-ribosomas antes de su transporte al citoplasma. Se han descrito en *S. cerevisiae* 3 AAA-ATPasas (**DRG1/AFG2**, **RIX7**, **REA1/MDN1**) (Kressler *et al.*, 2012) y 6 GTPasas (**BSM1**, **NOG1**, **NOG2/NUG2**, **NUG1**, **EFL1/RIA1**, **LSG1/KRE35**) (Saveanu *et al.*, 2001; Saveanu *et al.*, 2003).

- También participan en la biogénesis de los ribosomas varias **Quinasas y Fosfatasa**s.

- **Factores de transporte** necesarios para el tránsito intranuclear o para el transporte nucleo-citoplásmico.

3.2. Procesamiento de los precursores del ARN ribosómico

La síntesis de las subunidades 60S y 40S comienza en el nucléolo con la transcripción a partir de los ADNr del precursor primario **35S** por la ARN-Pol I, y del ARNr **5S** por la ARN-Pol III. En *S. cerevisiae*, el transcrito primario 35S es modificado covalentemente por los snoRNP y sufre una serie de cortes endo y exonucleolíticos hasta dar lugar a los ARNr maduros 25S, 5,8S, y 18S (Venema and Tollervey, 1995) (**Figura 14**).

La maduración del pre-ARNr **35S** comienza con la escisión en el sitio **B₀**, situado en la región 3'ETS, llevado a cabo por la endonucleasa **RNT1** (Kufel *et al.*, 1999). Después se producen sucesivamente los cortes tempranos en los sitios **A₀** y **A₁** generando los precursores **33S** y **32S**, respectivamente (Hughes and Ares, 1991; Beltrame *et al.*, 1994). A continuación, se

produce la escisión en el sitio **A₂** dentro del ITS1, generando los pre-ARNr **20S** y **27SA₂** (Udem and Warner, 1972).

El pre-ARNr **20S** es transportado a través del nucléolo y nucleoplasma y sale al citoplasma, donde ocurre el corte en el sitio **D** por la endonucleasa **NOB1**, que elimina la secuencia restante del ITS1, dando lugar al ARNr maduro **18S** (Udem and Warner, 1973; Fatica et al., 2003a).

La maduración del pre-ARNr **27SA₂** es más compleja, ya que su procesamiento continúa en el nucléolo y en el nucleoplasma por dos vías alternativas:

1. Aproximadamente en un 85-90 % de los pre-ARNr **27SA₂** se genera por el corte en **A₃** por la RNasa **MRP**, dando lugar al pre-ARNr **27SA₃** (Schmitt and Clayton, 1993; Chu et al., 1994; Lygerou et al., 1996). Seguidamente, el ITS1 restante se elimina del **27SA₃** por acción de las 5'-3'-exonucleasas **RAT1** y **RRP17**, que llevan a cabo la digestión del pre-ARNr hasta el sitio **B_{1S}**, formando el pre-ARNr **27SB_S** (Henry et al., 1994; Oeffinger et al., 2009).
2. El otro 10-15% de pre-ARNr **27SA₂** se procesa directamente en el sitio de **B_{1L}** por una endonucleasa aun desconocida que genera el pre-ARNr **27SB_L**.

En ambos casos, el extremo 3' se forma por digestión exonucleolítica del sitio **B₀** hasta **B₂**, llevada a cabo por **REX1**, y que se produce al mismo tiempo que el corte **B₁**.

A partir de los precursores **27SB_S** y **27SB_L**, la ruta de procesamiento es idéntica y sucede a lo largo del nucleoplasma y citoplasma. Se produce el corte en el sitio **C₂** en el ITS2, que genera los pre-ARNr **25,5S** y **7S_S** o **7S_L**. El extremo 5' del **25,5S** sufre una digestión exonucleolítica llevada a cabo por **RAT1** y **RRP17**, eliminando el fragmento del ITS2 restante y formando el ARNr maduro **25S** (Geerlings et al., 2000). Los extremos 3' de los pre-ARNr **7S** son procesados por el **exosoma** – un complejo formado por 11 componentes, 10 de los cuales funcionan como 3'→5' exoribonucleasas (Allmang et al., 1999) – y las exonucleasas **REX1** y **REX2** (van Hoof et al., 2000), y la nucleasa **NGL2** (Faber et al., 2002), dando lugar a los ARNr maduros **5,8S_S** y **5,8S_L**, que difieren en 6 nt a sus extremos 5' (Henry et al., 1994; Mitchell et al., 1996). Esta heterogeneidad del extremo 5' está conservada entre los eucariotas, aunque su función no está clara. Sin embargo, ambas formas son funcionales, ya que ambas están presentes en los polirribosomas (o polisomas).

Por otra parte, el transcrito primario del ARNr **5S** tiene una extensión en el extremo 3' de aproximadamente una decena de nucleótidos de la que carece el ARNr maduro, y que es procesado por la exonucleasas **REX1**, **REX2** y **REX3**.

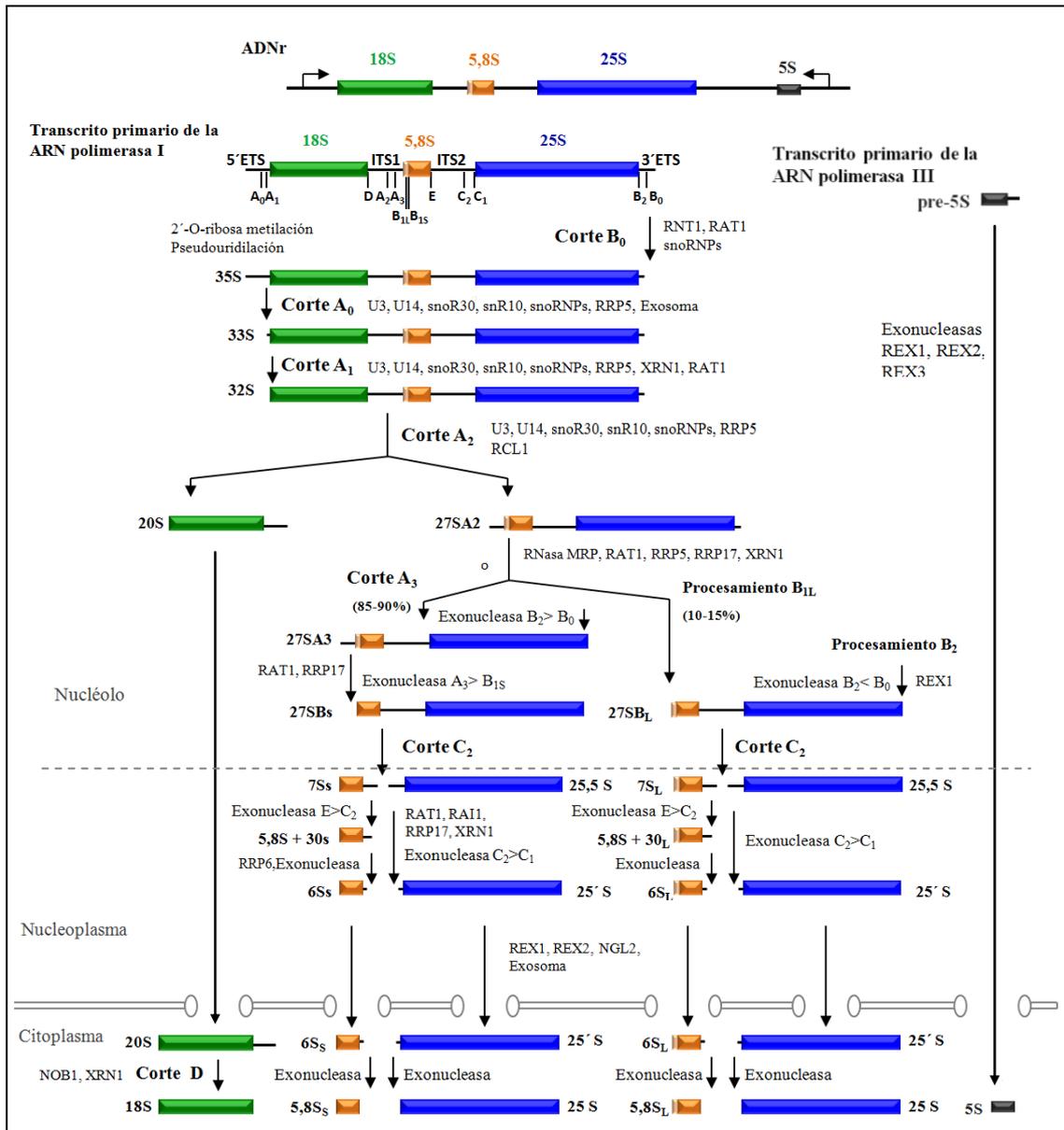


Figura 14. Esquema de la ruta de procesamiento de los precursores de los ARNr en *S. cerevisiae*. Se muestra la estructura del precursor del pre-ARNr 35S y la ubicación de los sitios de procesamiento. El pre-ARNr codifica los ARNr maduros 18S, 5,8S y 25S, que están flanqueados por los 5' y 3' espaciadores externos (5'-ETS y 3'-ETS) y separados por los espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2). El pre-ARNr transcrito por la ARN-Pol I se va procesando por cortes exo y endonucleolíticos post-transcripcionales (que se marcan con pequeñas flechas negras). El corte en el sitio A₂ separa los precursores de las subunidades 40S y 60S. Alternativamente, el precursor 35S puede procesarse co-transcripcionalmente en los sitios A₀, A₁ y A₂ en el procesoma del pre-ribosoma 43S. Este pre-ribosoma se exporta hasta el citoplasma, donde se completa la maduración del 20S dando lugar al ARNr 18S maduro. Por otro lado, el procesamiento del precursor 27SA₂ puede ocurrir de dos formas alternativas, un 85% se escinde en el sitio A₃ en el ITS2 y el 15% restante se procesa en el sitio B_{1L}. Por ambas vías los pre-ribosomas se van procesando endo y exonucleolíticamente, y los pre-ribosomas salen al citoplasma, donde ocurren los últimos pasos del procesamiento, dando lugar a los ARNr maduros 5,8S y 25S.

3.3. Ensamblaje de subunidades ribosómicas

a) Pre-partículas 90S:

Se ha caracterizado una partícula inicial que se forma en el nucléolo y que se denomina “pre-ribosoma 90S” que contiene el **pre-ARN 35S** así como la mayoría de las RP y factores de la subunidad 40S; Por el contrario, carece de la mayoría de los factores necesarios para la biosíntesis de 60S (Grandi *et al.*, 2002). Esta pre-partícula contiene el snoARN **U3** que, a pesar de pertenecer a la familia C/D box, no participa en la metilación del pre-ARNr, sino que se requiere para que se produzcan correctamente los cortes A₀, A₁ y A₂ y el plegamiento del pre-ARNr (Dutca *et al.*, 2011; Marmier-Gourrier *et al.*, 2011). También el pre-ribosoma 90S contiene 17 proteínas denominadas **UTP1-17**, que se requieren para la correcta transcripción del ADNr y para el procesamiento del pre-ARNr 35S (Gallagher *et al.*, 2004). A este conjunto de factores de ~2,2 MDa se les ha denominado “**procesoma de la subunidad pequeña**” (Dragon *et al.*, 2002; Grandi *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae*, el procesoma se compacta en una gran partícula que se forma al transcribirse el 35S en dirección 5' → 3' pocos segundos después de finalizar su transcripción, o se libera co-transcripcionalmente por escisión en el sitio A₂ en el ITS1 por la endonucleasa RCL1 (Osheim *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2011). De este modo, se producen el pre-ARNr 20S, que se empaqueta en **pre-partículas 43S** (también denominadas **pre-40S**), y el pre-ARNr 27SA₂, que forma parte de la **pre-partícula 66S** (o **pre-60S**). El ARN U3 y un gran número de factores se desensamblan; sin embargo, algunos de los factores que actúan en etapas medias o tardías de la biogénesis de las subunidades se asocian a este nivel en pre-partículas ribosómicas (Panse and Johnson, 2010; Strunk *et al.*, 2011) (**Figura 18**).

b) Pre-partículas 43S:

Las pre-partículas **43S** contienen el pre-ARNr **20S** y más de 75 factores no ribosómicos que se ensamblan de forma jerárquica (Perez-Fernandez *et al.*, 2007). Además del snoRNP U3 (requerido para los cortes tempranos) y la RNasa MRP (que realiza el corte en A₃), existen otros 3 snoRNP que intervienen en la producción del ARNr 18S: **U14** (familia C/D box), **snR10** y **snR30** (familia H/ACA). U14 y snR10 poseen una doble función, ya que actúan tanto en el procesamiento del pre-ARN como en su modificación (metilación o pseudouridilación, en cada caso) (Liang and Fournier, 1995; Morrissey and Tollervey, 1997); por el contrario, snR30 se requiere únicamente para la formación de la pre-partícula 43S (Lemay *et al.*, 2011; Hoareau-Aveilla *et al.*, 2012). Las partículas pre-43S son transportadas al citoplasma, donde ocurren los últimos pasos del procesamiento del pre-ARNr 20S a ARNr 18S y se genera la **subunidad madura 40S** (**Figura 18**).

c) Pre-partículas 66S:

El pre-ARNr **27SA2** se encuentra en las pre-partículas **66S** (Trapman *et al.*, 1975), y su maduración es más compleja que la de la pre-partícula 43S, ya que su procesamiento ocurre por dos vías alternativas (corte en el sitio A₃ o en B_{1L}). La maduración del pre-ribosoma 66S para generar subunidades 60S maduras ocurre en diferentes etapas (**Figura 18**): una etapa temprana, en la que se forma un complejo temprano estable tras la síntesis del precursor 27SA₂, hasta la formación de los pre-ARNr 27SA₃, 27SB_S o 27SB_L; una etapa intermedia, en la que ocurre el corte en el sitio C₂ y se elimina el ITS2 de los pre-ARNr, formándose los pre-ARNr 25,5S y 7S; y una etapa tardía, en la que actúan las exonucleasas y el exosoma en el extremo 5' del 25,5S y 3' del 7S, preparando a los pre-ribosomas para su salida al citoplasma, donde finaliza su biosíntesis y se forman las subunidades ribosómicas maduras.

Se ha descrito recientemente que en *S. cerevisiae* los dominios estructurales de la subunidad 60S se formarían en un orden jerárquico, ya que la asociación estable de las RPL comenzaría por las que se ubican en el exterior de las partículas maduras (zona del solvente), seguidas por aquellas que están alrededor del túnel de salida polipéptido, las de la zona de contacto entre subunidades y finalmente las de la protuberancia central (PC) (**Figura 15**). La ubicación de las RPL en la estructura de 60S se correlaciona también con sus funciones en el procesamiento de los pre-ARNr: las proteínas de ensamblaje temprano intervienen en los primeros pasos del procesamiento (27SA₂ y 27SA₃), las de ensamblaje medio intervienen en el procesamiento del pre-ARNr 27SB y las de ensamblaje tardío en las etapas finales del procesamiento (Gamalinda *et al.*, 2014).

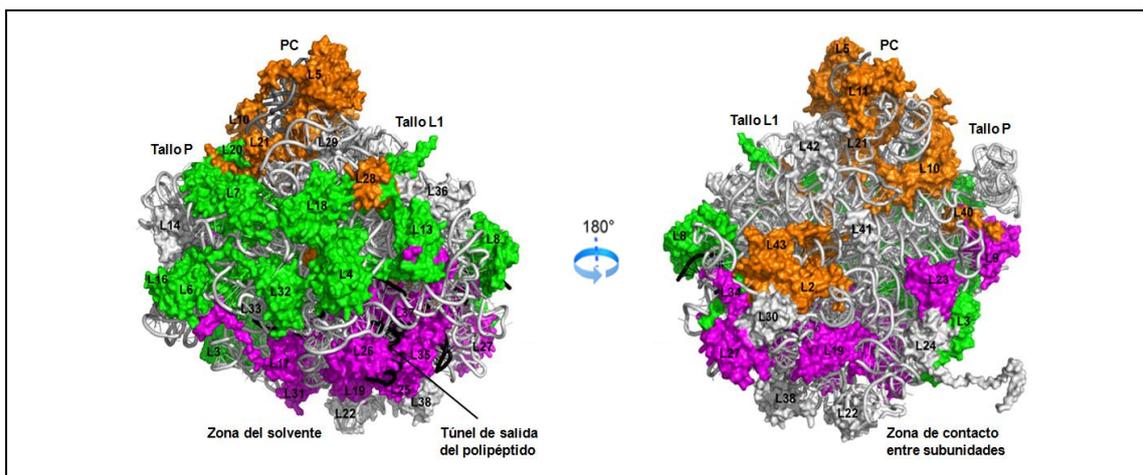


Figura 15. Localización de las RPL en la estructura de 60S y correlación con sus funciones en el procesamiento del pre-ARNr. Las RP que se ensamblan y actúan en los primeros pasos del procesamiento se representan en verde, las intermedias en magenta, y las tardías en naranja. Los ARNr 5,8S, 25S y 5S se representan en negro, gris claro y gris oscuro, respectivamente (Modificado de Gamalinda *et al.*, 2014).

- **Etapa temprana:**

En los pre-ribosomas **66S** existen, junto a los pre-ARNr 27SA₂ o 27SA₃, ~ 45-50 factores de ensamblaje, de los que 1/3 se desensamblan antes de que se procese el pre-ARNr 27SB (Kressler *et al.*, 2008). Otros factores se asocian entonces para catalizar la liberación de los factores tempranos, participar en el procesamiento de los subsiguientes pre-ARNr y/o facilitar el transporte nuclear (Nissan *et al.*, 2002; Ulbrich *et al.*, 2009). Entre los factores de ensamblaje tempranos están 6 ARN-helicadas, cuya función es reorganizar el ARNr o la estructura de las pre-partículas ribosómicas dando lugar a intermedios estables. Otras 7 de ellas, entre las que existen interacciones genéticas, podrían desempeñar funciones similares en el procesamiento de los pre-ARNr (de la Cruz *et al.*, 2004) (**Ver Tabla V de los Anexos**).

El **procesamiento del 27SA₃** genera el precursor 27SB y requiere **12** factores de ensamblaje denominados **Factores A₃** (**Tabla V de los Anexos**) (Sahasranaman *et al.*, 2011) (**Figura 16**). Algunos de ellos co-localizan en el ribosoma y podrían cooperar en funciones comunes (Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011). El ensamblaje de los Factores A₃ en los pre-ribosomas 66S se produce de forma jerárquica. EBP2 y L8 se requieren para el ensamblaje de **NOF7**, ERB1, YTM1, RLP7, NOP15 y CIC1 (Jakovljevic *et al.*, 2012; Shimoji *et al.*, 2012), siendo todos ellos interdependientes para su incorporación y necesarios para la asociación posterior de DRS1 y de HAS1 en las pre-partículas ribosómicas (Sahasranaman *et al.*, 2011; Dembowski *et al.*, 2013).

En esta etapa temprana del procesamiento se asocian a los diferentes dominios del ARNr varias **RPL tempranas** que participan o favorecen el mismo: L3, L4, L6, L7, L8, L13, L16, L18, L20, L32 y L33 (Gamalinda *et al.*, 2014).

- **Etapa intermedia:**

En el **procesamiento del pre-ARNr 27SB**, en el que se elimina el ITS2 de los pre-ARNr por el corte en C₂, se forman los pre-ARNr 25,5S y 7S. Para ello se requieren **14** factores de ensamblaje denominados **Factores B**, aunque ninguno de ellos se une al ITS2 directamente. Estos incluyen 5 proteínas de unión al ARNr (NIP7, RPF2, NSA2, RLP24 y TIF6), 4 ARN-Helicadas (SPB4, DRS1, HAS1 y DBP10), 2 GTPasas (NOG1 y **NOG2**), una proteína de andamiaje (MAK11), una ARN metil-transferasa (NOP2), y RRS1, de función desconocida; sin embargo, curiosamente, no se incluye ninguna nucleasa (Talkish *et al.*, 2012).

La mayoría de los Factores A₃ y los Factores B se ensamblan en los pre-ribosomas tempranos cuando aun contienen el pre-ARNr 27SA₂ (Saveanu *et al.*, 2003; Sahasranaman *et al.*, 2011; Talkish *et al.*, 2012). Sin embargo, NSA2 y **NOG2** se ensamblan más tarde, antes de

la escisión del ITS2 (Saveanu *et al* 2001; Lebreton *et al.* 2006a). La asociación de los Factores B se simplifica y facilita gracias a la formación de varios subcomplejos que se ensamblan secuencialmente en los pre-ribosomas a través de dos vías independientes en su mayoría, que parten de la formación de un heterodímero compuesto por NIP7 y NOP2 y convergen en NOG2 (Talkish *et al.* 2012). Estas dos vías están compuestas, por una parte, por el subcomplejo formado por RPF2, RRS1 y SPB4 junto con L5 y L11 y 5S rRNA, que se ensamblan en los pre-ribosomas en la protuberancia central (Zhang *et al.*, 2007); y por otra parte, RLP24, NOG1, y MAK11, que interaccionan físicamente (Saveanu *et al.*, 2003), junto con NOG1, TIF6, DPB10 y NSA2. Además, todos los factores B son necesarios para reclutar a **NOG2 (Figura 16)**.

En el procesamiento del pre-ARNr 27SB participan **RPL de ensamblaje intermedio**: L9, L17, **L19**, L23, L25, L26, L27, L31, L34, L35 y L37, y el ARNr 5S (Dechampesme *et al.*, 1999; Gamalinda *et al.*, 2014).

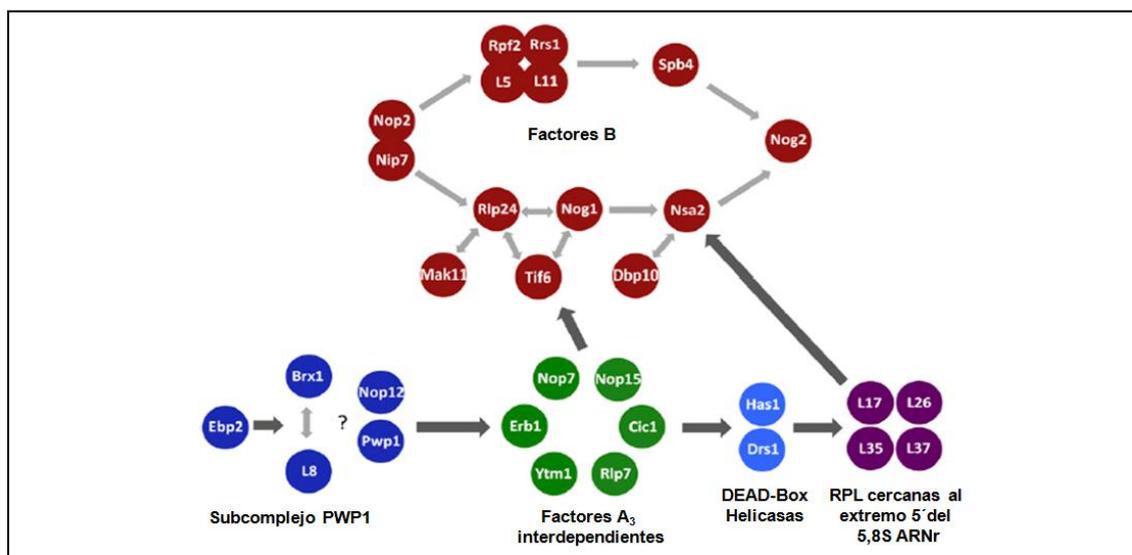


Figura 16. Esquema de la propuesta de asociación jerárquica de Factores A₃, Factores B y algunas RPL necesarias para las etapas iniciales e intermedias del ensamblaje de los pre-ribosomas 66S. Las proteínas que forman el subcomplejo PWP1 (en azul oscuro) intervienen en el procesamiento del pre-ARN 27SA₂ y 27SA₃ y son necesarias para la asociación estable de los Factores A₃ (en verde), que intervienen en el procesamiento del pre-ARNr 27SA₃. Estos a su vez son necesarios para el ensamblaje de las DEAD-box Helicasas (azul claro) y de las RPL L17, L26, L35 y L37 (en morado). Todos estos factores son requeridos además para la asociación estable de los Factores B (en granate), que ocurre por dos vías paralelas que convergen para reclutar a NOG2 (Adaptado de Woolford and Baserga, 2013).

- **Etapa tardía:**

Tras el corte endonucleolítico en el sitio C₂ del 27SB, continúa el procesamiento de los pre-ARNr **25,5S** y **7S**, dando lugar a los ARNr maduros **25S** y **5,8S** (Geerlings *et al.*, 2000).

El **procesamiento del pre-ARNr 25,5S a ARNr maduro 25S** ocurre rápidamente por las 5'→3' exonucleasas RAT1 y RRP17, y en su ausencia, por XRN1, aunque menos eficazmente (Geerlings *et al.*, 2000; Oeffinger *et al.*, 2009).

Por otra parte, el **procesamiento del pre-ARNr de 7S** requiere varias nucleasas y al menos cuatro etapas que se producen secuencialmente en el núcleo y citoplasma (Henry *et al.*, 1994; Thomson and Tollervey, 2005; Thomson and Tollervey, 2010). **i)** El exosoma, que incluye 3'→5' exonucleasas y endonucleasas, elimina ~110 nt desde el sitio C₂, produciendo un pre-ARNr 5,8S que se extiende en su extremo 3' en ~30 nt (Mitchell *et al.*, 1996; Allmang *et al.*, 1999). **ii)** El factor RRP6, un componente del exosoma específico del núcleo, elimina ~22-25nt del precursor anterior, dando lugar al pre-ARNr 6S (Briggs *et al.*, 1998). **iii)** El precursor 6S sale al citoplasma, donde las exonucleasas REX1 y REX2 siguen procesando el extremo 3' del pre-ARNr, excepto los últimos 5 nt (van Hoof *et al.*, 2000). **iv)** Los últimos nt del extremo 3' son procesados por NGL2, dando lugar al **ARNr maduro 5,8S** (Faber *et al.*, 2002).

Existen también **factores de ensamblaje tardíos** necesarios para el procesamiento del pre-ARNr 7S, entre los que se incluyen las AAA-ATPasas REA1, RIX, IPI1 e IPI3. REA1 además favorece la disociación de otros factores de actuación en pasos anteriores del procesamiento, como YTM1, RSA1, permitiendo la reorganización del pre-ribosoma para el acceso de las nucleasas que van a procesar el pre-ARNr 7S (Galani *et al.*, 2004).

En estas últimas etapas intervienen además las **RPL** L2 y L43 en el procesamiento del pre-ARNr 7S, y L5, L10, L11, L21, L28 y L40, en el procesamiento del pre-ARNr 6S y liberación de factores (Gamalinda *et al.*, 2014). Algunas de las RPL no se unen a los pre-ribosomas hasta las etapas finales, algunas de ellas ya en el citoplasma, como L10, L24, L29, L40, L42, P0, P1, y P2 (Saveanu *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2010).

3.4. Transporte núcleo-citoplasmático de subunidades pre-ribosómicas

Las subunidades ribosómicas pre-40S y pre-60S se transportan a través del nucléolo al núcleo, y del núcleo al citoplasma (**Figura 18**). En condiciones normales de crecimiento, se exporta un pre-ribosoma por cada poro nuclear cada 2-3 segundos (Warner 1999). Para este transporte son necesarios el receptor de salida nuclear CRM1, los factores de ensamblaje

RRP12 y SDA1, la RAN-GTPasa GSP1 y varias nucleoporinas (Hurt *et al.*, 1999; Moy and Silver, 1999; Oeffinger *et al.*, 2004).

En el transporte de los **pre-ribosomas 40S** intervienen los factores LTV1 y PNO1/DIM2, que actúan como adaptadores (Seiser *et al.*, 2006; Vanrobays *et al.*, 2008), y S15, que participa directamente en el transporte (Leger-Silvestre *et al.*, 2004).

En el transporte nucleo-citoplasmático de **pre-ribosomas 60S** participan al menos 5 proteínas (ARX1, BUD20, ECM1, MEX67 y NMD3) que se unen a diferentes sitios y actúan en conjunto. El receptor nuclear **ARX1** se une al túnel de salida del polipéptido en las subunidades pre-60S donde se ubican **L19**, L25, L26 y L35, y desempeña un papel regulador en la translocación núcleo-citoplasma de los pre-ribosomas 60S (Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008; Bradatsch *et al.*, 2012; Greber *et al.*, 2012). BUD20 se asocia a los pre-ribosomas 60S y facilita su salida al citoplasma (Bassler *et al.*, 2012). ECM1 se une físicamente a los pre-60S y a las nucleoporinas colaborando en el transporte (Yao *et al.*, 2010). MEX67/MRT2 se unen a los pre-ribosomas en la protuberancia central junto al ARNr 6S, y forman interacciones con las nucleoporinas para dirigir las pre-partículas 66S a través del poro nuclear (Yao *et al.*, 2007). NMD3 se une a la superficie de contacto del pre-ribosoma y actúa como un adaptador que dirige los pre-ribosomas al receptor CRM1 para el transporte (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001).

La unión de estos factores a los pre-ribosomas podría servir además como mecanismo de control o vigilancia de que la biosíntesis está ocurriendo correctamente, ya que hasta que no se unen los distintos factores de transporte a las subunidades no son transportadas al citoplasma.

3.5. Maduración final de las subunidades 60S y 40S en el citoplasma

En la etapa final deben completarse los últimos pasos del procesamiento del pre-ARNr y el ensamblaje de las últimas RP, además de la liberación y reciclaje de los diversos factores. Se ha descrito que en la **subunidad pre-60S**, los factores NMD3 y TIF6 están unidos en la superficie de contacto con 40S, y evitan la asociación de ambas subunidades (Gartmann *et al.*, 2010; Sengupta *et al.*, 2010). Del mismo modo, ARX1 podría prevenir la asociación de factores en el túnel de salida del polipéptido. Las NTPasas DRG1, EFL1 y LSG1 son necesarias para liberar y reciclar los factores de ensamblaje unidos a los pre-ribosomas aún en el citoplasma (Senger *et al.*, 2001; Kallstrom *et al.*, 2003; Hedges *et al.*, 2005; Pertschy *et al.*, 2007). Se ha descrito además que, cuanto faltan estas NTPasas, los primeros pasos del procesamiento del pre-ARNr están impedidos, posiblemente debido a que los factores de ensamblaje no se reciclen a tiempo para volver a ensamblarse en una nueva pre-partícula (Lo *et al.*, 2010).

La asociación a los pre-ribosomas de estos factores de disociación ocurre de manera secuencial y ordenada. Los primeros factores se unen, liberan sus proteínas diana y desencadenan la activación del siguiente factor, produciendo la separación del correspondiente sustrato. Concretamente, RLP24 se une a DRG1 y activa su actividad ATP-asa, catalizando el intercambio de RLP24 por la proteína L24 (Kappel *et al.*, 2012) a través de la interacción de DRG1 con la nucleoporina NUP116, necesaria para la liberación de RLP24. A continuación, L24 interacciona con REI1 y se asocia a los pre-ribosomas, junto con las ATPasas SSA1/SSA2 y su cofactor JJJ1, disociando a su vez a los factores de transporte ARX1 y ALB1 (Lebreton *et al.*, 2006b; Meyer *et al.*, 2007). Paralelamente, la proteína L12 recluta al factor YVH1, que cataliza la sustitución de MRT4 por la proteína P0 (Lo *et al.*, 2009), formándose así el tallo ribosómico, que atrae además las GTPasas necesarias para la biogénesis de la subunidad 60S, incluida EFL1, que junto con el factor SDO1, producen la liberación del factor TIF6 (Senger *et al.*, 2001). Este paso está acoplado a la etapa final de la maduración, donde ocurre la disociación de NMD3 por la GTPasa LSG1 (Kallstrom *et al.*, 2003; Hedges *et al.*, 2005).

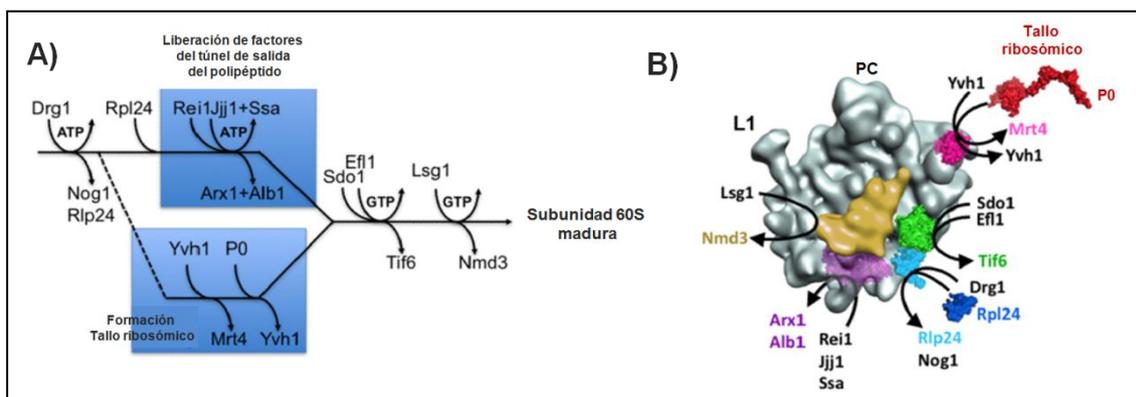


Figura 17. Asociación y liberación de factores para la maduración citoplasmática de la subunidad 60S. **A)** Esquema de la asociación secuencial y ordenada de los diferentes factores de liberación para la maduración de la subunidad 60S. **B)** Representación del reciclaje de los factores sobre la pre-partícula 60S vista desde la zona de contacto con la subunidad 40S. (Modificado de Lo *et al.*, 2010).

Por otra parte, las **partículas pre-40S** en el citoplasma carecen aún de las RPS S10 y S26 y contienen 7 factores de ensamblaje (Strunk *et al.*, 2011), que impiden a las subunidades pre-40S asociarse al ARNm y a las subunidades 60S para el inicio de la traducción. Así, los factores de ensamblaje TSR1, RIO2 y DIM1 están en la interfaz de la subunidad pre-40S y solapan en los sitios de unión de los factores de inicio de la traducción eIF1, eIF1A y eIF2-ARNt^{iMet}, respectivamente. Las proteínas PNO1/DIM2 se superponen en el sitio de unión del factor eIF3, y LTV1 y ENP1 pueden prevenir los reordenamientos prematuros de la subunidad para el reclutamiento del ARNm durante la iniciación de la traducción. Además, LTV1/ENP1 ocupan el sitio de unión de la proteína S10, y PNO1/DIM2 el sitio de unión de S26, por lo que

hasta que no se produce la liberación citoplasmática de estos factores, no se asocian las proteínas S10 y S26, dando lugar a la maduración final de la subunidad 40S (Karbstein, 2011; Karbstein, 2013).

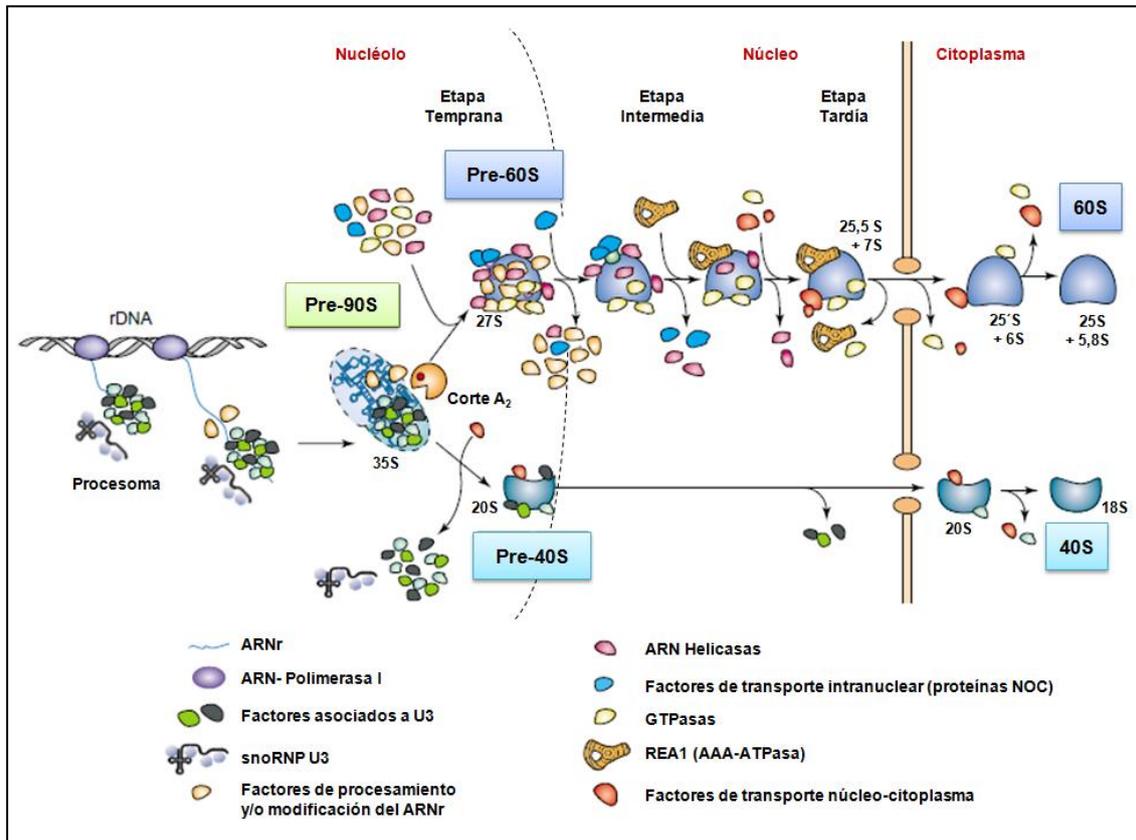


Figura 18. Representación esquemática de la maduración y transporte de las subunidades ribosómicas 60S y 40S en *S. cerevisiae*. La partícula temprana pre-90S está formada por el pre-ARNr 35S y el procesosoma compuesto por U3 y los demás factores asociados. Tras la escisión del pre-ARNr 35S en el sitio A₂, la partícula 90S se divide en 2, pre-40S y pre-60S. En la partícula pre-40S, el procesosoma se disocia, pero otros factores se unen para facilitar su transporte al citoplasma. En pre-60S, la mayoría de los factores se asocian durante o tras el corte en A₂. A medida que se van procesando las pre-partículas, muchos de los factores de ensamblaje se van disociando, quedando tan sólo unos cuantos asociados hasta las etapas finales del procesamiento. La maduración final de ambas subunidades ocurre en el citoplasma (Modificado de Tschochner and Hurt, 2003).

En la **Tabla V de los Anexos** se resumen las principales características de algunos de los factores que participan en el ensamblaje y procesamiento de las subunidades 40S y 60S.

3.6. Degradación de precursores aberrantes de los ARNr

Durante la biogénesis de ribosomas pueden formarse ribosomas aberrantes con RP o ARNr alterados provocando variaciones de la estructura y/o de la funcionalidad del ribosoma. Sin embargo, existen mecanismos de vigilancia que detectan errores graves no tolerables y pueden actuar co-transcripcionalmente (Wery *et al.*, 2009).

Los precursores de ARNr que se han procesado o ensamblado erróneamente son degradados por el **exosoma**, un complejo formado por diferentes exonucleasas, entre las que se encuentran REX1 y REX2, y la nucleasa NGL2 (Allmang *et al.*, 2000; van Hoof *et al.*, 2000; Faber *et al.*, 2002). El **complejo TRAMP** (compuesto por las poly(A)-polimerasas TRF4 o TRF5, por la ARN-Helicasa MRT4 y las proteínas de unión AIR1 o AIR2), añade de 4 a 6 residuos de adenina en el extremo 3' de estos pre-ARNr, formando un mejor sustrato accesible para las exonucleasas, promoviendo así la degradación de los pre-ARNr aberrantes (LaCava *et al.*, 2005; Houseley and Tollervey, 2006).

3.7. Regulación de la biogénesis de ribosomas

La biogénesis de ribosomas conlleva un gran gasto energético, por lo que ha de estar regulado estrechamente, entre otros, por la disponibilidad de nutrientes (Warner, 1999). Este proceso es sensible a cambios en las condiciones ambientales y a diferentes condiciones de estrés (Bergkessel *et al.*, 2011). En mamíferos se ha descrito que el ritmo circadiano regula la traducción de los ARNm de proteínas ribosómicas y del ARNr, por lo que desempeña un papel fundamental en la biogénesis de ribosomas (Jouffe *et al.*, 2013).

La **escasez de nutrientes y/o de la fuente de nitrógeno** en el medio, activa la ruta de la quinasa TOR (Target of Rapamycin), que regula la transcripción de los genes que codifican las proteínas ribosómicas. Además, TOR puede ser inhibida tanto por la privación de nutrientes como por el inmunosupresor rapamicina (Kennedy and Kaerberlein, 2009; Spriggs *et al.*, 2010). Cuando esto ocurre, se da una fuerte y rápida disminución de la transcripción de todos los genes implicados en la biogénesis de ribosomas, debida a una inhibición general de las ARN-Pol I, II y III (Powers and Walter, 1999), además un aumento en el reciclaje de los ribosomas ya existentes en la célula (Pestov and Shcherbik, 2012).

Cuando las células detectan cambios en la **disponibilidad de carbono o nitrógeno** en el medio, se activa la ruta RAS-AMP cíclico-proteína quinasa A, cuyo resultado sería la inhibición coordinada de la transcripción de los genes que codifican las RP y de la de los ARNr.

La **carencia** intracelular de algún **aminoácido**, desencadena una serie de eventos que conducen a la desrepresión de la traducción de *GCN4* (Ver más adelante), que actúa en este caso como inhibidor de la transcripción de los genes que codifican las RP, probablemente de manera indirecta (Hinnebusch and Natarajan, 2002; Pleiss *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2011).

Cuando las células se someten a **alta temperatura**, se produce la represión de los genes que codifican las RP, disminuyendo las cantidades de sus ARNm durante ~30 min y recuperándose los niveles normales al cabo de 1h (Warner and Gorenstein, 1977; Warner, 1999; Miyoshi *et al.*, 2003). Además, a elevadas temperaturas, se reprime la síntesis de proteínas al producirse un enlentecimiento de la elongación de la traducción (Shalgi *et al.*, 2013).

Los niveles y estabilidad de los pre-ARNm de las RP, así como su traducción, disminuyen también en situaciones de **estrés osmótico**. Sin embargo, los niveles normales de transcripción pueden recuperarse tras el cese de dicho estrés (Bergkessel *et al.*, 2011; Garre *et al.*, 2013).

Más de 200 genes muestran respuestas transcripcionales prácticamente idénticas a las de los genes de las RP en las situaciones descritas anteriormente (Gasch *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2003). La mayoría de ellos codifican productos esenciales para la biogénesis de ribosomas, por lo que se les ha denominado regulón Ribi (*Ribosome biogenesis*) (Jorgensen *et al.*, 2004).

4. TRADUCCIÓN

Los ribosomas maduros 80S, junto con los ARNt y un elevado número de factores, constituyen la maquinaria traduccional, encargada de traducir la información genética contenida en los ARNm para sintetizar las proteínas que llevan a cabo las funciones biológicas especificadas por cada gen.

La síntesis de proteínas se divide en tres fases: Iniciación, Elongación y Terminación. En cada una de ellas intervienen factores solubles específicos. Así, en células eucariotas, los implicados en la primera etapa se conocen como eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*), los que participan en la elongación son eEFs (*eukaryotic Elongation Factors*), y los que actúan en la última etapa durante la terminación son eRFs (*eukaryotic Release Factors*).

4.1. Inicio de la traducción en *S. cerevisiae*

La iniciación de la traducción es la etapa de la síntesis de proteínas en la que intervienen la mayoría de mecanismos reguladores en todos los organismos, lo que permite un control rápido y reversible de la expresión génica (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.*, 2010). Esta etapa se puede dividir en 3 pasos: **i)** Formación del complejo ternario (CT) compuesto por $\text{ARNt}_i^{\text{Met}} \cdot \text{eIF2} \cdot \text{GTP}$, y su asociación junto a eIFs a la subunidad 40S, formando el complejo de pre-iniciación (PIC) 43S. **ii)** Unión de este complejo al ARNm, formando el complejo 48S, y localización del codón de inicio de la traducción AUG. **iii)** Unión de la subunidad ribosómica 60S, formando el ribosoma 80S (**Figura 19**).

En cada uno de estos pasos intervienen hasta 13 eIFs, que interaccionan entre sí, con el ARNm, con el ARNt y con los ribosomas (Dever, 2002; Jackson *et al.*, 2010; Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012). En la **Tabla 2** se enumeran los eIFs, así como la función que desempeñan.

a) Formación del complejo de pre-iniciación 43S:

La unión del $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ a la subunidad ribosómica 40S requiere la formación previa de un complejo ternario (CT) constituido por el propio $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$, el factor de iniciación eIF2 y GTP. El $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ es transferido al sitio P de la subunidad 40S, a través de un complejo multifactorial (CMF) formado por eIF1, eIF2, eIF3 y eIF5 (Asano *et al.*, 2000). Los factores eIF1, eIF1A y eIF3 promueven la unión del CT junto con los demás eIFs a la subunidad 40S, constituyendo el PIC 43S (Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012; Hinnebusch, 2014).

b) Unión al ARNm y scanning:

El complejo de pre-iniciación 43S se une al ARNm, formando el complejo de pre-iniciación 48S, a través de sus interacciones con el complejo de unión al cap eIF4, con ayuda de eIF3 (LeFebvre *et al.*, 2006). El factor eIF4E se une directamente al cap (metil-7-guanosina 5'-trifosfato), presente en la mayoría de los ARNm celulares y, a través de interacciones con el extremo N-terminal de eIF4G, recluta el complejo de unión al cap eIF4F, heterotrímero formado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A (Rajagopal *et al.*, 2012). El factor eIF4A es una ARN-Helicasa dependiente de ATP, que elimina estructuras secundarias próximas al extremo 5' del ARNm, ayudada por eIF4B. eIF4G funciona a su vez como proteína de andamiaje, uniéndose a eIF4E y eIF4A, e interactúa con la proteína de unión a colas de poli (A) de los extremos 3' de los ARNm (PAB1) (Park *et al.*, 2011). Interacciones simultáneas entre eIF4E, eIF4G y PAB1 darán lugar al acercamiento entre los extremos 5' y 3'UTR del ARNm y, por tanto, a la circularización estable del ARNm (Wells *et al.*, 1998).

Una vez unido al ARNm, el PIC 43S comienza el rastreo de la región líder del ARNm (*scanning*) en dirección 3' en busca del codón AUG en un contexto favorable para el inicio de la traducción (contexto *Kozak* en mamíferos, y secuencia AA(A/G)-AUG en levaduras) (Kozak, 1989; Chen *et al.*, 2008). El reconocimiento de este AUG depende del emparejamiento con el anticodón del ARNt^{Met} y de los factores eIF1, eIF1A, eIF2 y eIF5 (Algire and Lorsch, 2006; Saini *et al.*, 2010). Los factores eIF1 y eIF1A promueven una conformación en la que el ARNt se une a la subunidad 40S en una posición en la que se favorece la búsqueda del AUG correcto, denominada **P_{OUT}** (Passmore *et al.*, 2007; Hinnebusch, 2014).

c) Reconocimiento del AUG:

Durante el *scanning*, en un proceso estimulado por eIF5, una proteína activadora de la actividad GTPasa de eIF2, se produce la hidrólisis de la molécula de GTP unida a eIF2. Cuando el codón de iniciación correcto es localizado, eIF1 se desplaza del sitio P y el fosfato inorgánico (Pi) se libera (Algire *et al.*, 2005) y se disocia el complejo binario inactivo (eIF2·GDP), probablemente en complejo con eIF5 (Singh *et al.*, 2006), dejando el ARNt^{Met} depositado en el sitio P en una conformación estable denominada **P_{IN}**, en la que las bases del anticodón quedan apareadas con el AUG del ARNm (Hinnebusch, 2014).

d) Unión de la subunidad 60S:

La unión de la subunidad 60S a los PIC 43S es catalizada por la GTPasa FUN12/eIF5B (Kuhle and Ficner, 2014), que provoca la hidrólisis de otra molécula de GTP y la disociación de eIF5B y eIF1A, que dejan libre el sitio A para el primer ARNt de elongación, formándose así el complejo de iniciación (IC) 80S que inicia la elongación (Acker *et al.*, 2006; Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.*, 2010; Hinnebusch, 2011; Hinnebusch, 2014).

Para que el CT pueda formarse de nuevo, es necesaria la sustitución del GDP del complejo binario inactivo por una molécula de GTP. El factor eIF2B es quien realiza el reciclaje de eIF2-GDP a la forma activa eIF2-GTP, que ya puede generar el CT dando lugar así a otra nueva ronda de inicio de la traducción. Sin embargo, este intercambio de GDP a GTP es impedido por la fosforilación del factor eIF2 α , disminuyendo la cantidad de CT en diferentes situaciones que inhiben la iniciación, como la carencia de aminoácidos. El intercambio de nucleótidos de guanina llevado a cabo por eIF2B es un punto clave en la regulación del inicio la traducción muy conservado en eucariotas.

FACTOR DE INICIACIÓN EN <i>S. cerevisiae</i>	FUNCIÓN
eIF1	Fidelidad en el reconocimiento del codón AUG. Además, promueve el <i>scanning</i> y el reclutamiento del CT al ribosoma
eIF1A	Facilita la unión del ARNt _i ^{Met} a la subunidad 40S y coopera con eIF1 en la selección del codón de inicio de la traducción
eIF2	GTPasa que junto al ARNt _i ^{Met} y a GTP, forman el CT que se une a la subunidad 40S. Interviene en la selección del codón de inicio de la traducción
eIF2B	Factor intercambiador de nt de guanina para pasar de GDP a GTP en eIF2
eIF3	Promueve la unión del ARNt _i ^{Met} a la subunidad 40S y de ésta al ARNm, la reiniciación y el reconocimiento del AUG
eIF4A	Helicasa de la familia DEAD-box
eIF4B	Promueve la actividad helicasa de eIF4A
eIF4E	Proteína de unión al extremo 5' - m ⁷ GpppX de la estructura "cap" del ARNm
eIF4F	Complejo de unión al "cap" formado por los eIFs 4A, 4E y 4G; desenrolla la región 5' del ARNm y media la unión al complejo 43S
eIF4G	Proteína adaptadora que interacciona con eIF3, eIF4A, eIF4E, PABP y con el ARNm y promueve la actividad helicasa de eIF4A
eIF5	Reconocimiento del AUG y promueve la actividad GTPasa de eIF2
eIF5B	GTPasa que participa en la unión de las subunidades 40S y 60S

Tabla 2. Factores de inicio de la traducción y funciones que desempeñan en *S. cerevisiae*.

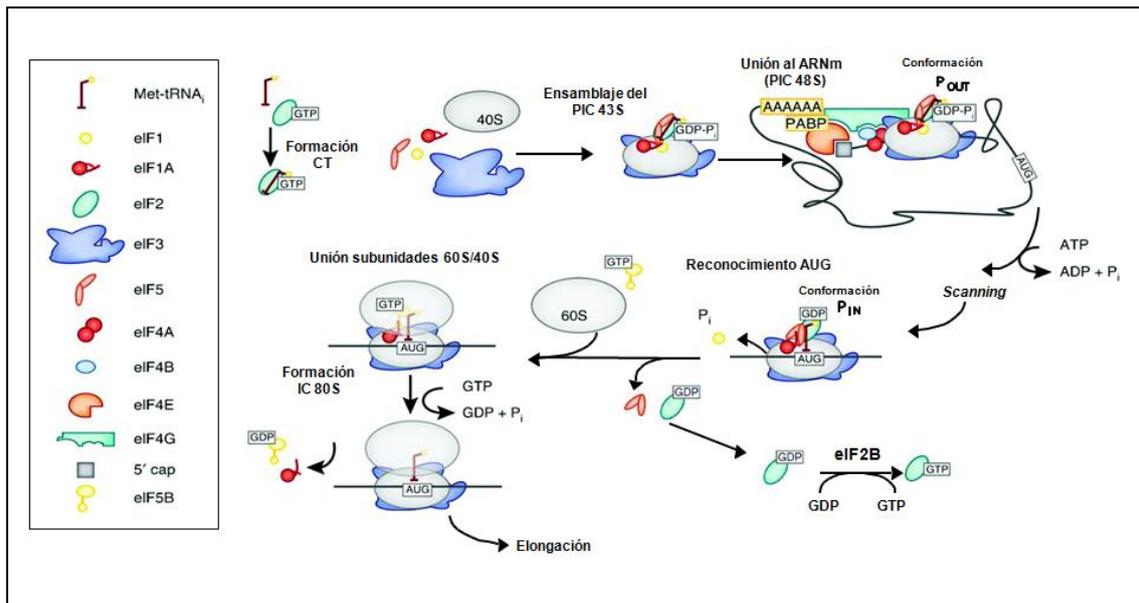


Figura 19. Modelo de la vía canónica de iniciación de la traducción en eucariotas por rastreo o *scanning* del ARNm de la traducción. La vía comienza con el reclutamiento del CT a la subunidad 40S con la ayuda de los eIF1, 1A, 3 y 5 para la formación del PIC 43S. El PIC 43S se asocia entonces al ARNm activo cerca del extremo 5', y comienza el *scanning* del ARNm (en conformación P_{OUT}) y el GTP se hidroliza en el CT. Al reconocer el AUG correcto (cambio a conformación P_{IN}), se disocia eIF1 y se libera el P_i de eIF2. Se une la subunidad 60S con la ayuda de la GTPasa eIF5B, que posteriormente se libera junto con eIF1A, formando el complejo de iniciación 80S. El complejo binario inactivo eIF2-GDP se recicla a eIF2-GTP gracias al factor eIF2B (Modificado de Aitken and Lorsch, 2012).

4.2. Elongación de la traducción en *S. cerevisiae*

La elongación es el proceso mediante el cual se va formando la cadena polipeptídica que compondrá la proteína codificada por cada ARNm. Se divide en 3 etapas: (i) Unión del ARNt cargado con el aminoácido correspondiente en el sitio A del ribosoma, (ii) formación del enlace peptídico, y (iii) translocación del péptido creciente al sitio P (Wintermeyer *et al.*, 2004). Durante la elongación intervienen además 2 factores (abreviados como eEF): **eEF1**, compuesto por las subunidades α y $\beta\gamma$, y **eEF2**.

Una vez formado el complejo de iniciación 80S, el factor de elongación eEF1 α se une al segundo aminoacil-ARNt por un mecanismo dependiente de GTP, y lo descarga en el sitio A del ribosoma. A continuación, eEF1 $\beta\gamma$ produce el cambio de GDP a GTP en la subunidad α para su liberación y reciclaje (Miyazaki *et al.*, 1988). Se forma el primer enlace peptídico en el centro peptidil-transferasa de la subunidad 60S, comenzando la fase de elongación de la síntesis de proteínas (para revisión, ver Dever and Green, 2012). La interacción del ARNt con el ARNm en el sitio A de la subunidad 40S (centro descodificador) determinará si el ARNt entrante es el

correcto. Seguidamente, se produce la translocación, produciéndose el movimiento del ribosoma 80S sobre la hebra de ARNm en dirección 3', quedando libre el sitio A para recibir un nuevo ARNt cargado, ocupando el sitio P el péptido en formación. El ARNt descargado de aminoácido sale por el sitio E.

Esta translocación del ribosoma viene dada por la rotación de la subunidad 40S sobre la subunidad 60S, mediada por un cambio de conformación del factor eEF2 mediante la hidrólisis de GTP (Taylor *et al.*, 2007), conocida también como *ratcheting* (Zhang *et al.*, 2009; Sulima *et al.*, 2014). Durante este movimiento, muchos puentes entre ambas subunidades deben reorganizarse localmente o romperse temporalmente. Aunque las funciones de los nuevos puentes eucarióticos son desconocidas hasta la fecha, se propone, para aquellos que se encuentran en la parte inferior de la subunidad 40S, un papel en el suministro de la fuerza de recuperación para contrarrestar el movimiento de rotación (Chandramouli *et al.*, 2008).

4.3. Terminación de la traducción en *S. cerevisiae*

Cuando el ribosoma reconoce uno de los tres codones sin sentido o de parada (UAA, UAG, UGA) que indican el final de la ORF codificada en el mensajero, se produce la liberación de la cadena peptídica por hidrólisis del enlace con el ARNt, que es catalizada por 2 factores de terminación eRFs: **eRF1** y **eRF3** (Zhouravleva *et al.*, 1995; Inge-Vechtomov *et al.*, 2003), finalizando así la traducción.

Tras reconocer el codón de parada, los factores eRF1 y eRF3, formado un complejo junto a GTP, se unen al sitio A del ribosoma. Se produce la hidrólisis del GTP, y eRF3 se libera. Después, el factor ABCE1 (RLI1 en levaduras) facilitan la unión de eRF1 en una conformación activa óptima, que favorece la hidrólisis del péptido formado para su liberación. Una vez terminada la traducción, los distintos componentes deben ser reciclados. Este reciclaje es llevado a cabo por la ATPasa RLI1 (Pisarev *et al.*, 2010; Barthelme *et al.*, 2011), que interactúa con el ribosoma y, por hidrólisis de ATP, produce movimientos mecánicos para separar las subunidades, que se disocian del ARNm y se liberan tanto el ARNt descargado como el factor eRF1, quedando disponibles para un nuevo ciclo de traducción (para revisión, ver Dever and Green, 2012).

4.4. Regulación traduccional en *S. cerevisiae*

En condiciones adversas como la carencia a aminoácidos, el estrés oxidativo, térmico o proteotóxico, se produce una inhibición de la síntesis de proteínas (Ashe *et al.*, 2000; Shenton *et*

al., 2006; Spriggs *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Shalgi *et al.*, 2013). En esas situaciones se produce la fosforilación de **eIF2** en la serina 51 de la subunidad α , reduciendo la actividad de eIF2B para el reciclaje de eIF2·GDP a eIF2·GTP, por lo que disminuye la cinética de formación del CT y, por tanto, de la síntesis de proteínas. En *S. cerevisiae*, existe una sola proteína-quinasa de eIF2 α conocida, **GCN2**, que es quien lleva a cabo esta fosforilación cuando las células carecen de algún aminoácido o purina (Dever *et al.*, 1992; Hinnebusch, 1994), o con limitación de glucosa (Ashe *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). En mamíferos se han identificado varias quinasas de eIF2 α , que se activan por diferentes señales y condiciones de estrés: HRI acopla la síntesis de hemoglobina a la disponibilidad de hierro (Chen and London, 1995), PERK se activa en respuesta a la alta concentración de proteínas sin plegar en el retículo endoplásmico (Harding *et al.*, 1999), PKR se induce por interferón o por ARN de doble cadena; y la ortóloga de GCN2 en mamíferos desempeña una función importante en regulación traduccional (Sood *et al.*, 2000) y en inducción de la expresión génica cuando la disponibilidad de aminoácidos es limitada (Harding *et al.*, 2000).

Además, la privación de aminoácidos (mutaciones que afectan a la ruta, desequilibrios en la composición de aminoácidos en los medios de cultivo), purinas, la limitación de glucosa o las condiciones de alta salinidad, entre otros, inducen la síntesis de **GCN4** (Hinnebusch and Natarajan, 2002; Pleiss *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2011), un regulador transcripcional de al menos 539 genes – 1/10 del genoma de levadura – de los que ~77 codifican enzimas en las distintas rutas de biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1984; Rolfes and Hinnebusch, 1993; Jia *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Natarajan *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2011). GCN4 es el elemento central del Control General de la Biosíntesis de Aminoácidos (CGBA) en *S. cerevisiae*, y promueve la transcripción de los genes bajo su control mediante su unión, en forma de dímero, a las regiones promotoras de los mismos en secuencias específicas de ADN (UAS_{GCRE}), que se encuentran a una distancia de entre -20 y -600 nucleótidos del codón de inicio de la traducción (Hinnebusch and Fink, 1983; Hinnebusch, 1984; Natarajan *et al.*, 2001). En otros casos la secuencia consenso se localiza en la región 3' UTR, existiendo también la posibilidad de que GCN4 regule la expresión de algunos de genes diana a través de otros factores de transcripción (Natarajan *et al.*, 2001).

4.5. Regulación traduccional de *GCN4*

La expresión de *GCN4* está regulada traduccionalmente en función de la disponibilidad de aminoácidos, por un mecanismo de “**reiniciación de la traducción**” que depende de 4 fases de lectura cortas (uORFs 1-4, del inglés *upstream open reading frames*) en la región líder del ARNm de *GCN4* y por una serie de efectores positivos (GCN) y negativos (GCD).

Las 4 fases de lectura abierta (**uORFs**), de 3 ó 4 codones codificantes cada una, son elementos reguladores en *cis* situados entre -150 y -360 nucleótidos en posición 5' con respecto al codón de iniciación de *GCN4*. La eliminación de estas 4 uORFs por delección (Hinnebusch, 1984) o por mutaciones puntuales en sus codones de iniciación (Mueller and Hinnebusch, 1986) provoca la síntesis de *GCN4* constitutivamente, tanto en condiciones normales como de carencia de aminoácidos. Por lo tanto las 4 uORFs inhiben la traducción de *GCN4*. Sin embargo, no todas ellas contribuyen del mismo modo a la regulación, ya que la primera y cuarta fases de lectura (uORF1 y uORF4) desde el extremo 5' del mensajero son suficientes para la regulación y tienen diferentes efectos. La presencia de la uORF4 en solitario tiene un efecto negativo, ya que se reduce la expresión de *GCN4* al 1%, debido a que la mayoría de los ribosomas se disocian de su mensajero tras traducirla, de modo que no llegan hasta el AUG de *GCN4* (Miller and Hinnebusch, 1989). Por el contrario, la uORF1 tiene un efecto positivo sobre la reiniciación, ya que el 50% de subunidades ribosómicas permanecen asociadas al ARNm de *GCN4* después de traducirla. El efecto de la uORF2 es similar al de la uORF1, y el de la uORF3 semejante a la de uORF4, aunque sus efectos positivos o negativos, respectivamente, sobre la regulación de *GCN4*, son menores que el de las uORF 1 y 4. También las secuencias próximas a las uORFs y la distancia entre la uORF4 y el AUG de *GCN4* son críticos para la regulación de su traducción. (Hinnebusch, 1984; Mueller and Hinnebusch, 1986) (**Figura 20**).

La regulación traduccional de *GCN4* también depende de una serie de efectores que actúan en *trans*, denominados **GCN** y **GCD** (Hinnebusch, 1985; Harashima and Hinnebusch, 1986). Estos factores se han identificado mediante el análisis genético de mutantes con alteraciones la síntesis de *GCN4*. Según el fenotipo que causan, se pueden agrupar en dos clases:

1) Mutaciones recesivas en genes *GCN* (*General Control Non-derepressible*) producen represión constitutiva de *GCN4*, inhibiendo la desrepresión traduccional de *GCN4* que tiene lugar en una cepa silvestre en condiciones de carencia de aminoácidos; es decir, la traducción de *GCN4* es muy baja, o basal, en mutantes *gcn* en todas las condiciones. Este fenotipo, denominado **Gcn⁻**, indica que los genes *GCN* codifican reguladores positivos de la expresión de *GCN4* (Hinnebusch, 1988). La incapacidad de mutantes *gcn* para desreprimir el CGBA, hace que sean más sensibles que las cepas silvestres a diversos compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos, como el 3-aminotriazol (3-AT), un inhibidor de la biosíntesis de histidina (Hinnebusch and Fink, 1983).

2) Mutaciones en genes *GCD* (*General Control Derepressed*) causan desrepresión de *GCN4* dando lugar a altos niveles de expresión constitutiva y, por tanto, de transcripción de los genes regulados por el CGBA. El estudio de mutantes con fenotipo **Gcd⁻** permitió identificar a los productos de los genes *GCD* como reguladores negativos de la síntesis de *GCN4*, ya que

reprimen su traducción en condiciones de suficiencia de aminoácidos (Hinnebusch, 1985; Harashima and Hinnebusch, 1986; Mueller *et al.*, 1987). Los mutantes **Gcd⁻**, al contrario de los **Gcn⁻**, son resistentes a compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos, gracias a la cantidad de GCN4 que sintetizan constitutivamente.

Además, las mutaciones *gcd* suprimen la represión constitutiva de *GCN4* debida a mutaciones *gcn*, indicando que las funciones de los genes *GCD* son posteriores a las de los *GCN* en la regulación traduccional de *GCN4* (Hinnebusch and Fink, 1983; Harashima and Hinnebusch, 1986; Hinnebusch 1992; Hinnebusch 1996). Sin embargo, ninguna de las mutaciones *gcd* suprime mutaciones o la delección de *GCN4*, indicando que son anteriores a la cascada de regulación, e indicando genéticamente que GCN4 era el factor directo de la respuesta del CGBA.

Por tanto, la carencia de alguno o varios aminoácidos induce la expresión de los genes *GCN*, cuyos productos anulan el efecto negativo de los factores *GCD* y de las 4 uORFs sobre la traducción de *GCN4*. En la **Tabla VI de los Anexos** se muestran los principales genes *GCN* y *GCD* identificados hasta la fecha, así como la función que desempeñan las proteínas que codifican.

El modelo para explicar la regulación traduccional de *GCN4* propone que en condiciones de **suficiencia de aminoácidos (Figura 20 A)**, los ribosomas se unen a la secuencia líder del ARNm de *GCN4* traduciendo la primera fase de lectura abierta (uORF1). Aproximadamente el 50% de ellos continúan asociados al ARNm en forma de subunidades 40S y reinician el rastreo cadena abajo a lo largo del líder (Abastado *et al.*, 1991). La mutagénesis de la región líder del ARNm de *GCN4* revela que diversas secuencias ricas en AU en las inmediaciones 3' de la uORF1 podrían promover altos niveles de reiniciación por los ribosomas 40S que permanecen unidos al ARNm (Grant and Hinnebusch, 1994). En condiciones de suficiencia de aminoácidos, la cinética de reciclaje de eIF2 a su forma activa (eIF2·GTP) y de síntesis del complejo ternario proceden normalmente en la célula, por lo que las subunidades 40S adquieren “a tiempo” el CT para reiniciar la traducción en alguno de los restantes uORFs (uORF2, 3 y 4), y esto impide que un alto porcentaje de ellos alcance el codón de iniciación de *GCN4*, ya que la traducción la cuarta fase de lectura abierta determina que la mayoría de los ribosomas se disocien del mRNA. Parece que la presencia de secuencias relativamente ricas en GC en torno al extremo 3' de la uORF4 es determinante para este efecto (Grant and Hinnebusch, 1994). En consecuencia, la traducción de *GCN4* está reprimida en condiciones de suficiencia de aminoácidos, en las que existen en la célula niveles basales del factor de transcripción GCN4.

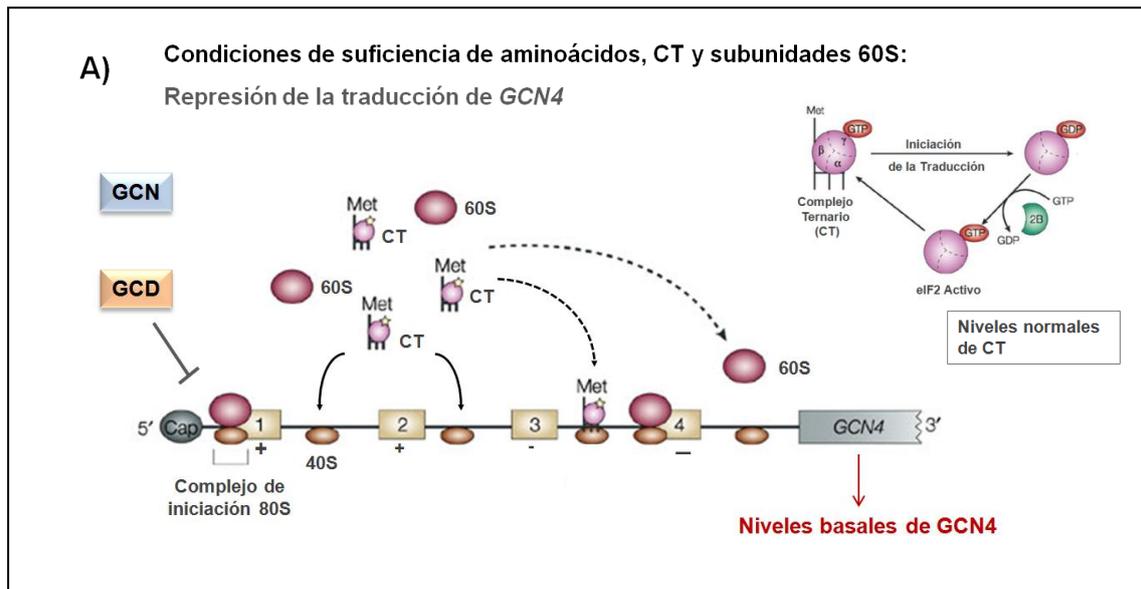
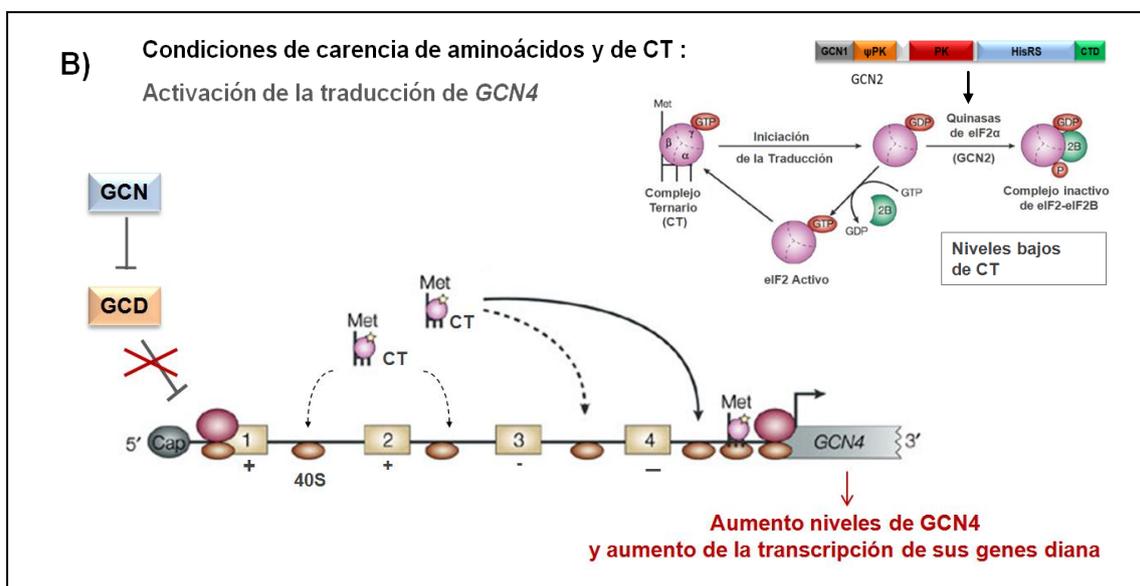


Figura 20. Mecanismo de regulación de la traducción del ARNm *GCN4* (Modificado de Gebauer and Hentze, 2004). El ARNm de *GCN4* posee 4 fases de lectura en su secuencia líder que regulan su traducción (las uORFs 1 y 2 tienen un efecto positivo y la 3 y 4 negativo sobre la traducción de *GCN4*), junto con una serie de efectores positivos (GCN) y negativos (GCD). **A)** En condiciones de suficiencia de aminoácidos, las cantidades de CT son normales y se produce la reiniciación de la traducción con elevada frecuencia después de la traducción de las uORFs 1 y 2 (flecha continua) debido a un aumento de la probabilidad de “recargar” las subunidades 40S que permanecen unidas a la hebra de ARNm con CT activos. Al traducir las uORFs 3 y 4 las subunidades se disocian y la *GCN4* se traduce a niveles basales.

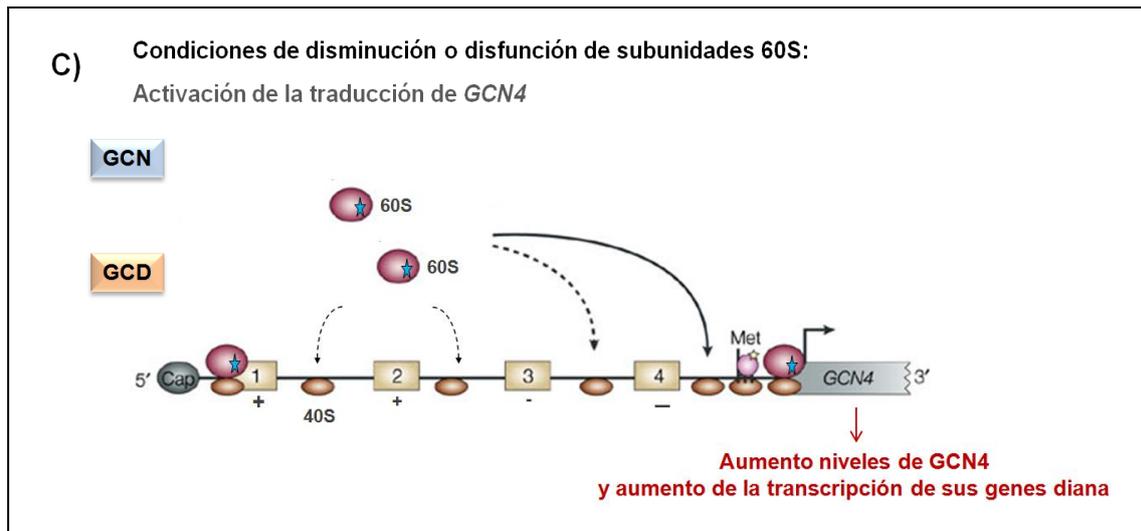
En cambio, en situaciones de **carencia de aminoácidos (Figura 20 B)** las altas concentraciones de ARNt descargados estimulan la actividad quinasa GCN2. Ésta tiene varias regiones estructurales bien diferenciadas: en su extremo N-terminal (NTD) presenta un dominio de unión a GCN1, seguido de un dominio pseudo-quinasa (ψ PK), un dominio con actividad proteína-quinasa (PK) (Wek *et al.*, 1989), y un dominio de unión al ARNt (histidil-ARNt-sintetasa, HisRS) situado el extremo carboxi-terminal (CTD) (**Figura 20**). La unión de ARNt no aminoacilados al dominio HisRS provoca un cambio en la conformación de GCN2, donde ψ PK interacciona directamente con los sitios efectores de PK, activando como respuesta su actividad quinasa, que produce la fosforilación de eIF2 α (Lageix *et al.*, 2014). Este extremo CTD se requiere además para la dimerización de GCN2 necesaria para su funcionalidad (Wek *et al.*, 1989). En este proceso intervienen otros 2 reguladores positivos de *GCN4*, denominados GCN1 y GCN20 (Vazquez de Aldana *et al.*, 1995; Garcia-Barrio *et al.*, 2000; Garcia-Barrio *et al.*, 2002; Sattlegger and Hinnebusch, 2005). El complejo GCN1-GCN20 facilitaría la unión del ARNt descargado al sitio A del ribosoma, o su transferencia desde el sitio A al dominio HisRS de GCN2, para su activación (Hinnebusch and Natarajan, 2002; Hinnebusch, 2005).

Cuando hay insuficiencia de algún aminoácido, la cinética de formación del complejo ternario eIF2.GTP.tRNA^{Met} se hace más lenta, como consecuencia de la fosforilación de eIF2 por GCN2. Según el modelo actual de la regulación traduccional de *GCN4*, los ribosomas que han traducido la primera fase de lectura de su secuencia líder no adquieren complejo ternario a tiempo para leer las otras uORFs y continúan el rastreo hacia el AUG auténtico de *GCN4* en un proceso que se ha denominado *leaky scanning* (Abastado *et al.*, 1991). El modelo se basa en que habría tiempo y espacio para que se forme suficiente CT cuando alcanzan el AUG de *GCN4*, traduciéndolo (Dever *et al.*, 1992). De este modo, mientras que la fosforilación de eIF2 α inhibe la síntesis general de proteínas, favorece específicamente la traducción de *GCN4*, que activa la transcripción de múltiples genes de las diferentes rutas de biosíntesis de aminoácidos.



Continuación Figura 20. Mecanismo de regulación de la traducción del ARNm *GCN4* (Modificado de Gebauer and Hentze, 2004). **B)** En situaciones de carencia de aminoácidos, GCN2 fosforila a eIF2 α , disminuyendo la cinética de formación de CT, por lo que es poco probable que ocurra la reiniciación tras la traducción de las uORFs 1 y 2. Entonces, una mayor cantidad de subunidades 40S alcanzarán el AUG de la uORF de *GCN4*, aumentando su síntesis.

Además de por la disponibilidad de aminoácidos y de CT, *GCN4* puede estar regulado por la **disponibilidad de subunidades 60S** en la célula, así como por la formación del ribosoma 80S. Aunque en la célula exista suficiente cantidad de CT, cuando la disponibilidad de subunidades 60S está reducida o estas son disfuncionales, no se adquieren subunidades 60S “a tiempo” para traducir la uORF4, por lo que el complejo de pre-iniciación 43S no se disocia de la hebra de ARNm y continúa el rastreo, alcanzando la ORF de *GCN4*, pudiendo unir subunidades 60S y favoreciendo así su traducción (**Figura 20 C**) (Foianni *et al.*, 1991; Martin-Marcos *et al.*, 2007).



Continuación Figura 20. Mecanismo de regulación de la traducción del ARNm *GCN4* (Modificado de Gebauer and Hentze, 2004). C) Cuando existe una disfunción o disminución de subunidades 60S por retraso de su síntesis, su disponibilidad-reciclaje o su funcionalidad, tras traducir los ribosomas 80S la uORF1 y disociarse las subunidades 60S y 40S, numerosas 40S (~50%) continuarían unidas al ARNm y sólo algunas unirían a tiempo subunidades 60S, empezando la traducción en alguna del resto de las uORF; sin embargo, otras subunidades 40S que no hubieran unido una 60S a tiempo en esas uORFs continuarían recorriendo el ARNm, favoreciéndose la adquisición de una 60S a tiempo para la traducción en el AUG de *GCN4* (fenotipo *Gcd⁻*).

En células de **mamíferos** se ha descrito una vía de señalización equivalente al CGBA de levaduras (Harding *et al.*, 2000). Además de regular la síntesis de proteínas, las quinasas de eIF2 de mamíferos participan en la regulación de la expresión génica transcripcional en respuesta al estrés, por un mecanismo traduccional relacionado con el de *GCN4*. En respuesta a una alta concentración de proteínas sin plegar en el retículo endoplásmico y a privación de aminoácidos se inducen respectivamente las quinasas PERK y GCN2, reprimiéndose la traducción de mensajeros, pero se activa la del ARNm de *ATF4* (“Activating Transcription Factor 4”). *ATF4* es un factor de transcripción que activa la expresión del gen *CHOP /GAD153*, entre otros (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). *CHOP* a su vez codifica otro factor de transcripción de un conjunto de genes inducibles por estrés que parecen estar implicados en la muerte celular programada y regeneración de órganos (Zinszner *et al.*, 1998; Sok *et al.*, 1999). Los uORFs de la secuencia líder de *ATF4* están conservados evolutivamente y median la represión de su expresión basal así como la activación traduccional. Además, la presencia de uORFs es frecuente en genes con funciones biológicas críticas como dos tercios de los oncogenes y muchos otros genes implicados en el control del crecimiento y la diferenciación celular (Morris and Geballe, 2000; Spriggs *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2013; Wethmar, 2014).

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO



El interés del grupo en el que se ha realizado esta investigación es identificar nuevas funciones biológicas esenciales para la iniciación de la traducción eucariótica o su regulación.

Por las características peculiares de su secuencia líder, la traducción del ARNm *GCN4* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es exquisitamente sensible a mutaciones espontáneas que alteran componentes esenciales de la maquinaria traduccional o factores que intervienen en la regulación de la iniciación. Sin embargo, este tipo de mutaciones pueden afectar más o menos profundamente, o incluso no afectar detectablemente, a la traducción global de los ARN mensajeros, por lo que la regulación traduccional de *GCN4* proporciona un sensor ideal para identificar factores que intervienen o regulan la traducción en eucariotas, y para analizar cuantitativamente los efectos de mutaciones que los alteran.

La caracterización de mutantes espontáneos *gcd* de *S.cerevisiae* en los que la traducción del ARNm *GCN4* está desreprimida constitutivamente, permitió a nuestro grupo identificar nuevos genes *GCD* que codifican proteínas esenciales para la iniciación de la traducción y están conservadas evolutivamente, de levaduras a humanos. *GCD17* codifica la proteína esencial L33A componente de la subunidad 60S. L33A se requiere para la maduración de los precursores de los ARN ribosómicos y la biogénesis de la subunidad 60S, y para la unión de las subunidades 60S y 40S en el paso final del inicio de la traducción (Martin-Marcos *et al.*, 2007). La ejecución de este trabajo atrajo el interés del grupo a realizar estudios funcional de otras proteínas ribosómicas, algunos de los cuales están en curso en el laboratorio.

El ribosoma eucariótico ha adquirido un renovado interés debido al creciente número de evidencias experimentales que avalan su participación en la regulación de la traducción. Las estructuras de alta resolución del ribosoma de *S. cerevisiae* y de otros organismos eucariotas publicadas recientemente permiten predecir interacciones nuevas entre sus componentes, cuyo significado funcional se desconoce, entre proteínas ribosómicas eucarióticas y nuevos segmentos de expansión del ARNr, y de nuevos puentes entre subunidades, como el que establece la proteína ribosómica L19e.

Para poder investigar los determinantes estructurales y las funciones de L19e era necesario disponer de mutantes de pérdida parcial de función. La obtención de versiones mutantes de L19e en *S. cerevisiae* que se incorporen en subunidades 60S permitiría investigar los defectos fenotípicos que causan las respectivas mutaciones en el procesamiento de los precursores de los ARNr y la maduración y transporte de las partículas ribosómicas 60S, en la traducción global de los ARN mensajeros y en la regulación traduccional del ARNm *GCN4*, y correlacionarlas con las interacciones a las que afectan en la estructura del ribosoma 80S.

OBJETIVOS

El **objetivo** de este trabajo es desvelar las funciones primarias de la proteína ribosómica eucariótica L19e en la biogénesis de ribosomas y en la traducción.

La investigación se ha realizado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo modelo para el que se han desarrollado numerosas técnicas y abundante metodología con las que generar mutantes y explorar alteraciones moleculares en los dos procesos indicados. Dada la conservación evolutiva de las proteínas ribosómicas, algunos resultados serán extrapolables a otros organismos eucariotas.

Los **objetivos concretos** son:

- 1) Generación de mutaciones de pérdida parcial de función de L19e
- 2) Selección y análisis fenotípico de mutantes viables *rpl19*
- 3) Análisis de los defectos en la biogénesis de ribosomas en mutantes *rpl19*
- 4) Análisis de los defectos traduccionales en mutantes *rpl19*

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

GENERACIÓN DE MUTACIONES DE PÉRDIDA PARCIAL DE FUNCIÓN DE L19e

En *S. cerevisiae*, 59 de las 79 proteínas del ribosoma citoplasmático 80S están codificadas por dos genes parálogos, designados como “A” y “B”, que se han retenido tras la duplicación ancestral del genoma en esta levadura (Simoff et al., 2009). Algunos genes *RPG* codifican proteínas parálogas que se diferencian en algunos residuos aminoacídicos, y otras proteínas idénticas, con similar o idéntica función biológica en el ribosoma. Sin embargo, los genes parálogos tienen secuencias flanqueantes e intrones diferentes, por lo que su expresión puede estar regulada diferencialmente en determinadas situaciones fisiológicas o ambientales.

Cepas “*pseudo-haploinsuficientes*” son cepas haploides de *S. cerevisiae* que carecen de uno de los dos genes *RPG* parálogos, A o B. La reducción de dosis de RP esencial causa fenotipos de crecimiento lento más o menos acusados (*slg*, *slow growth*), y afecta a algunos procesos biológicos diferencialmente dependiendo del gen parálogo delecionado (Komili et al., 2007; Parenteau et al., 2011).

Cuando no se ensambla a tiempo una RP esencial para la viabilidad celular, se interrumpe la ruta de procesamiento de pre-ARNr y el ensamblaje de las subunidades ribosómicas 60S y/o 40S. Una fracción de la población total de pre-ribosomas no contiene una dotación completa de RP y es degradada finalmente por el exosoma (Allmang et al., 2000). Estudios sistemáticos de mutantes pseudo-haploinsuficientes de la mayoría de las RP de *S. cerevisiae* han desvelado en qué momento de la biogénesis de las pre-partículas ribosómicas se requiere la incorporación de cada una de ellas (Ferreira-Cerca et al., 2007; Poll et al., 2009). Para determinar las funciones específicas de las RP eucarióticas es necesario disponer de versiones alteradas que se incorporen en ribosomas y caracterizar los fenotipos de los mutantes correspondientes.

El primer **objetivo** del trabajo consistió en obtener **mutantes hipomórficos** de pérdida parcial de función de L19e, componente esencial de la subunidad 60S del ribosoma eucariota. Para ello, se realizó mutagénesis al azar y dirigida en uno de los dos genes parálogos que la codifican en *S. cerevisiae*, *RPL19B*. La pérdida parcial de función indicada por fenotipos *slg* nos ha permitido seleccionar positivamente *in vivo* ese tipo de mutantes como se describe a continuación.

a) Clonación de los genes parálogos *RPL19A* y *RPL19B* de *S. cerevisiae*:

El gen *RPL19B* de *S. cerevisiae* se amplificó mediante PCR de alta fidelidad usando como molde ADN genómico de la cepa Y07156 ($\Delta rpl19a::KanMX4$, *RPL19B*) y los oligonucleótidos *F1L19B-SalI* y *R1L19B-SacII* (**Tabla III de los Anexos**). Se amplificó un fragmento de ADN de 1929 bp que contiene el gen completo *RPL19B*, y contiene la fase de lectura abierta (ORF) de 570 bp, un intrón de 384 bp y 2 secuencias flanqueantes de 471 bp en 5' y de 504 bp en 3'. El

gen se clonó en los vectores centroméricos pRS316 (*CEN6 URA3*) y pRS315 (*CEN6 LEU2*) (Sikorski and Hieter, 1989), dando lugar respectivamente a los plásmidos **pAJ1** y **pAJ2** (Figura 21).

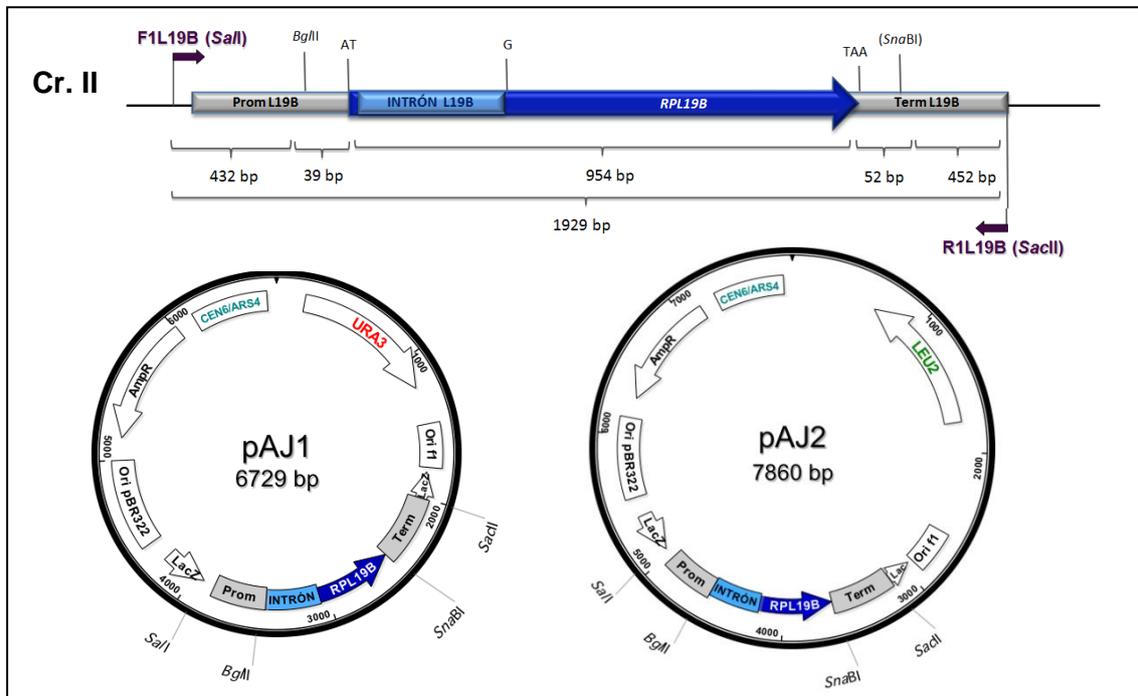


Figura 21. Representación esquemática de la región del Cromosoma II donde se ubica el locus *RPL19B* de *S. cerevisiae* y de la estructura de los plásmidos centroméricos, pAJ1 y pAJ2, en los que se subclonó.

El intrón del gen *RPL19B* (384 bp) representa $\sim 1/3$ de la secuencia génica de *RPL19B* (954 bp). Nuestro objetivo se centró en generar mutaciones en la ORF que afectasen a la secuencia de aminoácidos y/o a la estructura de la proteína L19e, es decir, mutaciones somáticas que no afectasen (potencialmente) a la regulación de su expresión, o al menos, no se ubicasen en secuencias que pueden contribuir claramente a la regulación de la expresión del gen. Por ello, se amplificó un alelo de *RPL19B* carente de intrón (*RPL19B_{Δi}*), usando como molde la secuencia de *RPL19B* clonada en pAJ1 y como cebadores los oligonucleótidos *F1L19B* (*Clon-Int*) y *R1L19B* (*Clon-Int*) (Tabla III de los Anexos). El alelo *RPL19B_{Δi}* se subclonó en los vectores pRS316 y pRS315, obteniéndose respectivamente los plásmidos **pAJ3** y **pAJ4** (Figura 22). El alelo *RPL19B_{Δi}* clonado se secuenció para verificar la ausencia de potenciales mutaciones generadas durante la PCR o la subclonación (Materiales y Métodos).

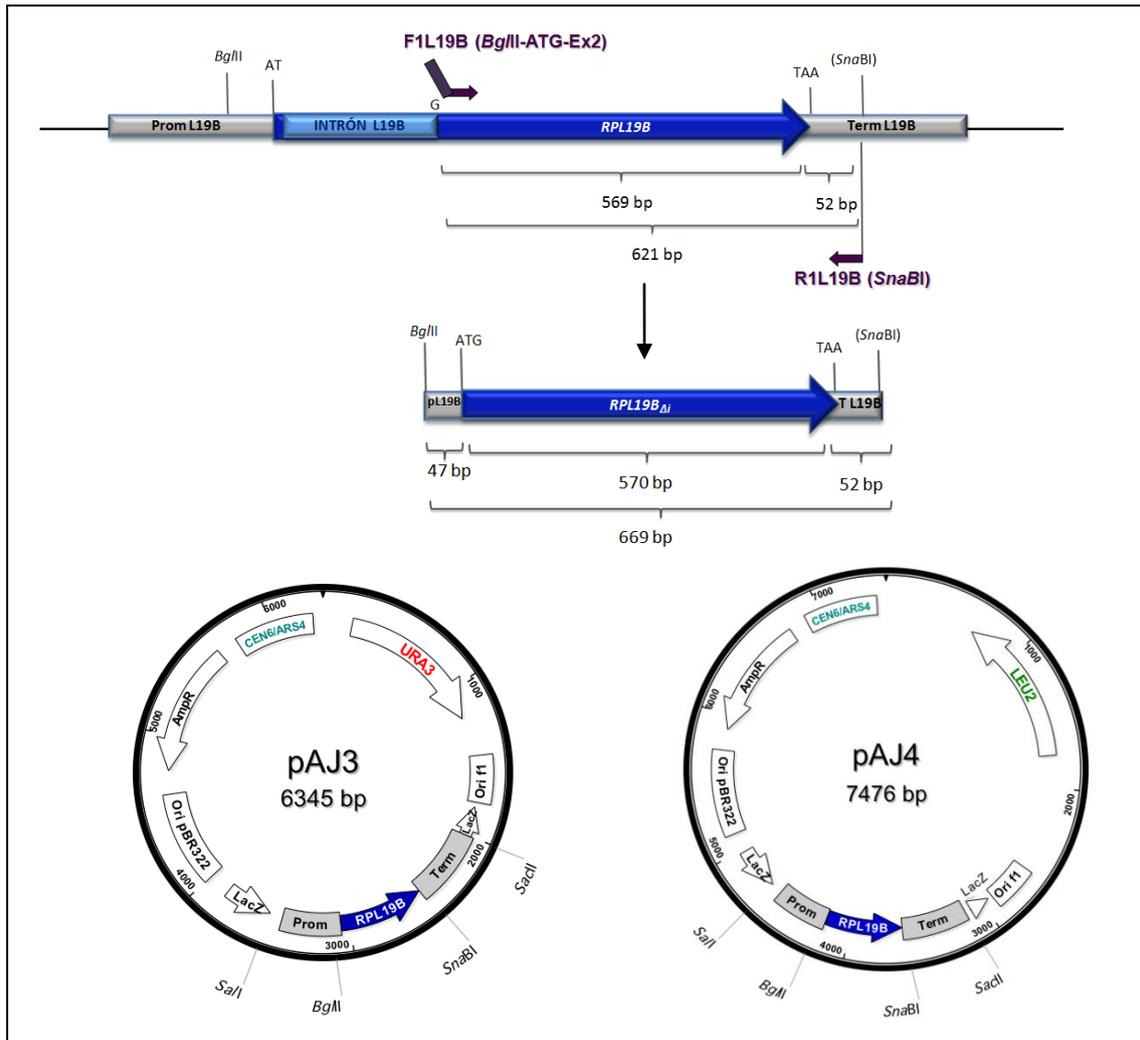


Figura 22. Representación esquemática de la amplificación de un alelo sin intrón *RPL19B_{Δi}* y, debajo, la estructura de los plásmidos pAJ3 y pAJ4 en los que se subclonó.

Se amplificó también el gen *RPL19A* de *S. cerevisiae* por PCR de alta fidelidad usando como molde ADN genómico de la cepa Y03053 ($\Delta rpl19b::KanMX4$, *RPL19A*) y como cebadores los oligonucleótidos *FIL19A-Bam*HI y *RIL19A-Spe*I (Tabla III de los Anexos), y se clonó en los vectores pRS316 y pRS315 obteniéndose los plásmidos pAJ8 y pAJ9, respectivamente (Materiales y Métodos).

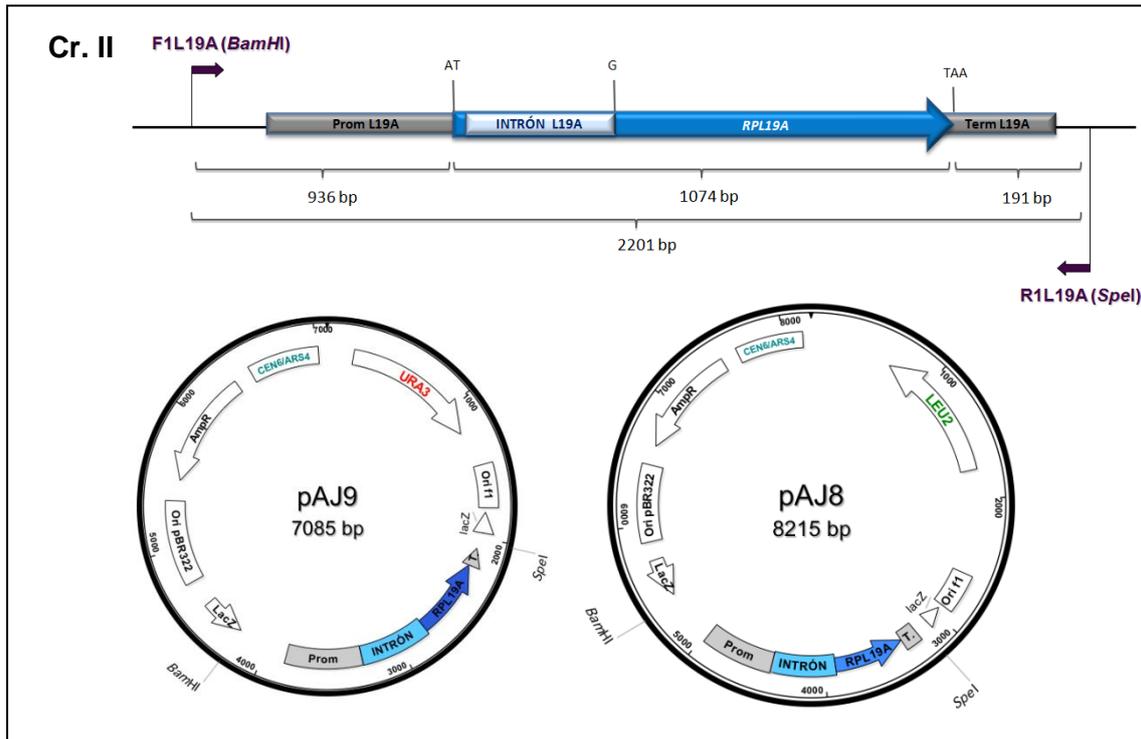


Figura 23. Representación esquemática de la región del Cromosoma II donde se ubica el locus *RPL19A* de *S. cerevisiae* y, debajo, la de la estructura de los plásmidos pAJ8 y pAJ9 en los que se subclonó (*Bam*HI/*Spe*I).

b) Construcción de cepas de *S.cerevisiae* adecuadas para la selección de mutantes pLOF de L19e:

a) **TY1099** es una cepa haploide de *S. cerevisiae* con deleciones en el genoma de los genes parálogos *RPL19A* y *RPL19B* e isogénica a la cepa BY4741 (Euroscarf) (Poll *et al.*, 2009). La viabilidad de esta cepa depende del plásmido episómico **TK884**, que contiene el alelo condicional *pGAL::RPL19B_{Δi}* [*CEN4*, *LEU2*], por lo que la cepa crece exclusivamente en medios con galactosa como fuente de carbono, ya que la expresión de dicho alelo se regula a través del promotor *GAL1-GAL10* (TK884 fue proporcionado por el Dr. P. Milkereit, Universidad de Regensburg, Alemania).

b) La cepa **TY1099** ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 LEU2*]) se transformó con plásmidos portadores de uno de los dos genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B* clonados en vectores centroméricos con el marcador *URA3*. Se seleccionaron clones transformantes de levadura protótrofos de uracilo y auxótrofos de leucina, que hubiesen perdido el plásmido TK884. De esta forma, se obtuvieron clones capaces de crecer en medios con glucosa como única fuente de carbono, que mantienen únicamente un plásmido con el marcador *URA3* y

expresan sólo uno de los dos parálogos *RPL19A* o *RPL19B*, en ambos casos, flanqueados por sus secuencias naturales adyacentes, las promotoras de la transcripción en 5' y las de terminación de la transcripción y traducción en 3'. La funcionalidad de estos alelos se comprobó mediante en ensayos de complementación del fenotipo de crecimiento lento *slg* que causan las mutaciones de delección sencilla de cada parálogo (Véase **Figura 24**).

Se obtuvieron así para el trabajo posterior dos juegos de cepas isogénicas de *S.cerevisiae* en el fondo genético de la doble delección $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ (TY1099), que expresan un único alelo funcional de *RPL19A* o *RPL19B*, regulados por sus propios y respectivos promotores, y clonados en vectores centroméricos de bajo número de copias (*URA3* o *LEU2*) (**Tabla 3**).

c) Además, en la cepa TY1099, se reemplazó el plásmido TK884 [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *LEU2*] por el plásmido TK891 [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *URA3*], obteniéndose **Hm670** ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *URA3*]).

CEPAS ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$)	GENOTIPO RELEVANTE
Hm 566	<i>RPL19B</i> (<i>CEN6 URA3</i>)
Hm 567	<i>RPL19B</i> (<i>CEN6 LEU2</i>)
Hm 568	<i>RPL19B_{Δi}</i> (<i>CEN6 URA3</i>)
Hm 569	<i>RPL19B_{Δi}</i> (<i>CEN6 LEU2</i>)
Hm 570	<i>RPL19B</i> (<i>CEN6 URA3</i>), <i>RPL19A</i> (<i>CEN6 LEU2</i>)
Hm 571	<i>RPL19A</i> (<i>CEN6 LEU2</i>)
Hm 572	<i>RPL19A</i> (<i>CEN6 URA3</i>)
Hm 670	<i>pGAL::RPL19B_{Δi}</i> (<i>CEN4 URA3</i>)

Tabla 3. Cepas isogénicas de *S. cerevisiae* construidas en este trabajo.

1. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE LEVADURA CONSTRUIDAS

Una reducción de la dosis o de la funcionalidad de *L19e* se manifestará por una reducción en el tamaño de las colonias que desarrolla la correspondiente cepa mutante a cualquier temperatura *slg*, que puede exacerbarse si función no es suficiente para soportar una traducción y cinética de división celular más rápida a alta temperatura (37°C). El fenotipo *slg* más exacerbado a temperaturas bajas (ej. 18°C), o fenotipo de sensibilidad al frío (*cs*), se observa frecuentemente en mutantes afectados en el ensamblaje de complejos macromoleculares que

conllevar un gran gasto energético, en este caso, el ensamblaje de las partículas ribosómicas (Warner, 1999; Warner *et al.*, 2001).

El tamaño de las colonias individuales de cada cepa en placas de YEPD (resumidas en la **Tabla 3**) se analizó comparativamente tras incubarlas a diferentes temperaturas (18°C, 28°C y 37°C) durante los días que se indican en la **Figura 24**. Como se puede observar, tanto las colonias que desarrollan las células de la cepa Hm566 [*RPL19B*, *CEN6 URA3*] como las de Hm568 [*RPL19B Δ i*, *CEN6 URA3*] tienen a todas las temperaturas ensayadas un tamaño muy similar, lo que sugiere que la delección del intrón no reduce significativamente la expresión del gen *RPL19B*. El tamaño de colonia que desarrollan es también similar al de colonias de la cepa en la que se expresan las dos proteínas parálogas desde dos plásmidos centroméricos, Hm570 [*RPL19B*, *CEN6 URA3*; *RPL19A*, *CEN6 LEU2*] o al de la cepa Hm572, en la que se expresa sólo el alelo de *RPL19A*.

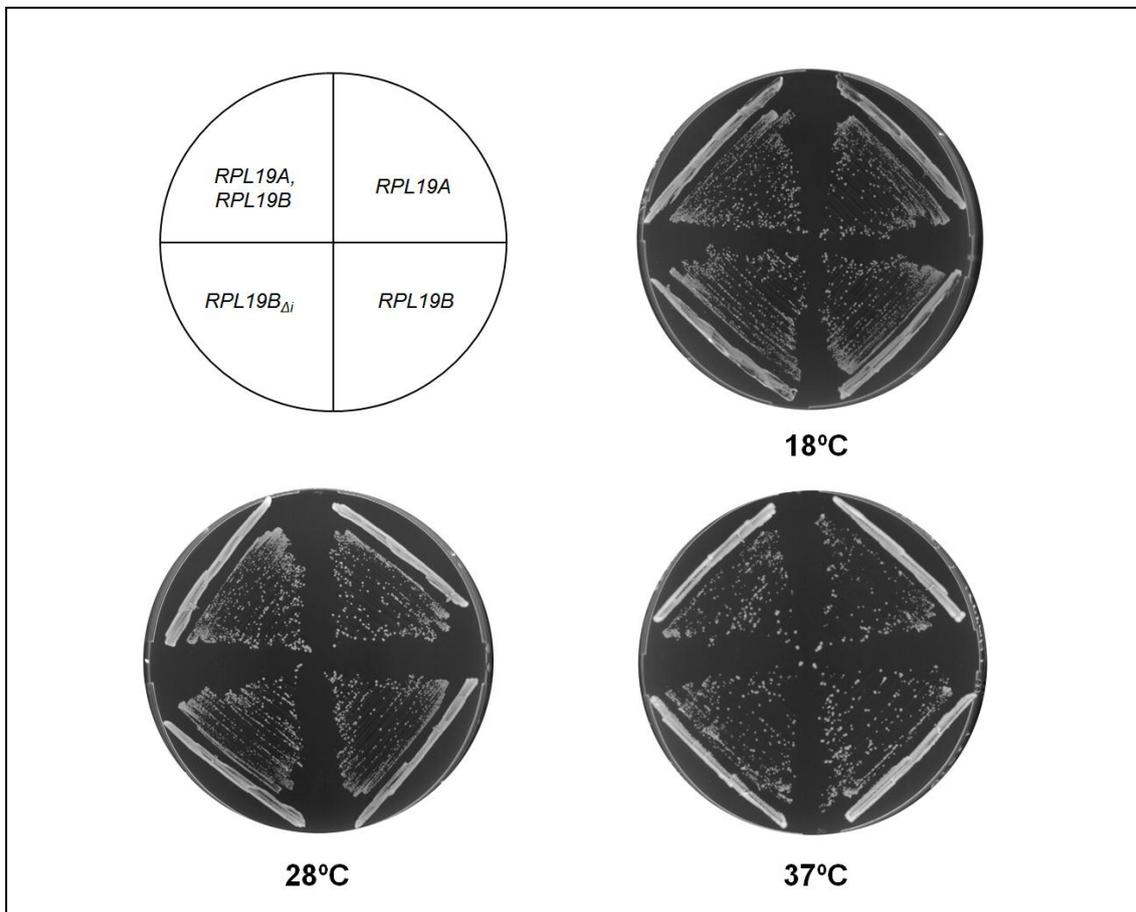


Figura 24. Supresión de la letalidad de la doble delección $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ por cada uno de los genes que se indican en el esquema de la parte superior izquierda clonados en plásmidos centroméricos.

Se obtuvieron además las curvas de crecimiento en medio líquido YEPD a 28°C de todas las cepas y se calculó su tiempo de generación (**Tg**). Como se puede observar en la **Figura 25**, no hay diferencias significativas entre ellas, excepto en el caso de la cepa Hm571 que expresa solamente el gen parálogo *RPL19A*, y tiene un crecimiento más lento ($T_g = 2 \text{ h } 20'$) que la cepa Hm566 que expresa únicamente el gen *RPL19B* ($T_g = 1 \text{ h } 55'$).

Por lo tanto, se decidió utilizar el alelo sin intrón *RPL19B_{Δi}* como sustrato para la mutagénesis al azar con el fin de obtener el mayor número de mutaciones posibles que causasen alteraciones somáticas en L19e. Las mutaciones más interesantes se podrían generar, en último término, en alelos con intrón para explorar si causan diferencias fenotípicas significativas debidas a la existencia o ausencia del intrón de *RPL19B*.

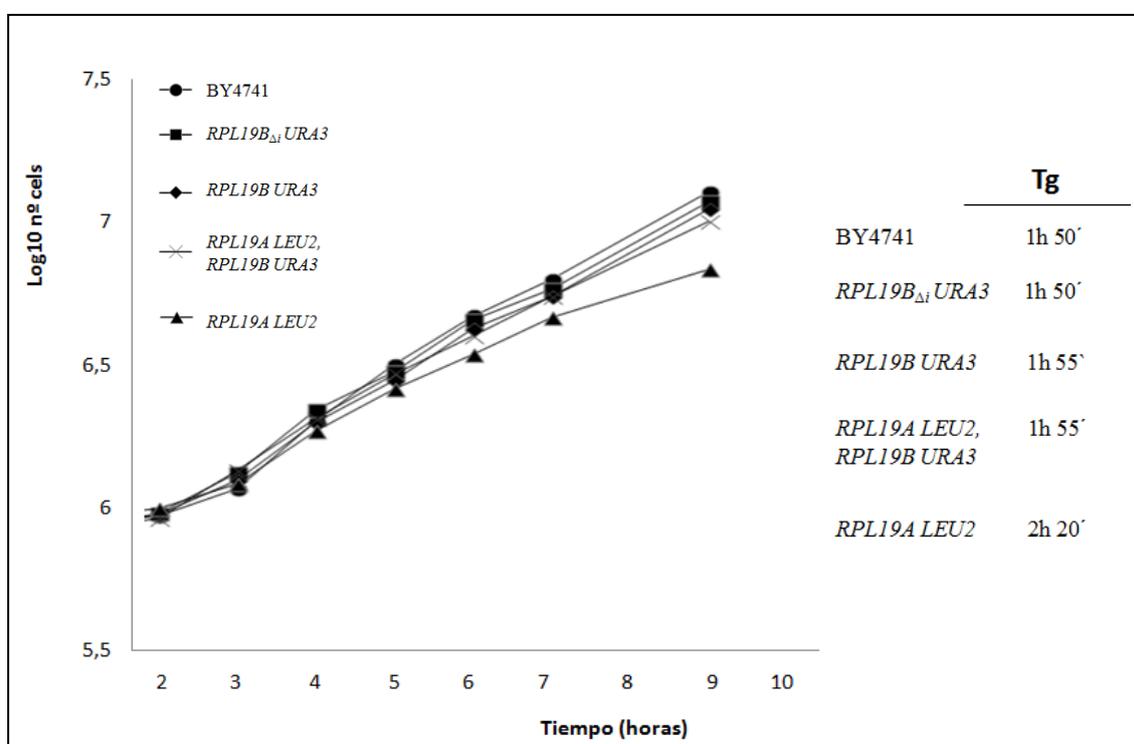


Figura 25. Representación semilogarítmica de las curvas de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ que expresan los genes *RPL19A* o *RPL19B* desde plásmidos centroméricos. Se inocularon células de cada cepa en medio líquido YEPD a partir de pre-cultivos en fase estacionaria (~ 48 horas), a una DO_{600nm} inicial de ~ 0,1, y los cultivos se incubaron a 28°C y 250 rpm durante 10 horas, tomando medidas de la DO_{600nm} cada ~ 2 h. Con los datos obtenidos se representaron las curvas de crecimiento y se estimó el Tg durante la fase exponencial en todos los casos a partir de la pendiente de las rectas correspondientes cuando el crecimiento se representa en función del tiempo y del logaritmo decimal del número de células. Cepas (●) BY4741 (WT); (■) *RPL19B_{Δi} (URA3, CEN6)*; (◆) *RPL19B (URA3, CEN6)*; (×) *RPL19A (LEU2, CEN6), RPL19B (URA3, CEN6)*; (▲) *RPL19A (LEU2, CEN6)*.

2. ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DE DIVERSOS ALELOS *RPL19*

Para determinar si la falta del intrón afecta a la cantidad o estabilidad del ARNm *RPL19B_{Δi}*, se cuantificó la **cantidad neta** – o balance entre transcripción y degradación – de las especies de ARNm que se transcriben a partir de alelos *RPL19B* y *RPL19B_{Δi}* en cepas isogénicas Hm566 y Hm568 (*Δrpl19a Δrpl19b*). Además, se incluyeron en el estudio cepas isogénicas que expresan desde plásmidos el parálogo *RPL19A* (Hm572), los dos parálogos a la vez *RPL19A* y *RPL19B* (Hm570), o el alelo condicional de sobreexpresión *pGAL::RPL19B_{Δi}* (Hm670). Se realizaron ensayos de **northern blot** con 12 μg de ARNs totales obtenidos a partir del mismo número de células de cada cepa tras cultivarlas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial (Materiales y Métodos). Los ARN se transfirieron a membranas de nylon que se hibridaron con un oligonucleótido marcado radiactivamente complementario a secuencias específicas del ARNm *RPL19B*. Aunque *L19A* y *L19B* son dos proteínas idénticas en secuencia de aminoácidos, en la secuencia de ADN de los respectivos genes parálogos existen polimorfismos que permiten detectar diferencialmente sus ARNm específicos. Así, se diseñaron los oligonucleótidos *I-ARNm-A* de 36 nt y *I-ARNm-B* de 32 nt – complementarios a zonas de divergencia de 4 nt de las secuencias de ADN de los genes respectivos en la cadena codificante (**Tabla IV** de los Anexos) – y se marcaron radiactivamente para usarlos como sondas moleculares en los ensayos de northern (Materiales y Métodos). Se usó como control de carga el transcrito de la ARN polimerasa III *SCR1* (Signal Cytoplasmic Recognition Particle), que representa aproximadamente el 2% del ARN celular en *S. cerevisiae* (Felici *et al.*, 1989). Las señales radiactivas de hibridación se obtuvieron y cuantificaron siempre con un Phosphorimager (Bio-Rad, Modelo *Personal Molecular Imager™ System*) y el programa *Quantity One®*.

Los resultados de estos experimentos indican que el transcrito del gen *RPL19B_{Δi}* (570 bp) es un **25%** más abundante que el del ARNm de *RPL19B* (954 bp), lo que sugiere que, o bien el intrón tiene un efecto negativo en la expresión de *RPL19B*, o que el transcrito menor sin intrón es algo más estable, o ambas cosas, ya que el promotor de los alelos, las secuencias flanqueantes en 3' del ORF y el plásmido pRS316 desde el que se expresan son idénticos. Además, se ha estimado que la cantidad neta del transcrito de fusión *pGAL::RPL19B_{Δi}* es **~5** veces mayor que la del transcrito natural del gen *RPL19B* (**Figura 26 A**). En la cepa Hm570 en la que se expresan los dos genes parálogos a partir de dos plásmidos centroméricos, la cantidad del transcrito de *RPL19B* es mayor (**70%**) que la del de *RPL19A* (**30%**), en concordancia con lo que se ha descrito previamente para una cepa silvestre que posee ambos parálogos en el genoma (Wang *et al.*, 2002).

Finalmente, se analizó mediante **estria** en placas con galactosa al 2% y rafinosa al 2% (**YEPG**) el tamaño de las colonias de las cepas usadas en el análisis de northern, pues en este medio puede crecer también la cepa Hm670 que porta el alelo condicional *pGAL::RPL19B_{Δi}*. Todas las cepas tienen un crecimiento similar en este medio, a juzgar por el tamaño de las colonias que desarrollan (**Figura 26 B**). Estos datos están en concordancia con el fenómeno ya descrito de que las células de *S. cerevisiae* modulan la cantidad de cada RP para que haya cantidades estequiométricas de todas ellas, puesto que se ensambla una molécula de cada proteína en cada ribosoma (Pearson *et al.*, 1982; Warner, 1999). Por ello, probablemente, la sobreexpresión de genes *RPG* (usando promotores fuertes o plásmidos multicopia) no tiene un efecto muy diferente al de su expresión desde un plásmido de bajo número de copias (Pearson *et al.*, 1982; Martín-Marcos *et al.*, 2007), como parece ocurrir en el caso de L19e.

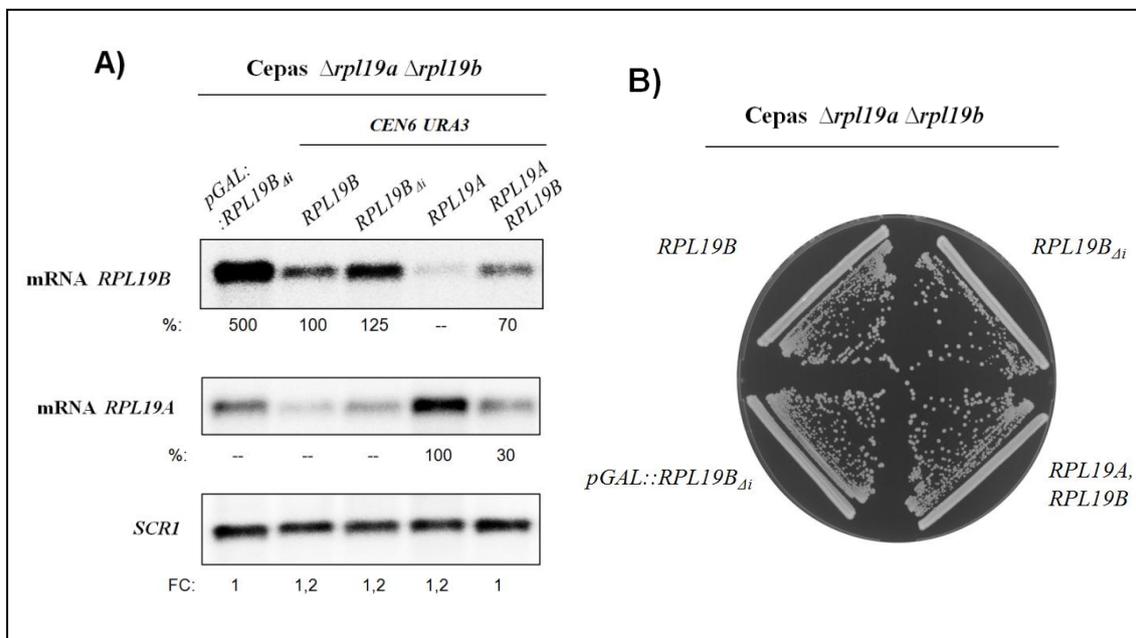


Figura 26. A) Análisis de northern blot. Se usaron como sondas moleculares oligonucleótidos específicos complementarios a la secuencia de los ARNm de *RPL19A* y *RPL19B*. En la figura se indican las cantidades relativas de cada ARNm. Los valores se normalizaron respecto a la cantidad del ARN *SCR1* (factor de carga, FC) y se expresan en porcentajes en relación al 100% atribuido a la cepa que expresa cada gen parálogo desde un plásmido centromérico. **B) Colonias desarrolladas** por cada una de las cepas en medio YEPG tras incubar las placas 3 días a 28°C.

3. MUTAGÉNESIS ALEATORIA DE *RPL19B_{Δi}*

El alelo *RPL19B_{Δi}* se sometió a mutagénesis al azar, *in vitro* e *in vivo*, con el fin de generar numerosas y, a ser posible, diferentes mutaciones hipomórficas o **pLOF** de pérdida parcial de función de L19e.

Para llevar a cabo la **mutagénesis al azar *in vitro***, se empleó el sistema “**GeneMorph II EZ-Clone Domain Mutagenesis Kit**” de Agilent® (Materiales y Métodos), que permite generar transiciones y transversiones de las diferentes bases nitrogenadas con un espectro mutacional menos sesgado que otros sistemas, ya que las tasas de mutación de A y T respecto a G y C son equivalentes. Se usó como molde el alelo *RPL19B_{Δi}* clonado en el plásmido pAJ3 (*CEN6 URA3*); como cebadores de la reacción de PCR los oligonucleótidos *FL19B-MUT* (*Bgl*III) y *RL19B-MUT* (*Sna*BI); y como enzima la ADN-polimerasa de baja fidelidad *Mutazyme II*. Se obtuvo así un conjunto de moléculas mutadas (*) *rpl19b*_{Δi}* (de 650 bp). Se optimizó la frecuencia de mutación variando la cantidad de ciclos de la reacción de PCR y/o la cantidad de molde para generar de **1 a 4 mutaciones por clon**. La colección de moléculas mutadas *rpl19b*_{Δi}* se empleó como “*megaprimer*” o cebador para llevar a cabo una segunda reacción de PCR, en este caso de alta fidelidad, en la que se amplificó el plásmido completo pAJ3 (*RPL19B_{Δi}*, *CEN6 URA3*). El producto de PCR se trató con la enzima de restricción *Dpn*I, una endonucleasa cuya secuencia diana es 5'-Gm⁶ATC-3', por lo que digiere específicamente el ADN metilado y hemimetilado, es decir, el plásmido molde conteniendo el alelo silvestre *RPL19B_{Δi}*, ya que el ADN amplificado *in vitro* por PCR y que contiene los genes mutados *rpl19b*_{Δi}* no se metila. Se obtuvo así una genoteca de plásmidos o *plasmoteca* [*rpl19b*_{Δi}*, *CEN6 URA3*] con la que se transformaron células competentes de *E.coli* de alta eficiencia XL10-GOLD para su amplificación (Materiales y Métodos). Las células transformantes se plaquearon en medio selectivo con ampicilina (100 μg/ml) (**Figura 27 A**), se recogieron conjuntamente las colonias de **865 clones *rpl19b*_{Δi}*** (donde cada colonia contiene ~10⁹ células que portan un plásmido diferente) y se extrajo el ADN plasmídico generando la **plasmoteca 1** (Materiales y Métodos).

Para llevar a cabo la **mutagénesis al azar *in vivo*** se usaron células de *E.coli* **XL1-RED**, cuya tasa de mutación es 5000 veces mayor que la de otras cepas de esta bacteria (Materiales y Métodos). Para la transformación bacteriana se utilizó el plásmido **pAJ4** (*RPL19B_{Δi}*, *CEN6 LEU2*) y se obtuvieron ~2000 clones que contenían alelos mutantes *rpl19b*_{Δi}*. La frecuencia de mutaciones introducida por las bacterias varía en función del número de generaciones, por lo que además se inocularon alícuotas representativas de toda la colección de clones bacterianos independientes en medio líquido LB con ampicilina, y se recogieron células tras incubar los cultivos 15-20 horas a 37°C (~10 generaciones) y tras 25-30 horas a 37°C (~15 generaciones),

ya que estas cepas de *E. coli* tienen un tiempo de generación de ~ 90-120 minutos en ese medio. Se obtuvo ADN plasmídico a partir de las colonias que se recogieron de las placas (**plasmoteca 2**) y tras su amplificación en medio líquido (**plasmoteca 3**, tras 10 generaciones, y **plasmoteca 4**, tras 15 generaciones), conteniendo todas ellas ~2000 clones *rpl19b**_{Δi}, *CEN6 LEU2* (Figura 27 B).

La frecuencia de mutación en los clones obtenidos oscila entre **1 y 3 mutaciones** en las plasmotecas 2 y 3, como se estimó al secuenciar los alelos *rpl19b**_{Δi} de 5 clones independientes en cada caso. Los alelos mutantes de dos de estos clones *rpl19b**_{Δi} (*rpl19b* N27D, A65T y *rpl19b* A168T) (Tabla 4), se subclonaron de nuevo en los vectores originales y se analizó si conferirían algún fenotipo de crecimiento en la levadura $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$.

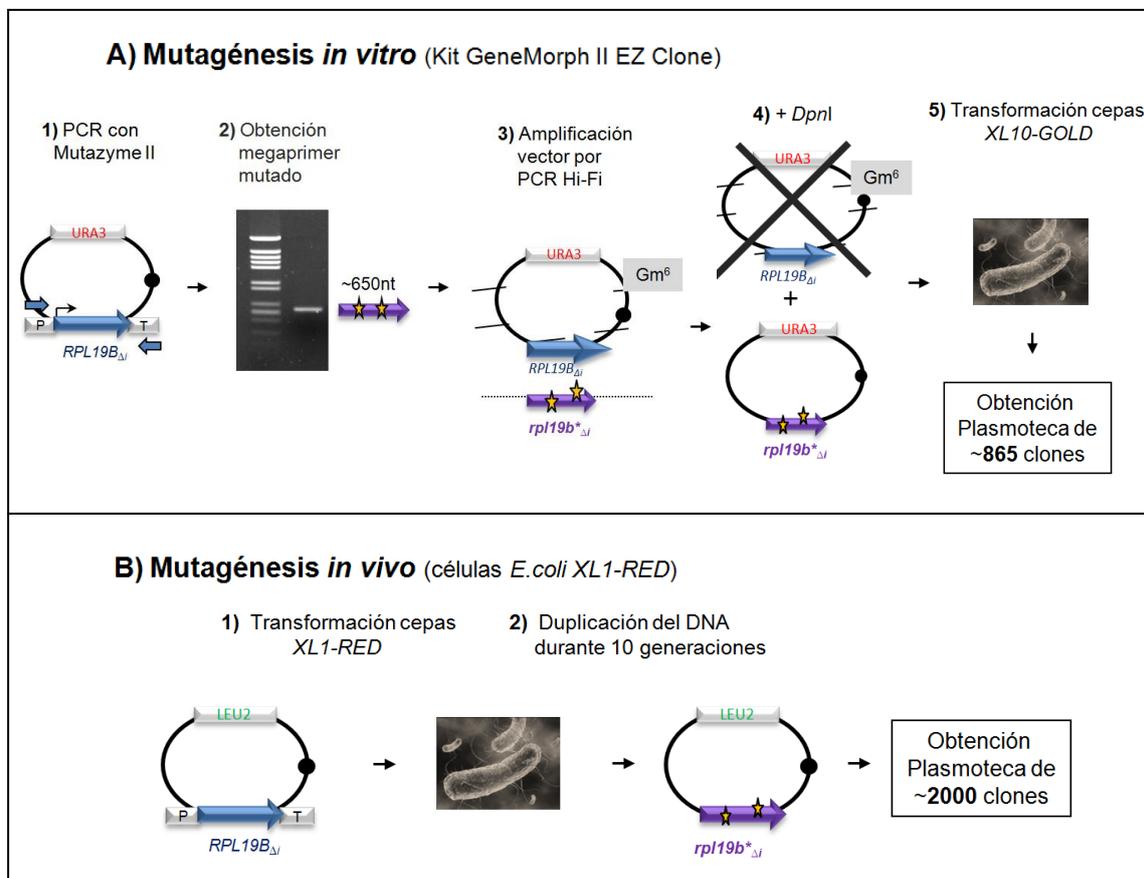


Figura 27. Esquema de la estrategia seguida para la obtención de plasmotecas mutantes con alelos *rpl19b_{Δi}. A) Mutagénesis aleatoria *in vitro* (GeneMorph II EZ- Clone). B) Mutagénesis aleatoria *in vivo* usando células de *E. coli* XL1-RED.**

4. OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES DE LEVADURA Y SELECCIÓN DE MUTANTES VIABLES Y LETALES

4.1. Obtención de transformantes de levadura de la Plasmoteca 1:

[*rpl19b_{Δb} *CEN6 URA3*]:**

Se transformó con esta plasmoteca la cepa receptora de levadura **TY1099** $\Delta rpl19a \Delta rpl19b ura3\Delta 0$ [*pGAL::RPL19B_{Δb}*, *CEN4 LEU2*] (**Tabla 3**) y se seleccionaron ~**1500** transformantes en placas de medio SG⁺, suplementado con los requerimientos nutricionales que determinan las demás auxotrofías (**Tabla 18**), pero sin leucina ni uracilo. Este medio permitió seleccionar transformantes que contienen los dos tipos de plásmidos, *pGAL::RPL19B_{Δb}* (*LEU2*) y *rpl19b**_{Δi} (*URA3*) y portan alelos *rpl19b**_{Δi} con mutaciones tanto **viab**les como **leta**les.

Por otra parte, se extendieron transformantes de levadura en placas de medio SD⁺ suplementado con leucina y sin uracilo para favorecer la pérdida del plásmido con marcador *LEU2* que porta el alelo salvaje [*pGAL::RPL19B_{Δb}*, *CEN4 LEU2*] y seleccionar transformantes **viab**les, capaces de crecer en glucosa (SD⁺), con fenotipo *slg*, *ura*⁺, *leu*⁻, candidatos a portar alelos mutantes hipomórficos [*rpl19b**_{Δb}, *CEN6 URA3*] (**Figura 29 A**). Se seleccionaron **70 clones transformantes** con fenotipo *slg* a diferentes temperaturas, de los que **55** eran **viab**les y **15** portadores de mutaciones **leta**les, pues crecían en placas de SG⁺ pero no de SD⁺.

4.2. Obtención de transformantes de levadura de las demás Plasmotecas:

[*rpl19b_{Δb} *CEN6 LEU2*]:**

Igual que se ha descrito anteriormente, se transformó con las plasmotecas 2, 3 y 4 células de la cepa **Hm670** ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b leu2\Delta 0$ [*pGAL::RPL19B_{Δb}*, *URA3*]) (**Tabla I de los Anexos**) y se obtuvieron ~ 4000 clones independientes. Los transformantes se extendieron en placas de SG⁺ sin uracilo y sin leucina para que mantuviesen los dos plásmidos, *pGAL::RPL19B_{Δb}* (*URA3*) y *rpl19b**_{Δi} (*LEU2*). Se hicieron réplicas de los transformantes en placas de SD⁺ con ácido 5-fluororótico (5-FOA) (Boeke *et al.*, 1984) para seleccionar transformantes que pudiesen perder el gen silvestre en el vector *URA3* (*ura*⁻) y que porten alelos con mutaciones **viab**les en el plásmido con el marcador *LEU2* [*rpl19b**_{Δb}, *CEN6 LEU2*] (**Figura 29 B**). Se seleccionaron de este modo **52 clones** que exhiben fenotipo *slg* a diferentes temperaturas (colonias de pequeño tamaño que crecen como *papilas* en las réplicas de colonias en placas de 5-FOA) (**Figura 28**).

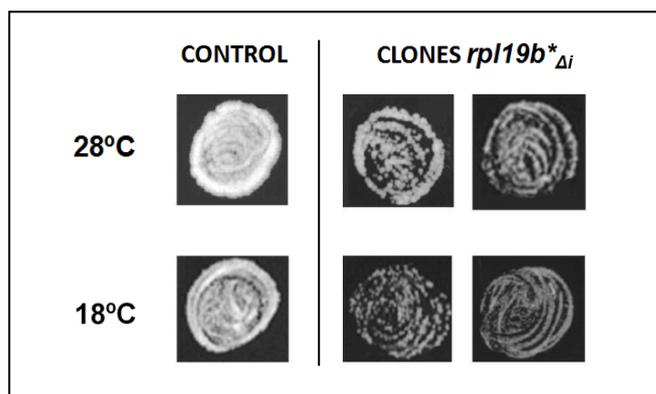


Figura 28. Clones *rpl19b* Δ_i* , *CEN6 LEU2* con fenotipo *slg* aislados en placas de 5-FOA a 28°C y 18°C.

5. RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE ALELOS *rpl19b* Δ_i* Y DEL FENOTIPO *slg*

De los 5500 transformantes totales de levadura obtenidos con las plasmotecas generadas por ambos procedimientos de mutagénesis se seleccionaron aquellos con un fenotipo *slg* más extremo, observable por el tamaño de las colonias aisladas que se desarrollan en placas del mismo medio tras ser incubadas varios días a diferentes temperaturas. De este modo, se seleccionaron finalmente **55** clones *slg* de los que se purificó ADN total para poder recuperar los plásmidos que portan mediante transformación y selección en *E.coli* DH5- α por resistencia a ampicilina (Filetici *et al.*, 1985) (Materiales y Métodos). Una vez recuperados los plásmidos, se transformó con cada uno de ellos la cepa de levadura original adecuada dependiendo del marcador, TY1099 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b ura3\Delta 0$ [pGAL::*RPL19B Δ_i* , *LEU2*]) o bien Hm670 (TY1099 $\Delta rpl19a \Delta rpl19b leu2\Delta 0$ [pGAL::*RPL19B Δ_i* , *URA3*]). De esta forma se determinó en qué casos los fenotipos de *slg* dependían de la presencia de un plásmido conteniendo un alelo *rpl19b* Δ_i* . En algunos casos se recobraron plásmidos que tras re-transformar las cepas de levadura originales no causaban fenotipo *slg*; en esos casos, el fenotipo de los clones podría deberse a la aparición de alguna mutación cromosómica espontánea, o bien inducida por el acetato de litio que se emplea en el protocolo de transformación de levaduras (Gietz *et al.*, 1995) (Figura 29 C).

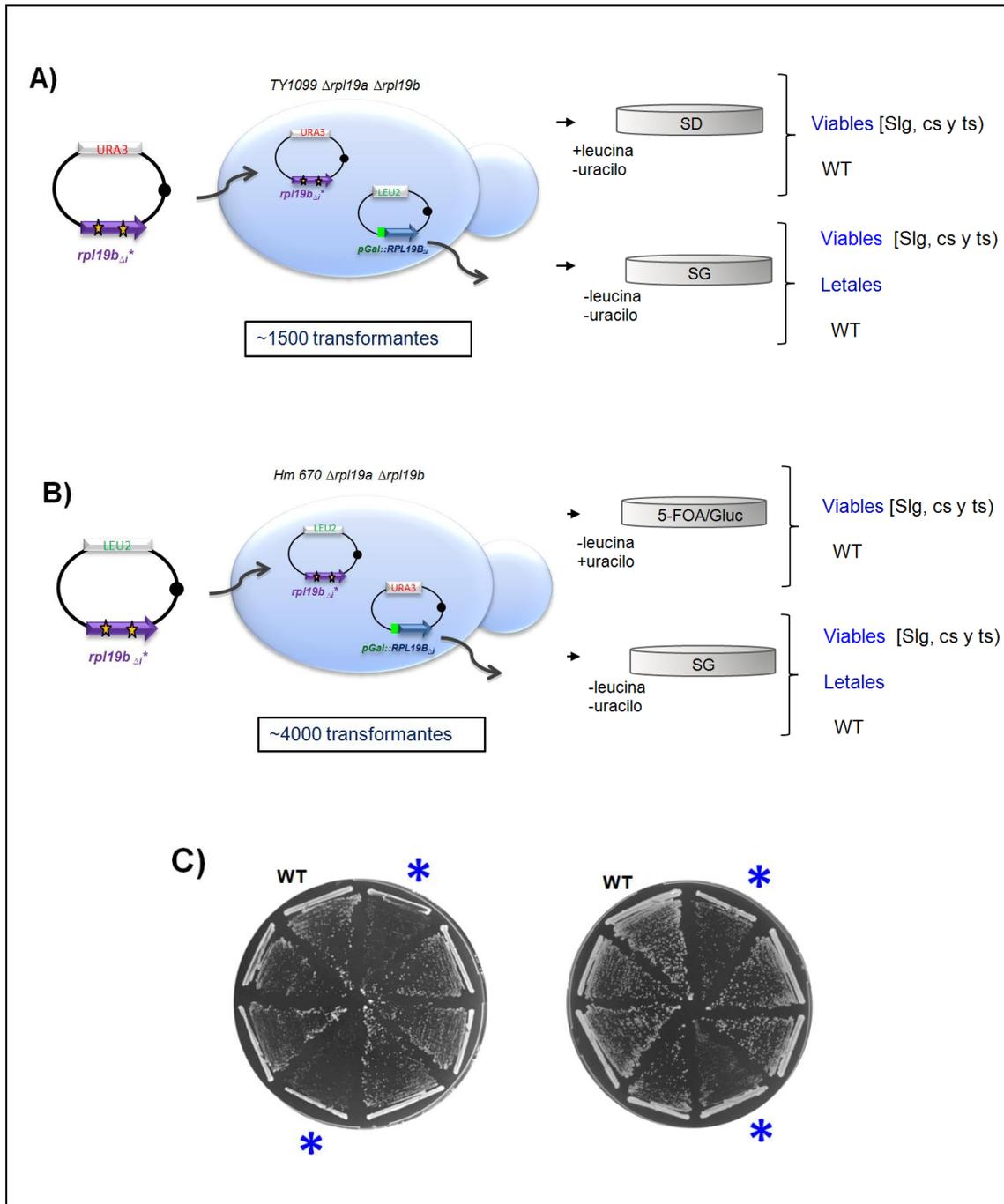


Figura 29. Selección de transformantes candidatos a portar o mutaciones letales o de pérdida parcial de función. A) Selección de mutantes *slg* conteniendo alelos mutados *rpl19b*_{Δi}* clonados en plásmidos *URA3* o B) en plásmidos *LEU2*. C) Fenotipo *slg* de algunos mutantes tras la re-transformación de las cepas (TY1099 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b ura3\Delta 0$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *LEU2*]) o Hm670 (TY1099 $\Delta rpl19a \Delta rpl19b leu2\Delta 0$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *URA3*])). Con un asterisco azul se indican algunos de los mutantes con *slg* más acentuado.

Es importante destacar que en cada subunidad ribosómica 60S o 40S se ensambla una sola molécula de cada proteína ribosómica RPL o RPS, respectivamente, por lo que los ribosomas no son homogéneos en su composición de RP en *S. cerevisiae*. La heterogeneidad se debe a que todas las proteínas parálogas no son idénticas en su secuencia de aminoácidos ni tampoco la transcripción y/o regulación de los genes correspondientes correspondientes (Kellis *et al.*, 2004; Komili *et al.*, 2007; Xue and Barna, 2012). En los transformantes *slg* de cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ se expresan únicamente alelos mutados $rpl19b^{*_{\Delta i}}$ clonados en un plásmido centromérico [$rpl19b^{*_{\Delta i}}$, *CEN6*]. La viabilidad de dichos mutantes indica claramente que pueden ensamblar subunidades 60S conteniendo una proteína L19e* mutante, y que los ribosomas maduros que se sinteticen serán **parcialmente funcionales** y homogéneos respecto a esa proteína.

Se secuenciaron **48** alelos $rpl19b^{*_{\Delta i}}$ en ambas cadenas de ADN (650 bp) utilizando los oligonucleótidos *F5L19B* y *R5L19B* (Materiales y Métodos), y se descartaron aquellos que **a)** no contenían mutaciones en la secuencia codificante de *RPL19B _{Δi}* , **b)** no conferían un marcado fenotipo de *slg*, o **c)** presentaban más de 3 mutaciones. Se seleccionaron finalmente **8** alelos $rpl19b^{*_{\Delta i}}$ que tienen una o dos mutaciones puntuales en su secuencia nucleotídica, causan fenotipo *slg* a 28°C que es más exacerbado a 18°C y/o 37°C (**Figura 30**). Estos 8 alelos se subclonaron en vectores *CEN6 URA3* y *CEN6 LEU2* (**Tabla 4** y **Figura 21**).

CEPAS ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$)	PLÁSMIDOS	ALELOS MUTANTES $rpl19b^*_{\Delta i}$	
		CODONES (NUCLEÓTIDOS): ALELOS	NOMENCLATURA
<i>rpl19b^*_{\Delta i} (CEN6 URA3)</i>			
Hm573	pAJ10	<i>GAA / TAA</i> (468) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 157-189</i>	<i>rpl19b \Delta 32</i>
Hm574	pAJ11	<i>AGA / TGA</i> (484) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 162-189</i>	<i>rpl19b \Delta 27</i>
Hm575	pAJ12	<i>AGA / TGA</i> (499) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 167-189</i>	<i>rpl19b \Delta 22</i>
Hm576	pAJ13	<i>GAT / GCT</i> (443), <i>AAG / AGG</i> (458), <i>TTG / TAG</i> (464) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 148A, K153R, \Delta 155-189</i>	<i>rpl19b \Delta 148A, K153R, \Delta 34</i>
Hm577	pAJ14	<i>AAC / GAC</i> (79), <i>ATC / ACA</i> (107,108), <i>TTG / TAG</i> (464) : <i>rpl19b_{\Delta i} N27D, I96T, \Delta 155-189</i>	<i>rpl19b N27D, I96T, \Delta 34</i>
Hm578	pAJ15	<i>TCT / TTT</i> (182), <i>ATT / ATG</i> (426), <i>GAA / TAA</i> (559) : <i>rpl19b_{\Delta i} S61F, I142M, \Delta 187-189</i>	<i>rpl19b S61F, I142M, \Delta 2</i>
Hm581	pAJ18	<i>AAC / GAC</i> (79), <i>GCC / ACC</i> (192) : <i>rpl19b_{\Delta i} N27D, A65T</i>	<i>rpl19b N27D, A65T</i>
Hm582	pAJ19	<i>GCT / ACT</i> (503) : <i>rpl19b_{\Delta i} A168T</i>	<i>rpl19b A168T</i>
<i>rpl19b^*_{\Delta i} (CEN6 LEU2)</i>			
Hm618	pMJ10	<i>GAA / TAA</i> (468) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 157-189</i>	<i>rpl19b \Delta 32</i>
Hm619	pMJ11	<i>AGA / TGA</i> (484) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 162-189</i>	<i>rpl19b \Delta 27</i>
Hm620	pMJ12	<i>AGA / TGA</i> (499) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 167-189</i>	<i>rpl19b \Delta 22</i>
Hm621	pMJ13	<i>GAT / GCT</i> (443), <i>AAG / AGG</i> (458), <i>TTG / TAG</i> (464) : <i>rpl19b_{\Delta i} \Delta 148A, K153R, \Delta 155-189</i>	<i>rpl19b \Delta 148A, K153R, \Delta 34</i>
Hm622	pMJ14	<i>AAC / GAC</i> (79), <i>ATC / ACA</i> (107,108), <i>TTG / TAG</i> (464) : <i>rpl19b_{\Delta i} N27D, I96T, \Delta 155-189</i>	<i>rpl19b N27D, I96T, \Delta 34</i>
Hm623	pMJ15	<i>TCT / TTT</i> (182), <i>ATT / ATG</i> (426), <i>GAA / TAA</i> (559) : <i>rpl19b_{\Delta i} S61F, I142M, \Delta 187-189</i>	<i>rpl19b S61F, I142M, \Delta 2</i>
Hm579	pAJ16	<i>AAC / GAC</i> (79), <i>GCC / ACC</i> (192) : <i>rpl19b_{\Delta i} N27D, A65T</i>	<i>rpl19b N27D, A65T</i>
Hm580	pAJ17	<i>GCT / ACT</i> (503) : <i>rpl19b_{\Delta i} A168T</i>	<i>rpl19b A168T</i>

Tabla 4. Cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ portadoras de alelos $rpl19b^*_{\Delta i}$ mutados clonados en pRS316 (CEN6 URA3) o en pRS315 (CEN6 LEU2). Se indican las cepas obtenidos (Hm) y los plásmidos construidos (pAJ y pMJ), las mutaciones identificadas, los cambios de nucleótidos que provocan y entre paréntesis la posición del nucleótido o nucleótidos sustituidos en la secuencia de 570 bp de *RPL19B_{\Delta i}*. En la última columna se indica la nomenclatura abreviada que se va a utilizar en adelante en para designar el genotipo relevante de los diversos mutantes.

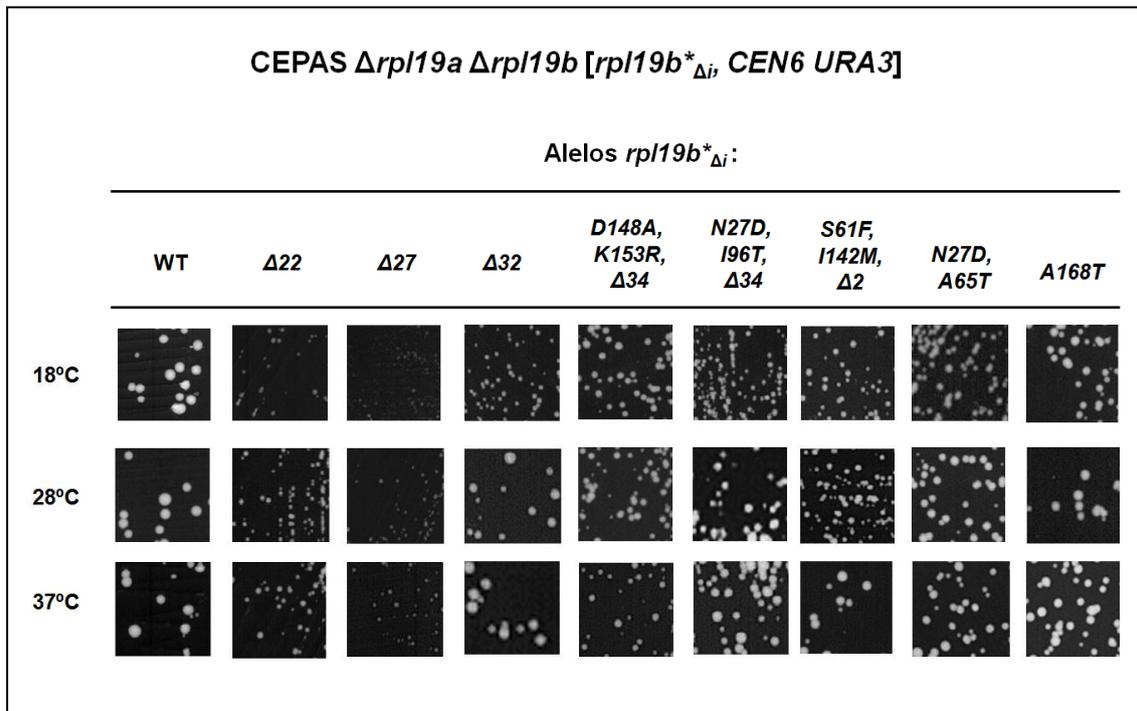


Figura 30. Fenotipo *slg* de las cepas mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [rpl19b^*_{\Delta i}, CEN6 URA3]$. Se muestra el tamaño de colonias de distintos transformantes en placas de YEPD que se incubaron a 18°C (5 días), 28°C (2 días) y 37°C (2 días). La imagen corresponde a secciones ampliadas de cada placa para poder observar el tamaño de las colonias.

Entre los 5500 transformantes analizados $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [rpl19b^*_{\Delta i}, CEN6]$, un 2,2% contenían plásmidos portadores de mutaciones únicas causantes de pérdida parcial de función de L19e y un 1,8% mutaciones letales – que en algunos casos son múltiples – ya que las cepas correspondientes no sobreviven en ausencia del gen silvestre de *RPL19B*. Estos datos sugieren que el espectro de mutaciones somáticas que afectan a la estructura de L19e y que la célula puede tolerar sería más bien estrecho; es decir, o bien se trataría de una proteína bastante refractaria a sufrir cambios, pues ocasionarían una pérdida total de su funcionalidad, o bien la mutagénesis realizada no habría sido saturante.

Se recuperaron **15** plásmidos con alelos $rpl19b^*_{\Delta i}$ portadores de mutaciones letales y se secuenciaron para obtener información acerca de los residuos aminoacídicos o dominios de L19e que serían esenciales para la viabilidad celular. Al analizar las secuencias se observó que o bien tenían más de 5 mutaciones, o bien eran mutaciones sin sentido (TGA, TAG o ATT) que introducen codones de terminación de la traducción muy tempranos, por lo que codificarían proteínas L19e truncadas extensamente en su extremo carboxi-terminal (C-terminal) y carecen de **63 aminoácidos o más (L19e Δ CT)**.

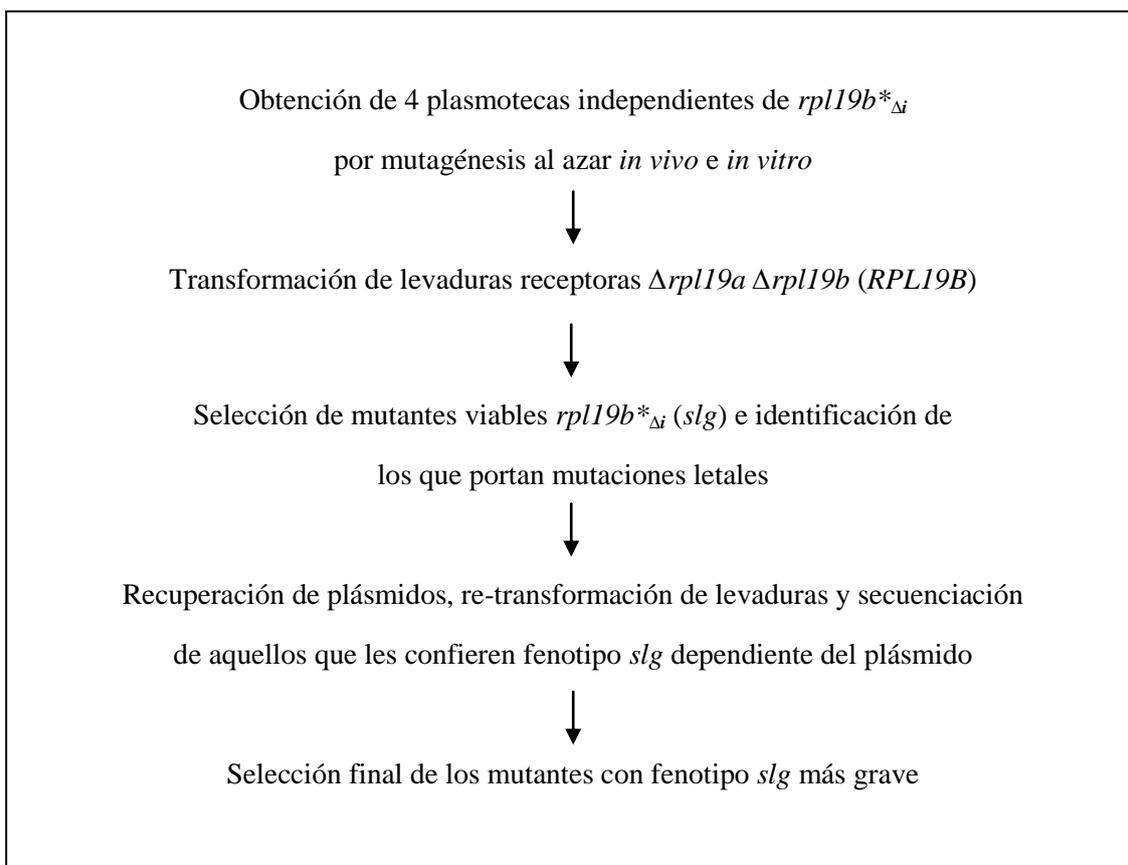


Figura 31. Esquema que resume el procedimiento de obtención y selección de mutantes $rpl19b^{*\Delta i}$.

6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE $RPL19B_{\Delta i}$

6.1. Sustituciones de aminoácidos en el dominio C-terminal de L19e:

La mayoría de los mutantes $rpl19b^{*\Delta i}$ que se obtuvieron en la mutagénesis al azar presentaban más de una mutación (41 de 48 secuenciados). Por ello, se generaron *in vitro* $RPL19B_{\Delta i}$ mediante mutagénesis dirigida algunas mutaciones puntuales únicas (Materiales y Métodos) que parecían las más interesantes en relación a las predicciones de estructura secundaria de L19e (Jones, 1999), o corresponden a residuos de aminoácidos involucrados en las interacciones que establecería esta proteína con el ARNr o con otras RP, según se predice del modelo de la estructura de alta resolución atómica del ribosoma 80S de *S. cerevisiae* (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Entre otras, se generaron dos mutaciones puntuales en las posiciones 555 (cambia el triplete CTA, por GCA) y 564 (cambia GAC por CGC) de $RPL19B_{\Delta i}$, que originarán proteínas con sustituciones de la leucina L185 por una alanina (**L185A**), y del ácido aspártico D188 por

una arginina (**D188R**), respectivamente. Ambas mutaciones afectan a la zona C-terminal de L19B y contactan con la proteína ribosómica rpS7, o **S7**, de la subunidad 40S del ribosoma (Ben-Shem *et al.*, 2011). El residuo L185 de L19B establecería interacciones hidrofóbicas con la R39 de la proteína S7 (**Figura 34**), de modo que *rpl19b_{Δi} L185A* alteraría esa interacción, pues la alanina es un aminoácido más pequeño y menos hidrofóbico que la leucina. El grupo amino del aspártico D188 interaccionaría con el grupo carboxilo de la serina S2 de la proteína S7; además, D188 establecería un puente salino con el grupo amino de la leucina L7 de S7, por lo que la mutación *rpl19b_{Δi} D188R* alteraría algunas interacciones electrostáticas de L19e tanto con la serina S2 como con la leucina L7 de la proteína ribosómica S7 (**Figura 34**).

La proteína L19a (149 aminoácidos) es la ortóloga de L19e en la halobacteria *Haloarcula marismortui* (Hatakeyama *et al.*, 1989) (**Figura 11**). Una forma de investigar el significado funcional de la región con estructura α -hélice C-terminal de 64 aminoácidos de la L19e en *S.cerevisiae* – que se introduce en la subunidad 40S desde la 60S – decidimos generar una mutación para obtener una versión truncada de L19e de la misma longitud que la de L19a. Para ello, se introdujo un codón sin sentido UAA en la posición 448 de la secuencia de *RPL19B_{Δi}*, de modo que codificaría una proteína carente de los últimos 39 aminoácidos (*rpl19b_{Δi} A39*).

6.2. Sustituciones de aminoácidos en el dominio N-terminal de L19e:

Se consideró también sustituir algunos residuos aminoacídicos por otros en la región amino-terminal de L19e, en concreto, algunos que se localizan en la zona de contacto de la proteína con otras RP de 60S y/o con el ARNr 25S. Para ello, se generaron las siguientes mutaciones puntuales en el alelo *RPL19B_{Δi}*:

- Una mutación en el nucleótido 81 que cambia el codón AAC a GAC y causa la sustitución de la asparragina N27 de L19e por aspártico (*rpl19b_{Δi} N27D*). Esta mutación aparecía en un mutante triple y en un mutante doble de los obtenidos por mutagénesis al azar (*rpl19b_{Δi} N27D, I96T, A34*; y *rpl19b_{Δi} N27D, A65T*), por lo que se generó la mutación aislada para comprobar si este residuo era responsable del fenotipo *slg* de los mismos.

- La serina S37 es un residuo potencialmente fosforilable de L19e (Gruhler *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2008) y está conservada en sus ortólogos en otros organismos eucariotas en los que se ha secuenciado el genoma. Una mutación en el nucleótido 109 del codón TCT a GCT causa la sustitución de serina a alanina (*rpl19b_{Δi} S37A*), un aminoácido no fosforilable. Se investigó si el cambio producía algún fenotipo de crecimiento del mutante.

- La glicina G48 es un residuo también conservado en los ortólogos conocidos de L19e. Una mutación en el nucleótido 109 del codón GGA a CGA causa la sustitución de glicina a arginina (*rpl19b*_{Δi} **G48R**) e introduce un cambio de carga que podría quizá afectar a la unión de L19e al ARNr 25S.

6.3. Obtención de nuevos alelos *rpl19b**_{Δi}:

Para generar nuevos alelos mutantes se utilizó el Kit “**QuickChange Lighting**” de Agilent®, usando como molde la secuencia que codifica L19B en el plásmido pAJ3 [*RPL19B*_{Δi}, *CEN6 URA3*] y parejas de oligonucleótidos que sustituyen los nucleótidos que sustituyen los nucleótidos correspondientes para generar los cambios deseados (Materiales y Métodos). En el caso de *rpl19b*_{Δ39} se obtuvo también un alelo mutado con intrón, usando como molde de la reacción el gen *RPL19B* clonado en el plásmido pAJ1 [*RPL19B*, *CEN6 URA3*]. Se secuenciaron todos los plásmidos y alelos mutados y éstos se subclonaron también en el plásmido pAJ2 [*RPL19B*, *CEN6 LEU2*] (**Tabla 5**).

PLÁSMIDOS	ALELOS MUTANTES <i>rpl19b*</i> _{Δi}	
	CODONES/NUCLEÓTIDOS: ALELOS	NOMENCLATURA
<i>rpl19b*</i> _{Δi} (CEN6 URA3)		
pAJ23	AAC / GAC (79): <i>rpl19b</i> _{Δi} N27D	<i>rpl19b</i> N27D
pAJ24	TCT / GCT (109): <i>rpl19b</i> _{Δi} S37A	<i>rpl19b</i> S37A
pAJ25	GGA / CGA (141): <i>rpl19b</i> _{Δi} G48R	<i>rpl19b</i> G48R
pAJ44	CTA / GCA (553, 554): <i>rpl19b</i> _{Δi} L185A	<i>rpl19b</i> L185A
pAJ45	GAC / CGC (562, 563): <i>rpl19b</i> _{Δi} D188R	<i>rpl19b</i> D188R
pAJ26	CAA / TAA (448): <i>rpl19b</i> _{Δi} Δ150-189	<i>rpl19b</i> Δ39
pAJ42	CAA / TAA (832 _(i)): <i>rpl19b</i> Δ150-189	<i>rpl19b</i> _(i) Δ39
<i>rpl19b*</i> _{Δi} (CEN6 LEU2)		
pAJ28	AAC / GAC (79): <i>rpl19b</i> _{Δi} N27D	<i>rpl19b</i> N27D
pAJ29	TCT / GCT (109): <i>rpl19b</i> _{Δi} S37A	<i>rpl19b</i> S37A
pAJ30	GGA / CGA (141): <i>rpl19b</i> _{Δi} G48R	<i>rpl19b</i> G48R
pAJ46	CTA / GCA (553, 554): <i>rpl19b</i> _{Δi} L185A	<i>rpl19b</i> L185A
pAJ47	GAC / CGC (562, 563): <i>rpl19b</i> _{Δi} D188R	<i>rpl19b</i> D188R
pAJ31	CAA / TAA (448): <i>rpl19b</i> _{Δi} Δ150-189	<i>rpl19b</i> Δ39
pAJ43	CAA / TAA (832 _(i)): <i>rpl19b</i> Δ150-189	<i>rpl19b</i> _(i) Δ39

Tabla 5. Plásmidos portadores de nuevos alelos mutantes *rpl19b_{Δi} obtenidos por mutagénesis dirigida y clonados en vectores pRS316 (CEN6 URA3) y pRS315 (CEN6 LEU2).** Se indican los plásmidos construidos (pAJ), las mutaciones identificadas, los cambios de nucleótidos que provocan y entre paréntesis la posición del nucleótido o nucleótidos sustituidos en la secuencia de 570 bp de *RPL19B*_{Δi}. En la última columna se indica la nomenclatura abreviada que se va a utilizar en adelante en para designar el genotipo relevante de los diversos mutantes.

Para analizar el fenotipo que confieren estas mutaciones únicas, se transformó la cepa **TY1099** ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b [pGAL::RPL19B_{\Delta i}, LEU2]$) con los diferentes plásmidos [*rpl19b**_{Δi}, CEN6 URA3]. Los transformantes se extendieron en placas de SD⁺ selectivo para que las cepas mantengan los dos plásmidos, los que tienen el marcador *URA3* (alelos mutantes) y el que tiene el marcador *LEU2* (alelo WT condicional *pGAL::RPL19B*_{Δi}). En SD⁺ se expresan únicamente los alelos mutados *rpl19b**_{Δi}, y la expresión del alelo condicional está reprimida. Se analizó en placas de YEPD a diferentes temperaturas el fenotipo de crecimiento de transformantes leu⁺ y

de los leu⁻ que ya habían perdido el plásmido *pGAL::RPL19B_{Δi}*. Todos los mutantes eran viables y la única mutación que confiere un fenotipo *slg* aparente es *rpl19bΔ39* (Figura 36 B).

En la **Tabla 6** se indica la **nomenclatura** que se usa en adelante para designar todos los alelos mutados *rpl19b*_{Δi}* objeto de este estudio y las respectivas proteínas mutantes L19e*:

CODÓN (NUCLEÓTIDO)	MUTACIONES	ALELOS MUTANTES (<i>rpl19b*_{Δi}</i>)	PROTEÍNAS MUTANTES (L19e*)
A) <i>GAA / TAA</i> (468)	<i>Δ157-189</i>	<i>rpl19bΔ32</i>	L19Δ32
<i>AGA / TGA</i> (484)	<i>Δ162-189</i>	<i>rpl19bΔ27</i>	L19Δ27
<i>AGA / TGA</i> (499)	<i>Δ167-189</i>	<i>rpl19bΔ22</i>	L19Δ22
<i>GAT / GCT</i> (443), <i>AAG / AGG</i> (458), <i>TTG / TAG</i> (464)	<i>D148A, K153R,</i> <i>Δ155-189</i>	<i>rpl19b D148A,</i> <i>K153R, Δ34</i>	L19 D148A, K153R, Δ34
<i>AAC / GAC</i> (79), <i>ATC / ACA</i> (107,108), <i>TTG / TAG</i> (464)	<i>N27D, I96T,</i> <i>Δ155-189</i>	<i>rpl19b N27D,</i> <i>I96T, Δ34</i>	L19 N27D, I96T, Δ34
<i>TCT / TTT</i> (182), <i>ATT / ATG</i> (426), <i>GAA / TAA</i> (559)	<i>S61F, I142M,</i> <i>Δ187-189</i>	<i>rpl19b S61F,</i> <i>I142M, Δ2</i>	L19 S61F, I142M, Δ2
<i>AAC / GAC</i> (79), <i>GCC / ACC</i> (192)	<i>N27D, A65T</i>	<i>N27D, A65T</i>	L19 N27D, A65T
<i>GCT / ACT</i> (503)	<i>A168T</i>	<i>A168T</i>	L19 A168T
B) <i>AAC / GAC</i> (79)	<i>N27D</i>	<i>N27D</i>	L19 N27D
<i>TCT / GCT</i> (109)	<i>S37A</i>	<i>S37A</i>	L19 S37A
<i>GGA / CGA</i> (141)	<i>G48R</i>	<i>G48R</i>	L19 G48R
<i>CTA / GCA</i> (553, 554)	<i>L185A</i>	<i>L185A</i>	L19 L185A
<i>GAC / CGC</i> (562, 563)	<i>D188R</i>	<i>D188R</i>	L19 D188R
<i>CAA / TAA</i> (448)	<i>Δ150-189</i>	<i>rpl19bΔ39</i>	L19Δ39
<i>CAA / TAA</i> (832 ⁽ⁱ⁾)	⁽ⁱ⁾ <i>Δ150-189</i>	<i>rpl19b ⁽ⁱ⁾Δ39</i>	L19⁽ⁱ⁾Δ39

Tabla 6. Nomenclatura de los alelos mutantes *rpl19b*_{Δi}* y de las proteínas L19e*. A) Alelos obtenidos por mutagénesis al azar, y **B)** por mutagénesis dirigida. En los codones se resaltan en negrita los cambios de nucleótidos y entre paréntesis la posición que ocupan en la secuencia de *RPL19B_{Δi}* (570 bp).

7. PREDICCIÓN DE ALTERACIONES EN L19e Y EN LA ESTRUCTURA DEL RIBOSOMA 80S

7.1. Alteraciones en la secuencia de aminoácidos de L19e

Algunas mutaciones seleccionadas por causar *slg*, o las generadas posteriormente para alterar distintas regiones de L19e, causan la sustitución de distintos residuos aminoacídicos en esta proteína, como acabamos de describir. Su localización en la estructura atómica de la subunidad 60S y en la del ribosoma 80S se ha realizado usando las coordenadas de la estructura cristalográfica del ribosoma 80S de *S. cerevisiae* descritas por (Ben-Shem *et al.*, 2011) para interpretar qué interacciones moleculares resultarían alteradas.

El espectro de mutaciones obtenido en los mutantes *slg* viables que fueron finalmente seleccionados para el estudio posterior se resume como sigue:

- Cinco mutantes que exhiben el fenotipo *slg* más acusado tienen mutaciones en la ORF de *RPL19B_{di}* que sustituyen los aminoácidos glutamina (Q150), leucina (L155), ácido glutámico (E157) y argininas (R162) y (R167) por codones sin sentido, TAA, TAG, TAA, TGA, TGA, respectivamente en la secuencia de ADN (**Figura 32 A**), por lo que se sintetizarían en esas células proteínas truncadas L19e Δ CT que carecen de los 22-39 aminoácidos del dominio C-terminal de L19e: **Δ 22**, **Δ 27**, **Δ 32**, **Δ 34** y **Δ 39**. Las mutaciones eliminarían parte de la **α -hélice** de L19e que establece el puente eucariótico **eB12** entre las dos subunidades ribosómicas, contactando con el eES6 del ARNr 18S y con las RP **S7e** y **S17e** de la subunidad menor 40S (**Figuras 33 y 34**) (Ben-Shem *et al.*, 2011).

- En el extremo 3' de la ORF de *RPL19B_{di}* se localizan otras mutaciones puntuales que sustituyen los tripletes GCT (posición 504) por ACT, CTA (posición 555) por GCA, y GAC (posición 564) por CGC, causando las siguientes sustituciones de residuos aminoacídicos en L19e: **A168T**, **L185A**, **D188R**, respectivamente. El ligero *slg* de los mutantes correspondientes sugiere que esas mutaciones no afectarían tan gravemente como las truncaciones anteriores a las interacciones moleculares que L19e establece a través de su extremo C-terminal (Ben-Shem *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012).

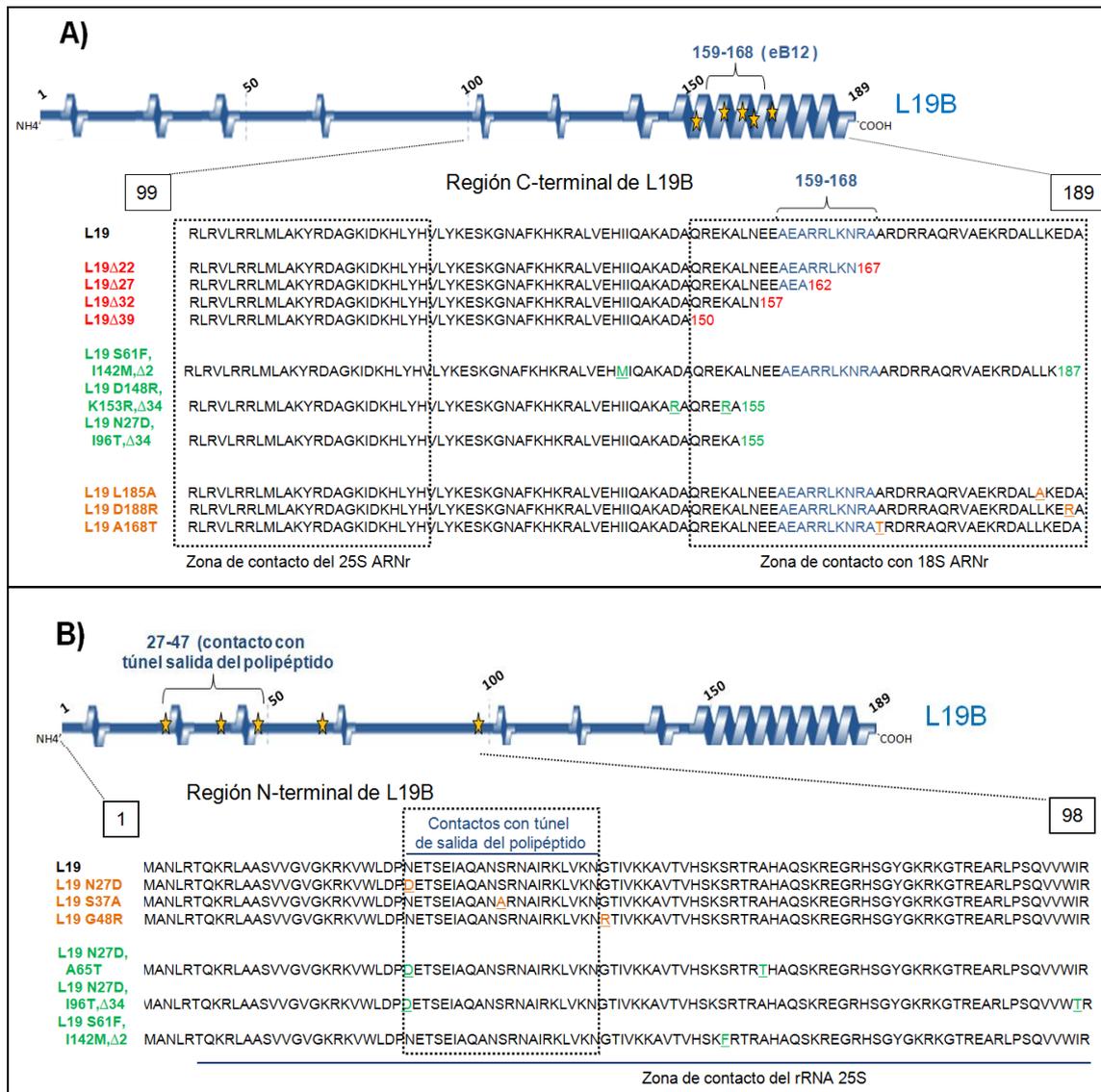


Figura 32. Cambios en la secuencia de aminoácidos causados por mutaciones en *RPL19B_{At}*.
 A) Se indica en rojo en la secuencia la posición de los cambios de aminoácidos que causan truncaciones de la zona C-terminal de L19e y en azul los residuos que forman parte del nuevo puente eucariótico eB12.
 A) y B) Se indican en verde las mutaciones presentes en dobles y triples mutantes, y en naranja las mutaciones simples que causan sustitución de un solo aminoácido por otro.

7.2. Alteraciones en las interacciones moleculares de la subunidad 60S y en el ribosoma 80S de *S. cerevisiae*

Utilizando las coordenadas de la estructura cristalográfica del ribosoma eucariótico 80S disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=99556>) (Ben-Shem *et al.*, 2011), es posible hacer predicciones bioinformáticas de las alteraciones que causarían distintas mutaciones en *rpl19b*_{At}* en la estructura del ribosoma. Usando dichas

coordinadas y el programa **UCSF-Chimera**, con la colaboración del Dr. Rafael Giraldo (investigador experto en cristalografía de proteínas del CIB, Madrid) se determinó la posición de los aminoácidos alterados en L19e por las distintas mutaciones que se seleccionaron en este trabajo. En la **Figura 33**, se representa una región de la subunidad 60S en contacto con la 40S, los ARN ribosómicos 18S y 25S de la levadura y varias RP localizadas en la primera capa en torno a L19e en la que se indican las posiciones que ocupan los aminoácidos sustituidos como consecuencia de las mutaciones.

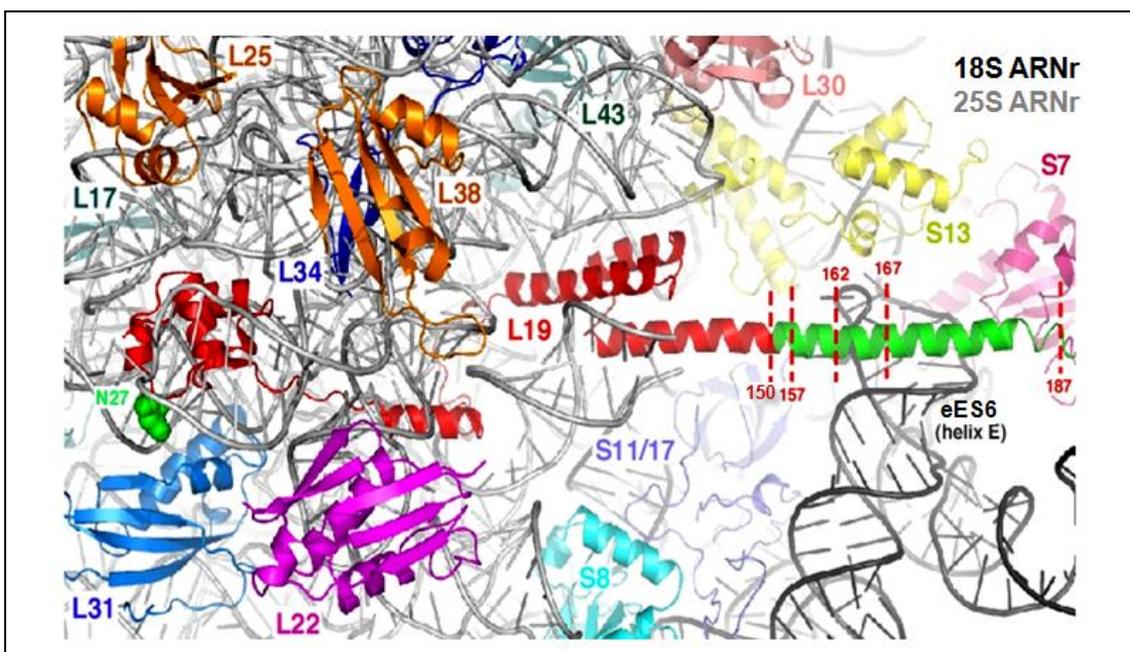


Figura 33. Representación en la estructura del ribosoma 80S de *S.cerevisiae* de las posiciones de los aminoácidos alterados en L19e. Los ARNr 25S y 18S se representan en gris y negro respectivamente. L19e se representa en rojo el extremo N-terminal y en verde el C-terminal. En la parte izquierda de la figura se indica en verde la posición del aminoácido N27, que aparece sustituido por aspártico (N27D) en dos de los mutantes seleccionados por su fenotipo *slg*. En la parte derecha de la figura, sobre el extremo C-terminal de L19e representado en verde, se indican mediante líneas discontinuas en rojo las posiciones en las que aparecen codones sin sentido que permiten predecir truncaciones de la proteína a partir de esas posiciones. Se representan en la figura las RP más cercanas en la estructura a L19e: L25 (marrón), L17 (verde oscuro), L38 (naranja), L34 (azul oscuro), L31 (azul) y L22 (morado), que forman parte junto con la zona N-terminal de L19e de un anillo que circunda al túnel de salida del polipéptido en la subunidad 60S (Peisker *et al.*, 2008; Gamalinda *et al.*, 2013). Por otra parte, el extremo C-terminal de L19e contacta con la hélice E del segmento de expansión eES6 del ARNr 18S y con las proteínas S7e (rosa) y S11/17 (violeta) de la subunidad 40S (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Las sustituciones de residuos aminoacídicos en la **región N-terminal** de L19e podrían alterar algunas interacciones directas de L19e con el ARNr 25S, o alterar la conformación intramolecular o plegamiento de la proteína dentro del ribosoma eucariótico, o afectar

indirectamente a las interacciones con otras RPL del ribosoma (ej. con las proteínas L17, L25 y L31). Sin embargo, no parecen esenciales dichos residuos ya que los cambios que producen no alteran perceptiblemente el crecimiento de los mutantes correspondientes.

Las **truncaciones de la zona C-terminal de L19e** alterarán interacciones directas de esta proteína con el ARNr 18S, concretamente con la hélice E del segmento de expansión ES6C, como se puede deducir de los datos publicados (Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2012) y de las predicciones bioinformáticas que se han llevado a cabo en este trabajo (**Figuras 33 y 34**). La α -hélice C-terminal de L19e (64 aminoácidos) es muy rica en lisinas y argininas (17 de los 64 aminoácidos) que establecerán interacciones electrostáticas con el ARNr 18S. La ausencia de una fracción importante del dominio C-terminal de L19e en los mutantes *rpl19b Δ CT* (L19e Δ CT, 22-39 aminoácidos) afecta gravemente al crecimiento celular. Mutaciones que provoquen cambios de aminoácidos en este dominio, podrían alterar interacciones intra o intermoleculares dentro de la subunidad 60S, y/o en la unión de subunidades 60S y 40S del ribosoma en el paso final del inicio de la traducción. L19e establece contacto directo con S7 (los residuos L185 y A189 de L19e interactúan físicamente con la R39 y S2 de S7, respectivamente) y con S11/17 (N156, E160 y R167 de L19e contactan con la F154, F156 y F156 de S17, respectivamente) (Ben-Shem *et al.*, 2011) y serían eliminados por las truncaciones C-terminales de la proteína (**Figura 34**).

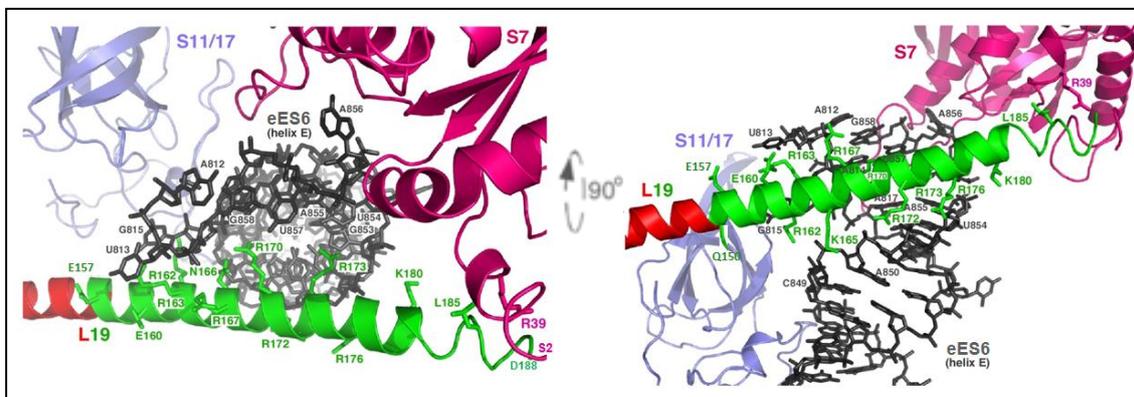


Figura 34. Representaciones de dos visiones ortogonales de la α -hélice del dominio C-terminal de L19e en la estructura del ribosoma. L19e se representa en rojo y, en verde, la zona terminal de la α -hélice donde se indican los residuos de aminoácidos básicos, lisina (K) y arginina (R) y las posiciones Q150, E157, R162 y R167 que quedan expuestos como consecuencia de las truncaciones. Se representa la proteína ribosómica S7e (en rosa) y S11/17 (en morado), y la hélice E del segmento de expansión eES6 del ARNr 18S (en negro).

A continuación se describe el análisis fenotípico que se ha realizado de algunos de estos mutantes *rpl19b* Δ _i* de *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO II:

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MUTANTES *rpl19*

En *S. cerevisiae*, son esenciales 64 proteínas ribosómicas de las 79 que componen el ribosoma citoplasmático 80S (Steffen *et al.*, 2012). Las funciones “primarias” de algunas de ellas (formando parte de los ribosomas) se han desvelado investigando los fenotipos que causan mutaciones de pérdida parcial de función (LOF, por *loss of function* en inglés) (Meskauskas and Dinman, 2001; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Meskauskas and Dinman, 2007; Rhodin *et al.*, 2011; Sulima *et al.*, 2014). Existen varios ejemplos de proteínas “L”, componentes de la subunidad mayor 60S del ribosoma, cuya función se ha descrito de ese modo. Así, la integridad molecular de la proteína L24 es esencial para el mantenimiento de la cinética normal de traducción, ya que su ausencia provoca una disminución en las tasas iniciales (Dresios *et al.*, 2000); L10 se requiere para la función de rotación de la subunidad 60S sobre la 40S durante la elongación de la traducción (Sulima *et al.*, 2014); L3 participa en la unión del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma (Rakauskaite and Dinman, 2011). L5 (Meskauskas and Dinman, 2001), L11 (Rhodin *et al.*, 2011) o L39 (Dresios *et al.*, 2000) se requieren para mantener la fidelidad de la traducción. Las proteínas L2 (Diedrich *et al.*, 2000), L5 (Spahn *et al.*, 2001), L10 (Eisinger *et al.*, 1997), L11 (Rhodin *et al.*, 2011), L29 (DeLabre *et al.*, 2002) y L33 (Martin-Marcos *et al.*, 2007), se requieren para la función de unión de las dos subunidades ribosómicas 60S y 40S en el codón de inicio de la traducción, el último paso de la fase de iniciación, ya que mutaciones en las mismas afectan a dicho proceso.

Además, algunas RP desempeñan funciones secundarias o extra-ribosómicas, tanto en levaduras como en organismos superiores (Wool, 1996; Chaudhuri *et al.*, 2007; Lindstrom, 2009; Warner and McIntosh, 2009; Xue and Barna, 2012; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013). Así, L30, L32 y S14 en *S. cerevisiae*, y S13 en humanos, regulan la escisión del intrón del propio gen que las codifica (Eng and Warner, 1991; Dabeva and Warner, 1993; Fewell and Woolford, 1999; Malygin *et al.*, 2007); L6 (Dieci *et al.*, 2009) y S20 (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994), ambas en *S. cerevisiae*, se asocian a la ARN-polimerasa III y facilitan la transcripción; L2 (Presutti *et al.*, 1991) y S28 (Badis *et al.*, 2004) promueven la degradación de sus propios ARNm; L38 facilita la traducción de los ARNm de algunos de los genes HOX, reguladores de la morfología del esqueleto axial en el ratón embrionario (Kondrashov *et al.*, 2011); L13a, en macrófagos de ratón, inhibe la traducción de proteínas implicadas en la inflamación (Mazumder *et al.*, 2003; Poddar *et al.*, 2013), etc.

Las funciones primarias, no extra-ribosómicas, de L19e se han investigado en este trabajo mediante el análisis fenotípico de mutantes viables *RPL19B_{Δi}* que se han descrito en el Capítulo I de esta Memoria. Disponer de mutantes permite investigar cómo afecta la incorporación en pre-ribosomas de L19e defectivas al procesamiento de los ARNr y a la incorporación de otras RPs o factores de ensamblaje (Capítulo III); y en los ribosomas maduros, cómo afectan las alteraciones de L19e a la traducción general de ARNm y/o de ARNm específicos (Capítulo IV).

En algunos casos, se podrán correlacionar sus fenotipos con las interacciones moleculares que alteran las respectivas mutaciones en las estructuras de alta resolución atómica (Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011; Rabl *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012). Además, en el futuro, los mutantes pueden servir para investigar cómo afecta la existencia de poblaciones de ribosomas maduros homogéneas o heterogéneas, con L19e alteradas de varias formas, al proteoma de la levadura, en diferentes medios de crecimiento o en condiciones de estrés particulares.

1. FENOTIPO DE MUTANTES *rpl19b**_{*Δi*}

1.1. Fenotipo de crecimiento

Se analizó por **estría en placa** el fenotipo de crecimiento de mutantes viables y haploides $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [rpl19b^*_{\Delta i}, CEN6 URA3]$ o $[rpl19b^*_{\Delta i}, CEN6 LEU2]$ y se comparó el tamaño de las colonias con las de la cepa WT isogénica con el alelo silvestre *RPL19B*. También se hicieron **diluciones seriadas** de células a partir de cultivos en fase exponencial y se aplicaron gotas de volumen definido en las placas de medio mínimo suplementado con los requerimientos nutricionales (en adelante, **SD**⁺) que imponen las auxotrofías de cada una de las dos cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$, Hm670 y TY1099, las cuales expresan alelos de *RPL19B* desde plásmidos con marcadores *URA3* y *LEU2*, respectivamente. Se emplearon también placas de medio rico YEPD; en todos los casos, las placas se incubaron a 18°C, 28°C y 37°C de 2 a 5 días, dependiendo del tipo de medio y la temperatura.

Como se muestra en la **Figura 35**, los mutantes que desarrollan colonias de menor tamaño, o exhiben un fenotipo *slg* más acentuado, a todas las temperaturas ensayadas y en ambos medios de cultivo, son aquellos que expresan alelos *rpl19b**_{*Δi*} con codones sin sentido en su secuencia de ADN, prematuros o anteriores al natural (el cual es un TAA en posición +570 del alelo *RPL19B* sin intrón, considerando +1 la A del ATG). Estos alelos y sus respectivos codones de terminación de la traducción prematuros en los ARNm se indican en adelante como *rpl19bΔ22* (UGA 499 en lugar de AGA, Arginina), *rpl19bΔ27* (UGA 484/AGA, Arginina), *rpl19bΔ32* (UAA 486/GAA, Aspártico), *rpl19bΔ39* (UAA 448/CAA, Glutámico). Estos codones de terminación prematura de la traducción se indicarán en adelante como **PTC499**, **PTC484**, **PTC486**, **PTC448**. A partir del análisis de sus secuencias se predice que estos alelos codificarán proteínas **L19e truncadas** en la región C-terminal, a las que denominaremos en adelante **L19Δ22**, **L19Δ27**, **L19Δ32** y **L19Δ39**. El *slg* de los mutantes respectivos es más exacerbado a 18°C sin llegar a ser completamente sensibles al frío (*cs*), y a 37°C en **SD**⁺, sin llegar a ser completamente termosensibles (*ts*). Estos fenotipos de sensibilidad a bajas y/o altas temperaturas se atribuyen generalmente a pérdida de función de una proteína más que a la

síntesis de una proteína termosensible en sí misma, que ocasionaría la letalidad del mutante condicional cuando se incubase a esas temperaturas. El fenotipo *cs* debido a mutaciones en RP se ha correlacionado con defectos en la biosíntesis de ribosomas en *S. cerevisiae*, pues al ser un proceso que requiere mucha energía, los mutantes afectados crecen peor a bajas temperaturas (Warner *et al.*, 2001; Cárdenas *et al.*, 2012; Mayerle and Woodson, 2013). También se ha observado el fenotipo *ts* en mutantes de proteínas RP que tienen defectos tanto en la biosíntesis de ribosomas como en la traducción por el ribosoma maduro (Mueller *et al.*, 1998; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Simoff *et al.*, 2009; Rhodin *et al.*, 2011). En nuestro caso, es posible que la proteína L19e mutante no aporte toda la función que se requiere para sostener la biogénesis de ribosomas a bajas temperaturas, ni la traducción a temperaturas elevadas en medio rico, condiciones a las que estos procesos tienen mayores requerimientos de síntesis y disponibilidad de componentes para una división celular más rápida.

A diferencia de los mutantes de truncación Δ CT, todos los mutantes *rpl19b**_{*Δi*} cuyos alelos tienen una sola **mutación puntual** que causa la sustitución de un aminoácido por otro diferente en L19e tienen un fenotipo de crecimiento *slg* poco marcado en relación al *SLG*⁺ de la cepa de partida Hm568 (Δ *rpl19a* Δ *rpl19b* [*RPL19B*_{*Δi*}, *CEN6 URA3*]), tanto los que tienen mutaciones en el extremo N-terminal como en el C-terminal de la proteína (**Figura 36 A**). Estos datos sugieren que, quizá, cambios en otros aminoácidos, o en varios aminoácidos a la vez, se requieren para causar una grave pérdida de función de L19e y un causar un fuerte fenotipo *slg*. Además, el hecho de haber obtenido con alta frecuencia mutantes letales (no sobreviven en ausencia del plásmido con un alelo WT de *RPL19B*), también sugeriría que la proteína L19e podría ser bastante refractaria a la mutagénesis, de modo que perdería totalmente su función o funciones cuando se alteran otros aminoácidos de la misma, distintos de aquellos alterados en mutantes viables de pérdida parcial de función obtenidos (*slg*).

Tanto la cepa que expresa el alelo *rpl19b* Δ 39 sin intrón como aquella que porta el alelo con intrón (*rpl19b*_(i) Δ 39), desarrollan colonias de menor tamaño que las de la cepa isogénica WT *RPL19B*, pero muy similar o idéntico entre ellas. Este dato sugiere que la presencia o ausencia del intrón en dicho alelo no afectaría significativamente a la síntesis de la proteína truncada 39 aminoácidos (**L19B Δ 39**) (**Figura 36 B**).

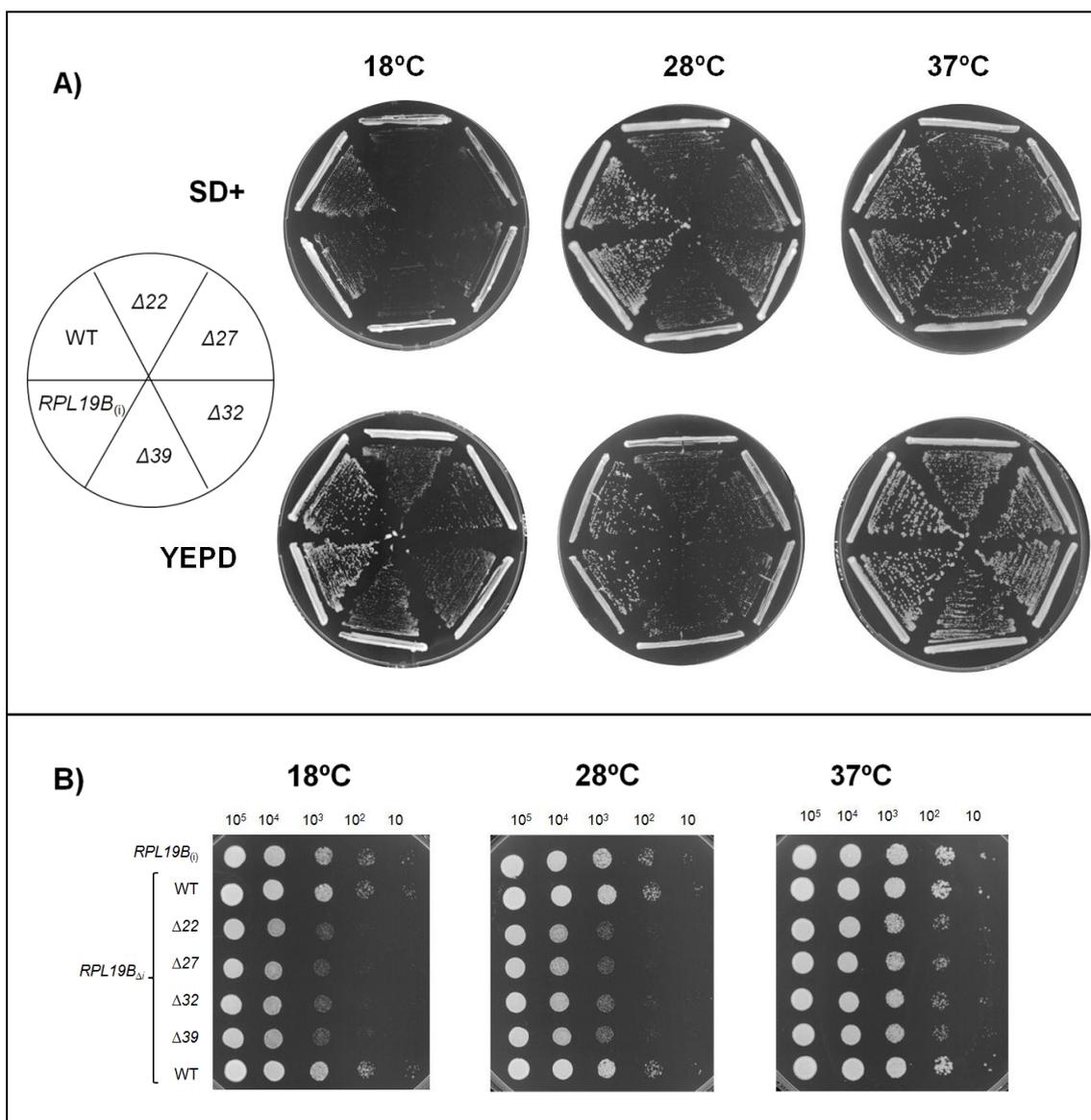


Figura 35. Fenotipo de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ con alelos mutantes en plásmidos episómicos [$rpl19b^{*_{\Delta b}}$ CEN6 URA3]. A) Colonias aisladas por estría en placas de SD⁺ y de YEPD de los mutantes indicados en el esquema de la izquierda de la figura en relación a la cepa WT isogénica. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 28°C y 37°C y durante 5-6 días a 18°C. B) A partir de cultivos en fase exponencial se hicieron diluciones seriadas hasta una DO₆₀₀ de 0,02 y se aplicaron volúmenes de ~3 μ l en gotas conteniendo de 1×10^5 a 10^1 células en placas de YEPD que se incubaron a 28°C y 37°C durante 2 días o durante 4 días a 18°C.

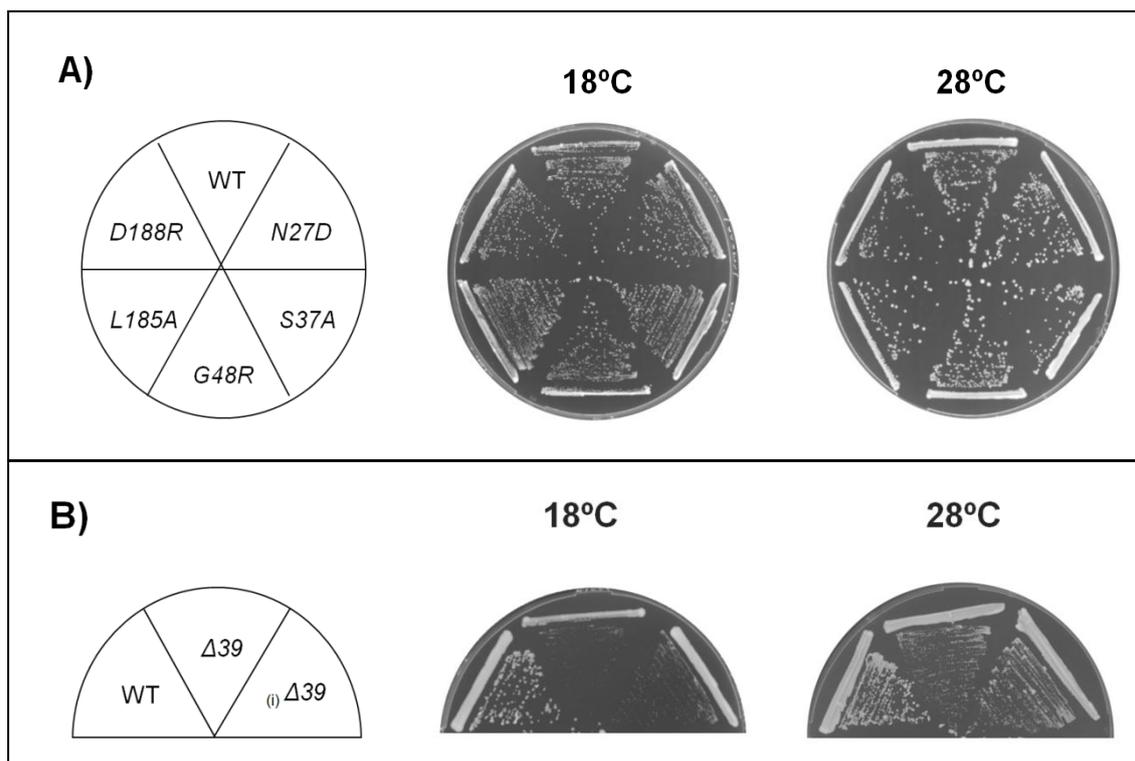


Figura 36. Fenotipo de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ con alelos mutantes obtenidos por mutagénesis dirigida y clonados en plásmidos centroméricos [$rpl19b^{*\Delta b}$, $CEN6 URA3$]. Colonias aisladas en placas de SD^+ de los mutantes indicados en los esquemas de la izquierda de la figura, y de la cepa WT isogénica. Las placas se incubaron durante 2 días a $28^\circ C$ y durante 5 días a $18^\circ C$. **A)** Colonias de varios mutantes puntuales. **B)** Colonias de dos cepas que portan los alelos $rpl19b\Delta39$ con o sin intrón.

Las cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [$rpl19b^{*\Delta b}$, $CEN6 URA3$] que exhibían fenotipos *slg* más severos por tamaño de colonia se crecieron en **medios líquidos** SD^+ e YEPD a varias temperaturas. Se siguió su cinética de crecimiento por medida periódica de la turbidez de los cultivos (DO_{600nm}), se representaron las curvas correspondientes y se calcularon los tiempos de generación (T_g) (**Figura 37** y **Tabla 7**). El mutante $rpl19b\Delta27$ (Hm574) tiene un tiempo de generación ligeramente mayor que el de otros mutantes, particularmente a $18^\circ C$, aunque la proteína **L19 Δ 27** tiene una truncación C-terminal menor que las que expresan los mutantes $rpl19b\Delta32$ (Hm573) y $rpl19b\Delta39$ (Hm661).

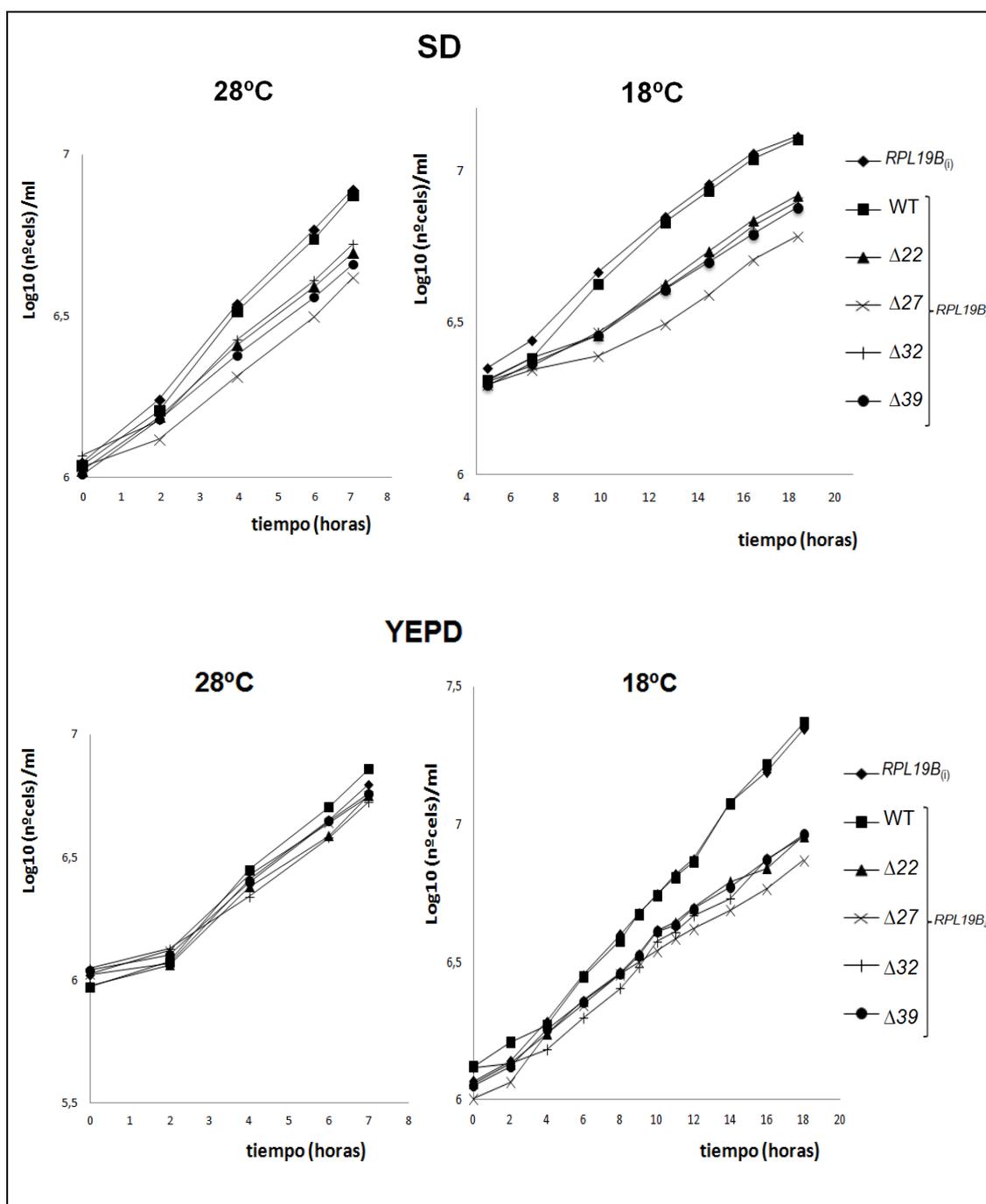


Figura 37. Representación semilogarítmica de las curvas de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl19a$ $\Delta rpl19b$ cuyos alelos episómicos tienen codones sin sentido prematuros [$rpl19b\Delta CT$, $CEN6 URA3$]. Los cultivos se incubaron a 28°C en SD⁺ o en YEPD y se tomaron medidas de DO₆₀₀ cada ~2 horas. Para valorar el crecimiento a 18°C, se emplearon cultivos crecidos previamente a 28°C hasta fase exponencial y se inocularon células de los mismos a DO₆₀₀ = 0,2 en medio fresco y se incubaron a 18°C durante 20 horas, recogiendo muestras cada ~2 horas. Cepas (♦) $RPL19B_{(i)}$; (■) $RPL19B_{\Delta i}$; (▲) $rpl19b\Delta 22$; (×) $rpl19b\Delta 27$; (+) $rpl19b\Delta 32$; (●) $rpl19b\Delta 39$.

CEPAS <i>Δrpl19a Δrpl19b</i> [<i>rpl19b*_{Δi}</i> , <i>CEN6 URA3</i>]	Tg SD ⁺		Tg YEPD	
	28°C	18°C	28°C	18°C
<i>RPL19B</i> _(i)	2h 30´	5h 50´	2h 25´	4h 35´
<i>RPL19B</i> _{Δi}	2h 25´	5h 50´	2h 15´	4h 25´
Δ22	3h 10´	8h 10´	2h 40´	5h 10´
Δ27	3h 40´	10h 40´	3h 20´	6h 10´
Δ32	3h 10´	8h 10´	2h 45´	5h 25´
Δ39	3h 15´	8h 30´	2h 45´	5h 30´

Tabla 7. Tiempos de generación de cepas isogénicas *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19b*_{Δi}, CEN6 URA3]*. El tiempo de generación (Tg) se estimó durante la fase exponencial temprana, en todos los casos, como la pendiente de las rectas correspondientes cuando el crecimiento se representó en función del tiempo y del logaritmo del número de células.

1.2. Fenotipo celular

Se recogieron células de mutantes *rpl19bΔCT* (Δ22, Δ27, Δ32, Δ39) y de la cepa WT *RPL19B* a partir de cultivos en medio rico incubados a varias temperaturas y se observaron al microscopio de contraste de fases. En los mutantes aparecen, tanto a 28°C como a 18°C, **grupos de tres células** en el 15-20% del total de las observadas, frente a un 5% en las células de la cepa WT. En estos grupos parece que una segunda yema emerge de la célula madre antes de separarse de la primera (**Figura 38**).

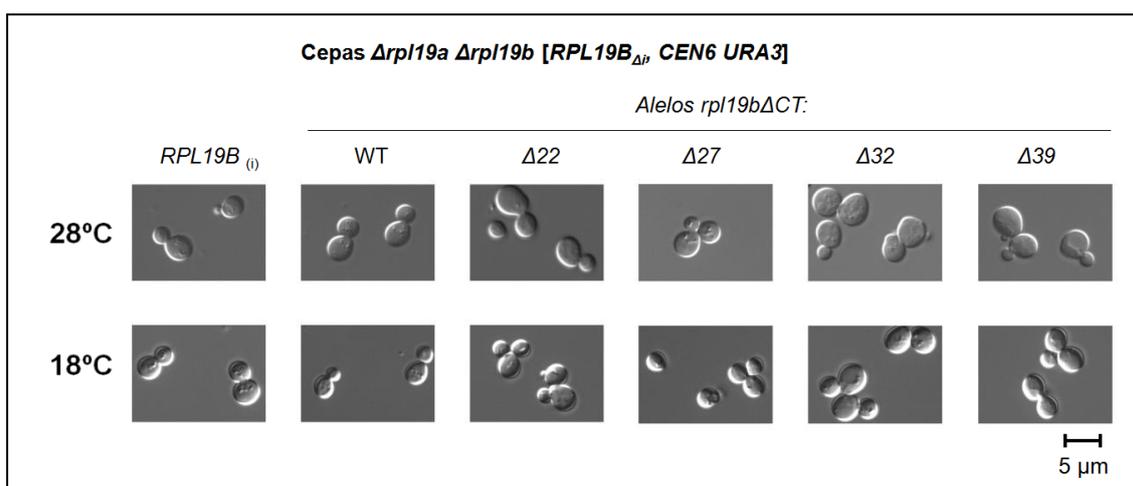


Figura 38. Observación de células de cepas isogénicas *Δrpl19a Δrpl19b* que expresan diferentes alelos *rpl19bΔCT* (*CEN6 URA3*). Se muestran imágenes de DIC (contraste de interferencia diferencial) correspondientes a células crecidas en YEPD a 28°C o a 18°C durante 24h.

2. FENOTIPO DE MUTANTES *pGAL::rpl19b**_{Δi}

Los mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19bΔCT, CEN6 URA3]* tienen fenotipo *slg*. Sin embargo, la expresión de uno solo de los genes parálogos en un mutante de doble delección y en plásmidos de bajo número de copias podría causar cierta pseudo-haploinsuficiencia de proteína L19e* y contribuir a dicho fenotipo. Para soslayar este problema potencial y determinar si las mutaciones son las únicas responsables del fenotipo *slg* de cada mutante, se obtuvieron versiones con un promotor fuerte *GAL1-GAL10* de *S. cerevisiae* (Johnston and Davis, 1984). Las ORF de los alelos *rpl19bΔ22*, *rpl19bΔ27*, *rpl19bΔ32* y *rpl19bΔ39* se amplificaron por PCR con una ADN-polimerasa de alta fidelidad, usando como cebadores los oligonucleótidos O1432-*Bam*HI y O1397-*Pst*I (Tabla III de los Anexos). Las secuencias amplificadas (850 bp) se clonaron en los vectores **TK884** [*pGAL::RPL19B_{Δi}, CEN4 LEU2*] y **TK891** [*pGAL::RPL19B_{Δi}, CEN4 URA3*], de modo que los alelos resultantes tienen las mismas secuencias en 3' (280 bp) que flanquean a la ORF silvestre de *RPL19B* (Figura 39). Se obtuvieron así 4 plásmidos [*pGAL::rpl19bΔCT, CEN4 LEU2*] y [*pGAL::rpl19bΔCT, CEN4 URA3*] (Tabla 8) (Materiales y Métodos).

VECTOR TK884	ALELO	VECTOR TK891	ALELO
Plásmidos [<i>pGAL::rpl19bΔCT, CEN4 LEU2</i>]		Plásmidos [<i>pGAL::rpl19bΔCT, CEN4 URA3</i>]	
pAJ32	<i>RPL19B_{Δi}</i>	pAJ37	<i>RPL19B_{Δi}</i>
pAJ33	<i>rpl19bΔ39</i>	pAJ38	<i>rpl19bΔ39</i>
pAJ34	<i>rpl19bΔ32</i>	pAJ39	<i>rpl19bΔ32</i>
pAJ35	<i>rpl19bΔ27</i>	pAJ40	<i>rpl19bΔ27</i>
pAJ36	<i>rpl19bΔ22</i>	pAJ41	<i>rpl19bΔ22</i>

Tabla 8. Plásmidos portadores de los alelos mutantes de expresión condicional *pGAL::rpl19bΔCT*.

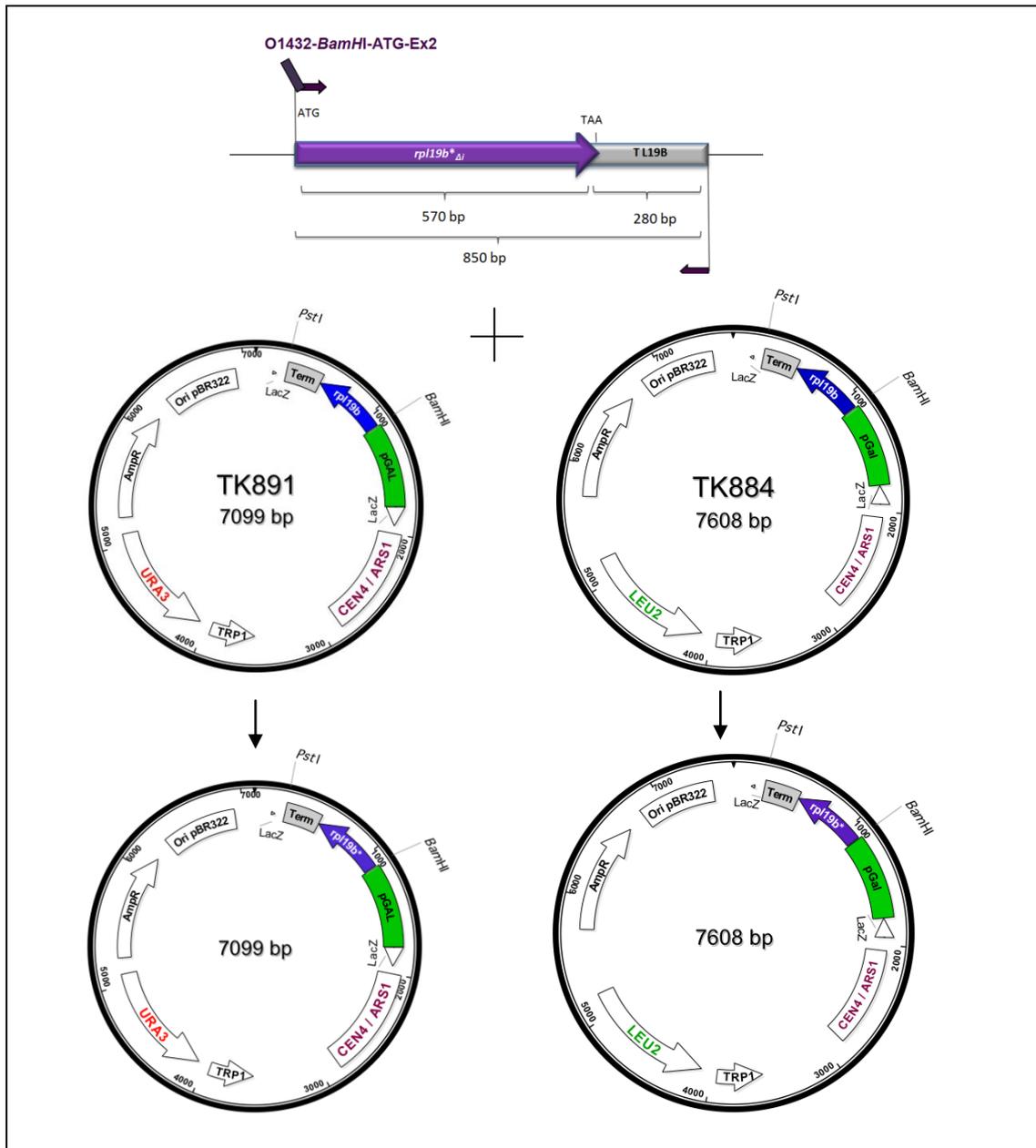


Figura 39. Obtención de versiones de plásmidos con alelos mutantes *pGAL::rpl19bΔCT*. Esquema de la amplificación de las ORF de los alelos mutantes y oligonucleótidos empleados como cebadores; mapas simplificados de los vectores TK891 y TK894 indicando las secuencias o genes de interés; plásmidos que contienen alelos mutantes *pGAL*: pAJ38 (*rpl19bΔ39*), pAJ39 (*rpl19bΔ32*), pAJ40 (*rpl19bΔ27*) y pAJ41 (*rpl19bΔ22*) (*[pGAL::rpl19bΔCT, URA3]*); y pAJ33 (*rpl19bΔ39*), pAJ34 (*rpl19bΔ32*), pAJ35 (*rpl19bΔ27*) y pAJ36 (*rpl19bΔ22*) (*[pGAL::rpl19bΔCT, LEU2]*).

Para analizar el fenotipo de crecimiento que confieren alelos mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* se transformó la cepa Hm566 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b leu2\Delta [RPL19B, CEN6 URA3]$) con los plásmidos mutantes [*pGAL::rpl19bΔCT, LEU2*] y la cepa Hm567 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b ura3\Delta [RPL19B, CEN6 LEU2]$) con plásmidos [*pGAL::rpl19bΔCT, URA3*]. En el primer caso se seleccionaron positivamente auxótrofos de uracilo en medio 5-FOA y en el segundo auxótrofos de leucina que se verificaron adecuadamente. Todos los mutantes sobreviven a expensas de un único alelo mutante *pGAL::rpl19bΔCT* episómico y sólo crecen en medio con galactosa **SG⁺**.

El **fenotipo de crecimiento** de transformantes *pGAL::rpl19bΔCT* se analizó en relación al de las respectivas cepas silvestres *pGAL::RPL19B_{Δi}* comparando el tamaño de las colonias que desarrollan en placas incubadas a 18°C, 28°C o 37°C. En la **Figura 40 A** se aprecia que la sobreexpresión de alelos mutantes también confiere a las cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ fenotipos *slg*. Todas las cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [pGAL::rpl19b\Delta CT]$ se cultivaron en medio líquido SG⁺ a varias temperaturas, se siguió su crecimiento y se calcularon los tiempos de generación (Tg) (**Figura 41 y Tabla 9**). Los mutantes *rpl19bΔ27* y *rpl19bΔ39* son los que tienen mayor defecto. Estos resultados indican que el fenotipo *slg* **se debería exclusivamente a las mutaciones** y no a una potencial pseudo-haploinsuficiencia cuando se expresan alelos *rpl19bΔCT* en cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$. Para corroborar esta conclusión, se compararon los **fenotipos *slg*** de los dos tipos de mutantes en medio con galactosa, en el que ambos tipos de cepas son capaces de crecer. Como se muestra en la **Figura 40 B**, el *slg* que confiere cada mutación *rpl19bΔCT* ni se acentúa ni se alivia al expresar alelos fusionados al promotor fuerte *pGAL*, excepto en el mutante *pGAL::rpl19bΔ39*, cuyo fenotipo *slg* es más exacerbado que cuando se expresa desde el promotor natural, y en el mutante *pGAL::rpl19bΔ27*, que es menos severo.

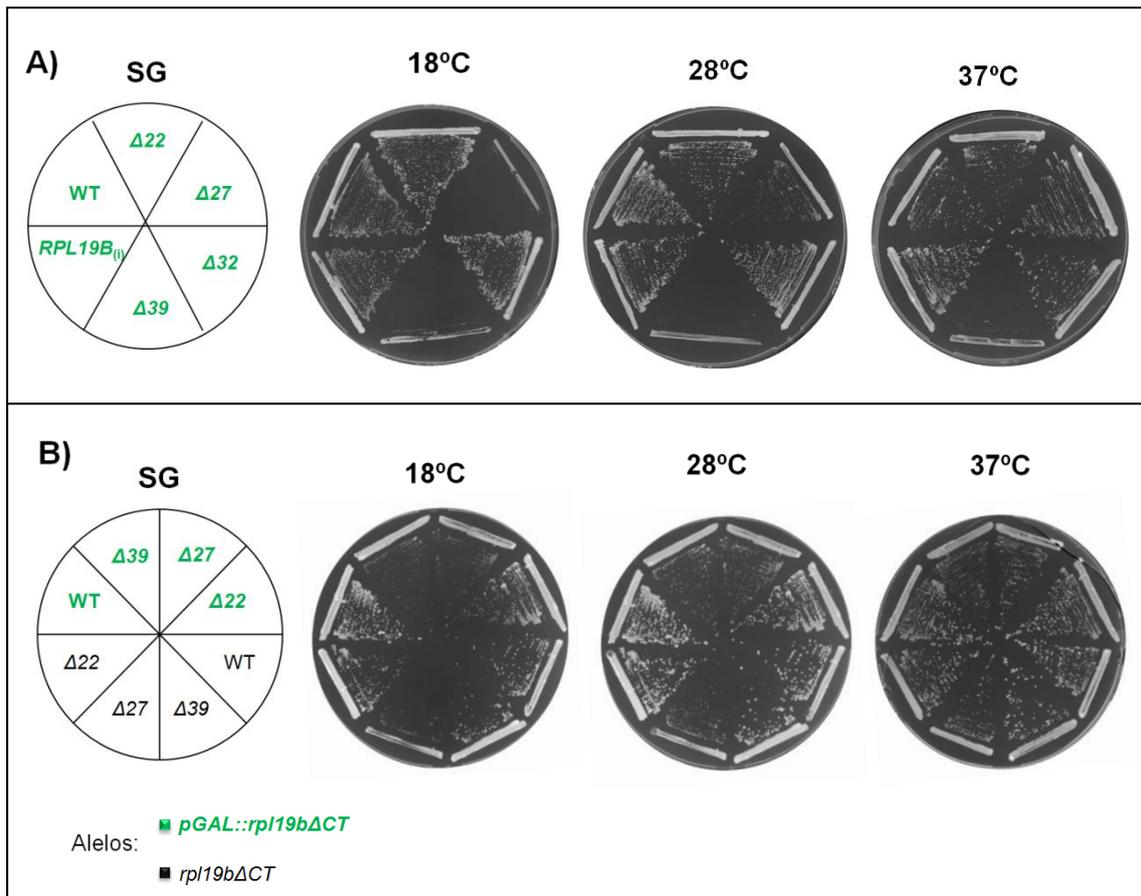


Figura 40. Crecimiento en placa de mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* ($\Delta rpl19a$ $\Delta rpl19b$). Colonias en placas de SG⁺ de las cepas que se indican se incubaron 3 días a 28°C y 37°C, y 7 días a 18°C. **A)** Mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* y **B)** Análisis comparativo de mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* y *rpl19bΔCT*.

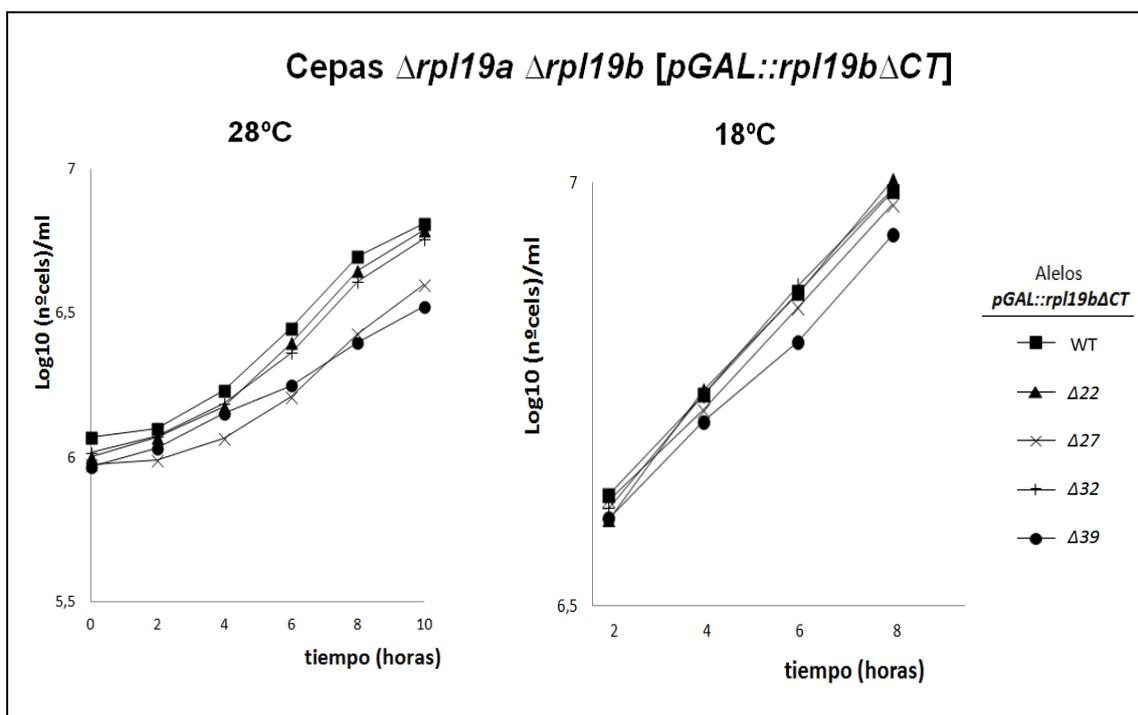


Figura 41. Crecimiento en medio líquido SG⁺ de mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ pGAL::*rpl19b\Delta CT*. Células de cultivos en fase exponencial a 28°C se diluyeron a una DO₆₀₀ = 0,4 y se transfirieron a 18°C 9 horas.

CEPAS $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [pGAL:: <i>rpl19b\Delta CT</i>]	Tg 28°C	Tg 18°C
WT	1h 50´	5h 15´
$\Delta 22$	1h 50´	5h 30´
$\Delta 27$	2h 10´	5h 50´
$\Delta 32$	1h 50´	5h 30´
$\Delta 39$	2h 40´	7h

Tabla 9. Tiempos de generación de mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ pGAL::*rpl19b\Delta CT* cultivados en medio líquido SG⁺ a 28°C y 18°C.

3. CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS *rpl19b*ΔCT

Se valoró mediante análisis de northern la **cantidad neta** (*steady state*) de los ARNm *rpl19b*ΔCT en el fondo genético habitual $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ para determinar si las mutaciones causan reducciones de los mismos. Para ello, se obtuvo ARN total de células *rpl19b*ΔCT y *pGAL::rpl19b*ΔCT.

Además, se analizó también en estos ensayos la cantidad de los ARNm transcritos a partir de alelos de fusión *pS28::FLAG::rpl19b*ΔCT, que expresan desde el promotor fuerte de la proteína ribosómica rpS28 (S28) proteínas L19e fusionadas a un epítipo FLAG en su extremo N-terminal (**FLAG::L19e**) (Materiales y Métodos). Estas construcciones se emplearon para analizar mediante ensayos de western blot que efectivamente se sintetizan proteínas truncadas **L19**ΔCT a partir de ARNm *rpl19b*ΔCT con distintos PTCs (**Figura 43**). La estructura de los alelos de fusión *pS28::FLAG::rpl19b*ΔCT, y su clonación en plásmidos *CEN4 LEU2* se muestra en el esquema de la **Figura 91** (en Materiales y Métodos) y todos ellos se resumen en la **Tabla 10**. Con estos plásmidos se transformó la cepa Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B*_{Δi} *CEN4 URA3*]) y se seleccionaron transformantes que con los alelos *FLAG::rpl19b*ΔCT que han perdido el plásmido *pGAL::RPL19B*_{Δi}. El crecimiento de las cepas resultantes, capaces de crecer en SD⁺, se analizó a 28°C y se comprobó así que los fenotipos *slg* eran similares a los que confieren los alelos con su promotor natural y sin FLAG. Un ejemplo de ellos se muestra en la **Figura 42**.

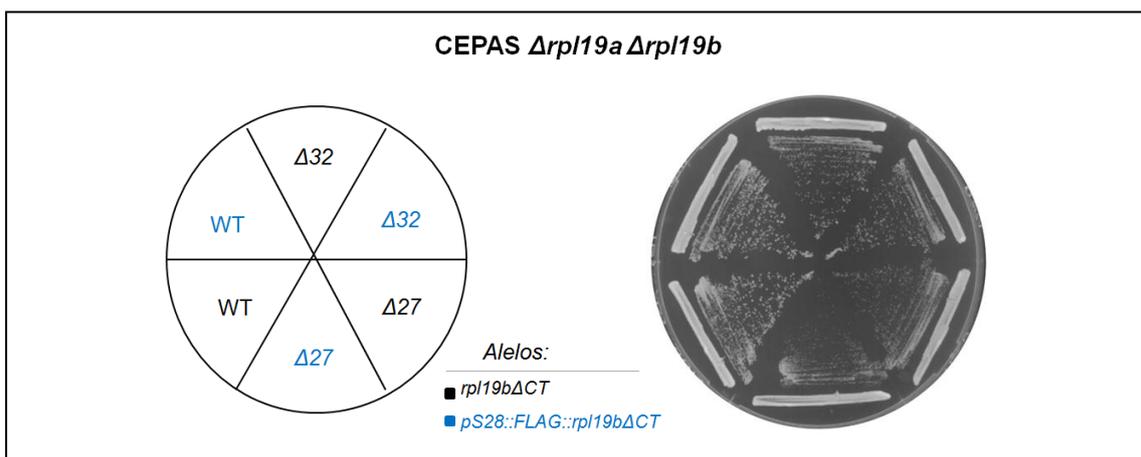


Figura 42. Crecimiento en SD⁺ de mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pS28::FLAG::rpl19b*ΔCT] y $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19b*ΔCT].

PLÁSMIDO	ALELO	PLÁSMIDO	ALELO
Vector TK349 <i>2μM URA3</i>	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔCT</i>	Vector TK891 <i>CEN4 URA3</i>	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔCT</i>
pAJ46	<i>RPL19B_{Δi}</i>	pAJ56	<i>RPL19B_{Δi}</i>
pAJ47	<i>rpl19bΔ39</i>	pAJ57	<i>rpl19bΔ39</i>
pAJ48	<i>rpl19bΔ32</i>	pAJ58	<i>rpl19bΔ32</i>
pAJ49	<i>rpl19bΔ27</i>	pAJ59	<i>rpl19bΔ27</i>
pAJ50	<i>rpl19bΔ22</i>	pAJ60	<i>rpl19bΔ22</i>

Tabla 10. Alelos de fusión *pS28::FLAG::rpl19bΔCT* y plásmidos en los que están clonados.

Se purificaron ARNs totales de todas las cepas anteriores a partir del mismo número de células crecidas en SD⁺ a 28°C y a 18°C hasta fase exponencial. Se analizaron 12 μg de ARN total que se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con una sonda molecular marcada radiactivamente que detecta específicamente el ARNm de *RPL19B* y no el de *RPL19A* (oligonucleótido *1-ARNm-B*, **Tabla IV de los Anexos**). Como control de carga se usó el ARN *SCR1*. La cuantificación de las señales de hibridación revela que, a 28°C, la cantidad de los ARNm de los alelos mutantes *rpl19bΔ22* (TGA), *rpl19bΔ27* (TGA), *rpl19bΔ32* (TAA), *rpl19bΔ39* (TAA), expresados desde su promotor natural disminuye ligeramente respecto a la cantidad del ARNm *RPL19B_{Δi}* (WT) en cepas isogénicas *Δrpl19a Δrpl19b*. Las cantidades de los ARNm de transcritos de fusión *pS28::FLAG::rpl19bΔCT CEN4* son similares en mutantes y WT (**Figura 43**).

Por el contrario, en los mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* se observa, tanto a 28°C como a 18°C, que la cantidad de los ARNm de transcritos de *rpl19bΔ22* (TGA), *rpl19bΔ27* (TGA), *rpl19bΔ32* (TAA), *rpl19bΔ39* (TAA), disminuye significativamente respecto a las cantidades de transcrito de *RPL19B_{Δi}* en la cepa WT. Además, la reducción en la cantidad de los transcritos es progresivamente más acusada a medida que el PTC está más alejado del extremo 3' terminal correspondiente (570 nt) idéntico en cada uno de ellos (**Figura 43**) (Ver página 170 de la Discusión). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la cantidad del transcrito de fusión *pGAL::RPL19B_{Δi}* es ~5 veces mayor que la del transcrito natural del gen *RPL19B* (**Figura 26 A**).

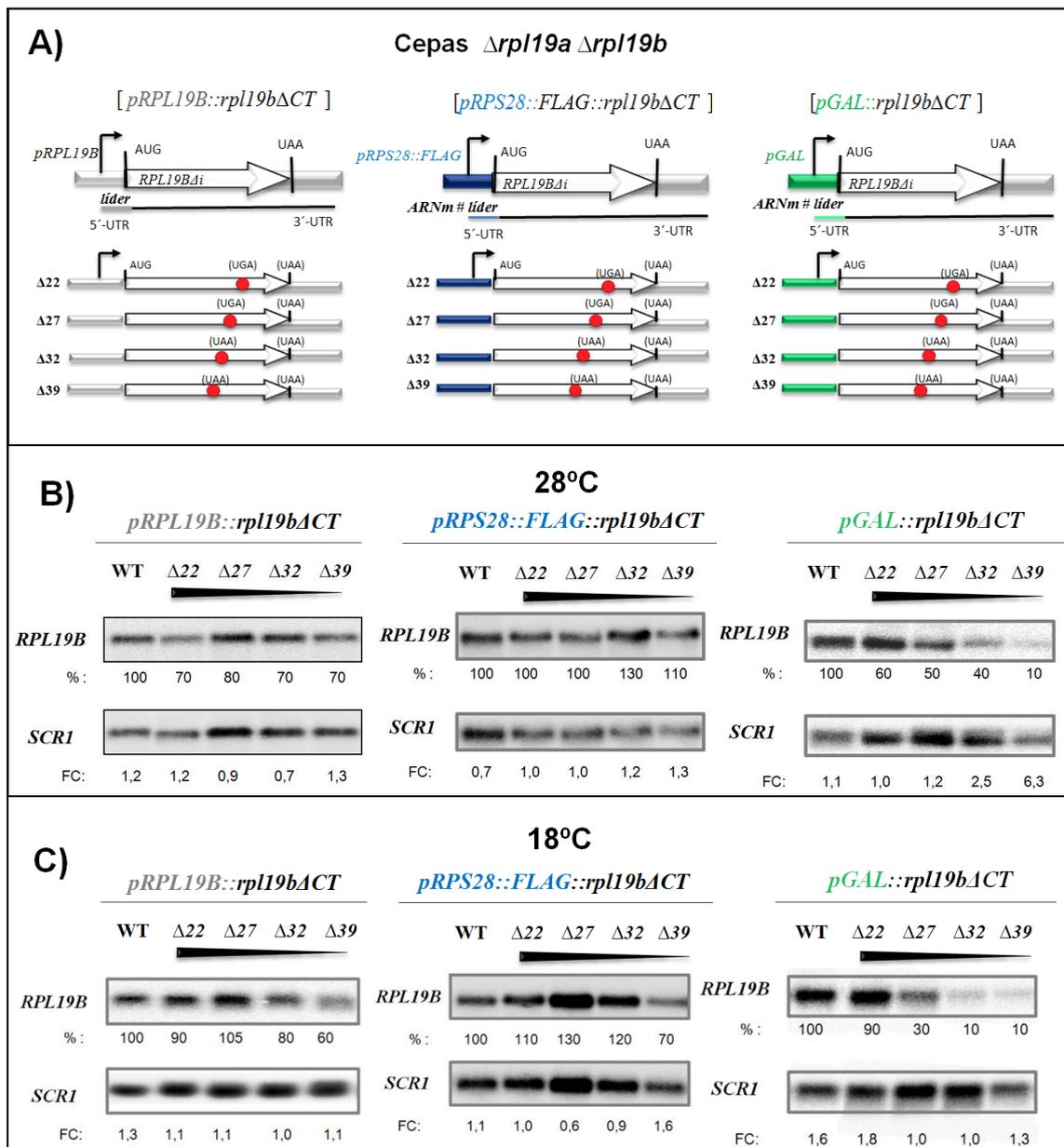


Figura 43. Análisis de las cantidades de ARNm transcritos a partir de diferentes alelos *rpl19bΔCT*.

A) Representación esquemática de la estructura de los ARNm que se transcribirán a partir de los diferentes alelos mutantes *rpl19bΔCT*, bien con su promotor natural (en gris), con el promotor S28 seguido del epítipo FLAG (en azul), o con el promotor inducible por galactosa *pGAL* (en verde). Las secuencias en 3' no codificantes son idénticas en tamaño y secuencia en todos los alelos construidos. Con puntos rojos se indican los codones de terminación en el ARNm de cada alelo mutante *rpl19bΔCT* y la posición relativa de cada uno en relación a la posición +1 del AUG en los alelos sin intrón en todos los casos. **B) y C)** Análisis de northern y determinación de las cantidades netas de ARNm de cada alelo mutante *rpl19bΔCT*, valoradas usando como sonda un oligonucleótido de 32 nt marcado radiactivamente que hibrida específicamente con el ARNm de *RPL19B*. Se indican las cantidades relativas de cada ARNm expresadas en porcentajes respecto al 100% atribuido a la cantidad de la cepa WT *RPL19B_{Δi}*. Los valores se normalizaron respecto a la cantidad del transcrito de la PolIII *SCR1*. **B)** ARNs de células crecidas a 28°C. **C)** ARNs de células crecidas a 18°C.

Para comprobar si los PTC presentes en la secuencia de los ARNm de los diferentes alelos mutantes *rpl19bΔCT* determinan, efectivamente, la **síntesis de proteínas L19eΔCT** de menor tamaño que L19e y si se producen en cantidades similares, se hicieron análisis de western blot. Para ello, se obtuvieron extractos de proteínas de cultivos de células crecidas hasta fase exponencial a 28°C y a 18°C en medio SD⁺ o YEPD. Se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales α-FLAG para detectar la proteína FLAG-L19e, y α-tubulina (TUB1), como control de carga de referencia.

Los resultados de la **Figura 44** demuestran que se sintetizan proteínas estables L19eΔCT y que son progresivamente de menor tamaño que L19e (189 aminoácidos), L19Δ22 (167 aa), L19Δ27 (162 aa), L19Δ32 (157 aa) y L19Δ39 (150 aa).

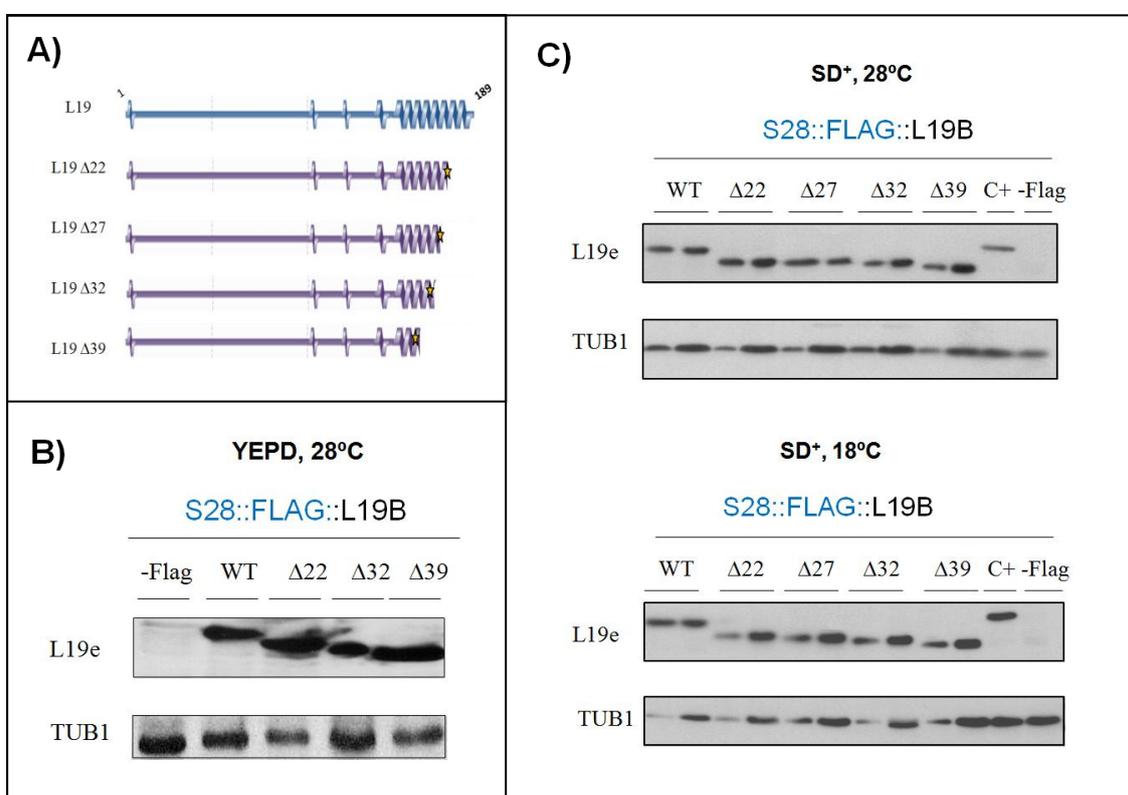


Figura 44. Detección de las proteínas L19eΔCT que sintetizan los mutantes *rpl19bΔCT*.

A) Representación esquemática de la estructura secundaria de las proteínas WT L19e (en azul) y L19eΔCT truncadas (en morado). La posición de la truncación en las proteínas L19eΔCT se indica con una estrella amarilla. **B) y C)** Análisis de la cantidad de proteínas marcadas FLAG::L19eΔCT en los correspondientes mutantes mediante western blot. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. **B)** Extractos de células cultivadas en YEPD a 28°C y **C)** en SD⁺ a 28°C y a 18°C. De cada muestra se cargaron dos volúmenes (2,5 y 5 μl) de extractos de proteína total obtenidos del mismo número de células de todas las cepas.

4. RESPUESTA A ESTRÉS DE MUTANTES *rpl19bΔCT*

Se analizó la respuesta fisiológica de los mutantes *rpl19bΔCT* a diferentes tipos de estrés abiótico, para lo que se utilizaron los siguientes agentes estresantes:

- **NaCl**: produce estrés osmótico e inhibe la biosíntesis de la pared celular. Además, en *S. cerevisiae* se ha descrito que este tipo de estrés produce una disminución de los niveles de los pre-ARNm de las proteínas ribosómicas (Garre *et al.*, 2013).
- **Sorbitol**: es un estabilizador osmótico que mantiene la integridad de la pared celular.
- **H₂O₂**: produce estrés oxidativo, aumentando la cantidad de radicales libres de oxígeno en la célula que podrían afectar a diferentes procesos.
- **Tampón fosfato para pH alcalino**: el pH del medio en el que se encuentran las levaduras influye directamente tanto en su crecimiento, como en su fisiología y diferenciación. En *S. cerevisiae*, en respuesta a pH alcalino, se activa la ruta de integridad celular (ruta PKC), aumentando la expresión de genes relacionados con la pared (Serrano *et al.*, 2006).
- **Tunicamicina**: produce estrés del retículo endoplasmático inducido por una respuesta a proteínas mal plegadas (Chan and Egan, 2005).
- **DTT**: causa estrés del retículo al reducir los puentes disulfuro de las proteínas.
- **SDS**: produce desnaturalización de proteínas, pudiendo producir estrés de retículo y afectando a la pared celular.
- **Cafeína**: no se conoce bien su mecanismo de acción, pero se ha descrito que interfiere con quinasas de pared (sobre todo con la PKC), afectando por ello a la estructura de la pared celular (Martin *et al.*, 2000). Inhibe además la síntesis de aminoácidos (Parenteau *et al.*, 2008).
- **Calcoflúor**: provoca estrés en la pared celular, inhibiendo su biosíntesis.

Para evaluar la resistencia o sensibilidad de los mutantes *rpl19bΔCT* frente a cada tipo de estrés, se suplementaron placas de YEPD (o de SD en el caso del tampón fosfato) con diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos estresantes indicados. Se realizaron ensayos de **goteo** en placas que se incubaron de 3 a 5 días (en función de cada suplemento) a 28°C.

Como se observa en la **Figura 45**, los mutantes *rpl19bΔCT* presentan cierta sensibilidad al estrés osmótico relacionado con la pared celular (NaCl 0,7M, sorbitol 0,6M y calcoflúor 0,01M) y al estrés oxidativo (H₂O₂ 0,5mM). Tanto los mutantes como la cepa WT son sensibles a SDS al 0,02%.

Se ha descrito que, durante el estrés osmótico, aumenta la degradación de los ARNm de las RP (Garre *et al.*, 2013). Puede que los ARNm *rpl19bΔCT* sean aun más inestables en presencia de sales como el NaCl que el ARNm *RPL19B_{Δi}* de la cepa WT. En cualquier caso, estos resultados indicarían que una parte del dominio C-terminal de L19e es necesario para la respuesta fisiológica al estrés salino y oxidativo en *S. cerevisiae*.

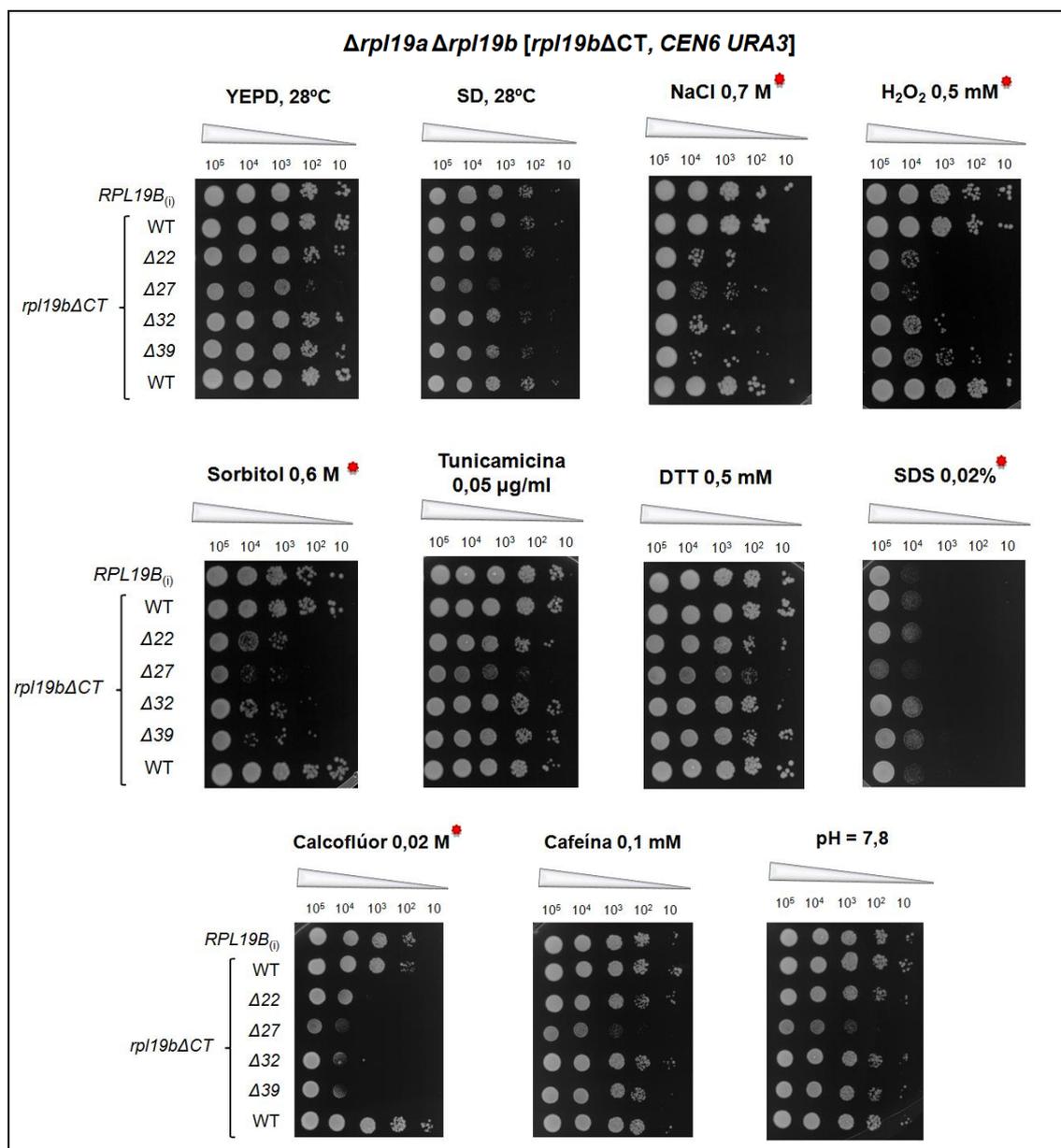


Figura 45. Respuesta fisiológica de mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19bΔCT, CEN6 URA3]* frente a diferentes tipos de estrés. Células de cepas mutantes se cultivaron en YEPD hasta fase exponencial, se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,02 y se hicieron diluciones seriadas en placas de YEPD o SD⁺ suplementadas con distintas concentraciones de agentes estresantes: NaCl (0,7 M), H₂O₂ (0,5 mM), sorbitol (0,6 M), tunicamicina (0,05 μg/ml), DTT (0,5 mM), SDS (0,02%), calcoflúor (0,02 M), cafeína (0,1 mM) y tampón fosfato (hasta pH = 7,8). Las placas se incubaron a 28°C de 3 a 5 días. Con un asterisco rojo se indican los compuestos a los que son sensibles las cepas mutantes.

5. FENOTIPO DE MUTANTES PSEUDO-HAPLOINSUFICIENTES DE L19e

En cepas de levadura haploides con delección de uno de los dos genes parálogos, *Δrpl19a* o *Δrpl19b*, la cantidad de proteína L19e producida por la expresión de uno solo de los genes puede causar distinto grado de pseudo-haploinsuficiencia. En este trabajo, se han investigado algunos fenotipos debidos a la delección alternativa de uno de los dos genes parálogos, *RPL19A* o de *RPL19B*, en cepas de *S. cerevisiae*.

5.1. Fenotipo de crecimiento

Disponíamos de cepas haploides de *S. cerevisiae* de la colección de cepas generadas en el proyecto Euroscarf (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/yeast.html>): **BY4741** es la cepa tipo silvestre haploide, y las cepas isogénicas de delección, Y07156 (*Δrpl19a*) y Y03053 (*Δrpl19b*). Como se observa en la **Figura 46**, la falta de L19A causa una reducción del crecimiento de las colonias más acusado que la falta de L19B. Este dato concuerda con los datos de la literatura que indican que, aunque el ARNm de *RPL19B* se transcribe hasta 2,3 veces más en relación a la cantidad de ARNm de *RPL19A* (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), la vida media de L19A es mucho más larga (985 min) que la de L19B (48 min) (Belle *et al.*, 2006).

El fenotipo *slg* que causa cada una de las delecciones en medio sólido se observa en cualquiera de los medios y temperaturas empleadas, pero es más exacerbado a 18°C. Estas mismas diferencias de crecimiento se observan a 37°C, aunque el *slg* es menos acusado en relación a la cepa isogénica WT que a 28°C y a 18°C. Estas cepas se crecieron además en **medios líquidos** SD⁺ e YEPD a varias temperaturas y se calcularon sus tiempos de generación (Tg) (**Figura 47 y Tabla 11**). Tanto en medio líquido como en medio sólido, la falta del gen parálogo *RPL19A* reduce más el crecimiento de las cepas haploides que la falta del parálogo *RPL19B*. Este resultado concuerda con los datos bibliográficos indicados arriba.

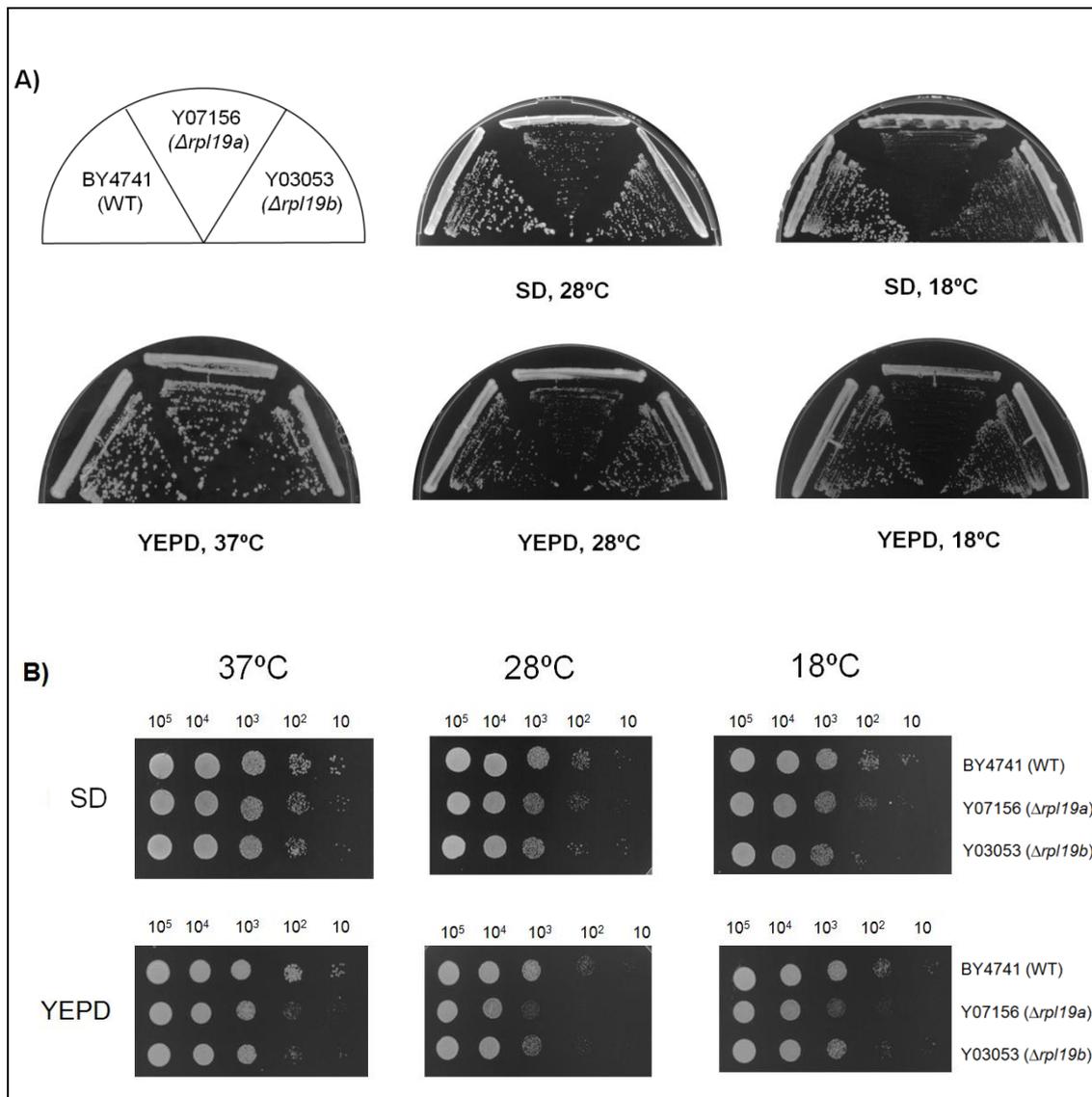


Figura 46. Fenotipo *slg* de mutantes de delección $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ en el fondo genético BY4741.

A) Se hicieron estrías en SD⁺ y en YEPD, que se incubaron a 28°C o 37°C durante 2-3 días, y a 18°C durante 5 días. **B)** Cultivos en fase exponencial se diluyeron hasta una DO₆₀₀ = 0,02 y se hicieron diluciones seriadas de células con las que se sembraron gotas de 3 μ l (con 1×10^5 - 10 células/gota) en placas de SD⁺ e YEPD, que se incubaron a 28°C y 37°C durante 2 días, o a 18°C durante 4 días.

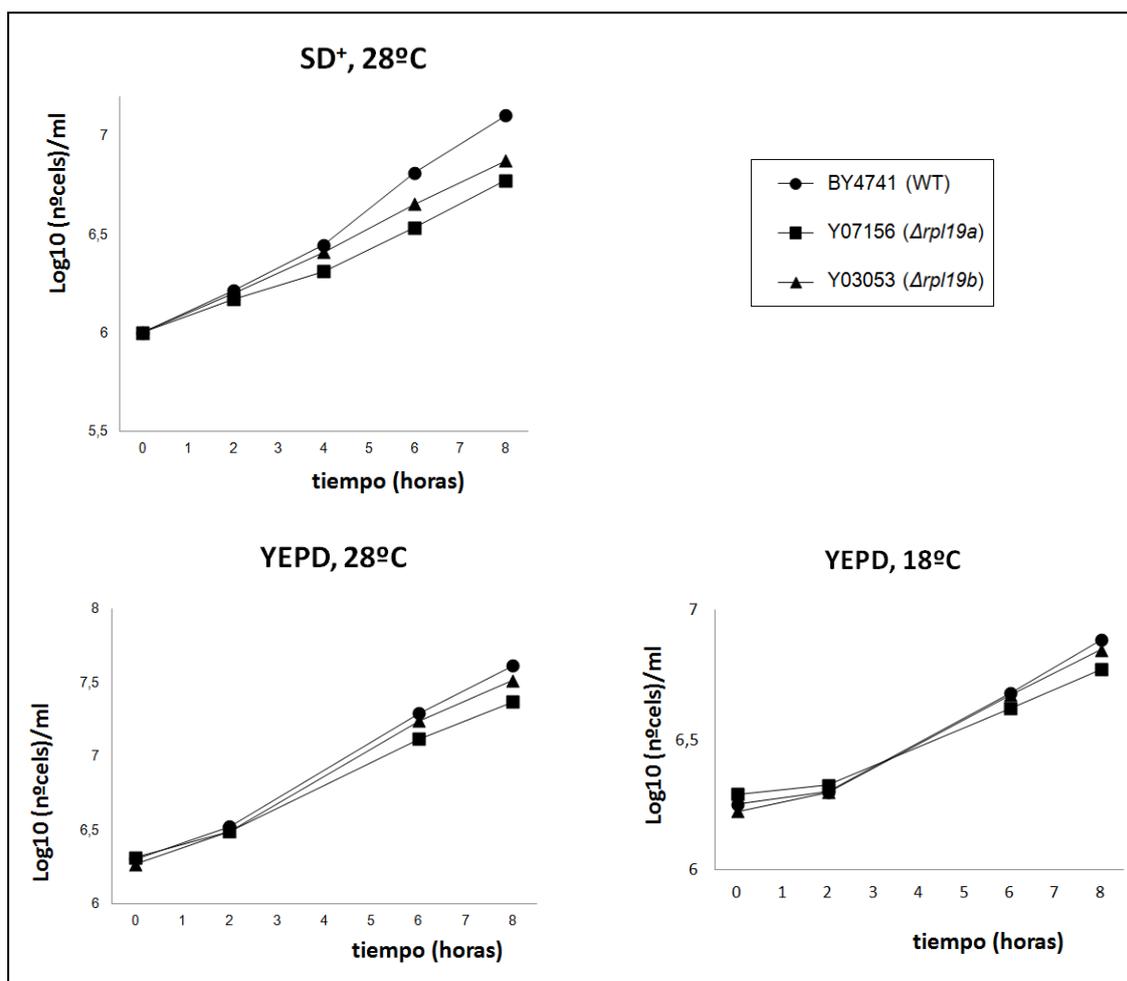


Figura 47. Curvas de crecimiento de las cepas isogénicas de *S. cerevisiae* BY4741 con la delección de uno de los genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B*. Se incubaron cultivos a 28°C en SD⁺ y en YEPD y se tomaron medidas de la DO₆₀₀ cada ~2 horas. Cultivos a 28°C en fase exponencial se diluyeron a una DO₆₀₀ = 0,2 y se transfirieron a 18°C durante 9 horas.

CEPA	SD 28°C	YEPD 28°C	YEPD 18°C
BY4741 WT	2h 40min	1h 55min	4h 0min
Y07156 ($\Delta rpl19a$)	3h 30min	2h 30min	5h 50min
Y03053 ($\Delta rpl19b$)	2h 55min	2h 10min	4h 20min

Tabla 11. Tiempos de generación de cepas isogénicas WT, $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$.

5.2. Fenotipo celular

Para analizar si la falta de alguno de los dos genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B* produce cambios en el fenotipo celular, se hicieron observaciones con un **microscopio de contraste de fases** de células de cepas $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ creciendo activamente en YEPD a 28°C. En la cepa WT, un 85% de las células se están dividiendo activamente y gemando a las 24 horas; el 15% restante, o bien tienen más de una yema, o bien las células forman grupos de 3-4 células. En las cepas de delección, el ~36% de las células aparecen formando esos grupos de **3 o más células vegetativas**, lo que sugiere que dos células hijas no han conseguido separarse de la célula madre haploide y pudiera estar retrasada la citocinesis en los mutantes (**Figura 48 A**).

Se ha descrito que delecciones de uno de los dos genes que codifican para una misma proteína en cepas diploides, así como la pseudo-haploinsuficiencia de RPGs en cepas haploides, distorsionan el control normal de la selección del sitio de gemación de las células (Ni y Snyder, 2001). Si en un 36% de los casos las células hijas no consiguen separarse de la célula madre en las cepas de delección sencilla, quizá podrá deberse a que no se produce eficazmente la formación del septo primario para la separación de la yema. Para analizar si este era el caso, se tiñeron las células de los mutantes con **calcoflúor** (Materiales y Métodos), que se une a la quitina de la pared celular, pero más específicamente a la quitina del septo de división. Cuando una célula hija empieza a formarse, en la base de la yema se forma un anillo de quitina, un polímero lineal de β 1-4 N-acetilglucosamina, que continúa depositándose hasta que la célula hija alcanza el tamaño de la célula madre. Por otro lado, también se observan acumulaciones de quitina en las cicatrices de gemación, lugar por el que la célula madre se desprende de la hija, que se observan en la madre incluso después de que la hija se separe.

Se recogieron células de cultivos en YEPD en fase exponencial a 28°C de las cepas WT y $\Delta rpl19b$ de Euroscarf, que se tiñeron con **calcoflúor directamente**. Como se puede observar utilizando un microscopio de fluorescencia, en la **Figura 48 B**, el anillo de quitina no se forma normalmente, sino que sufre un engrosamiento que podría estar perjudicando o enlenteciendo la separación de la yema en un porcentaje de las células mutantes. Además, se hizo un ensayo de tinción con **calcoflúor “in vivo”**, que permite teñir más específicamente el septo primario durante su formación activa por la enzima quitin-sintasa III. Como se muestra en la **Figura 48 C**, existe una mayor acumulación de quitina en el septo de división en los mutantes en relación a la cepa WT, siendo más exacerbada en las células que aparecen agrupadas. Además, se tiñeron los núcleos con **DAPI** (4',6-diamino-2-fenilindol), un compuesto que se une específicamente a zonas ricas en A y T del ADN. Se observó que, en los casos de agrupamiento de 3 o más células, tanto las células hijas como las células madre poseen núcleo, por lo que la segregación nuclear sería correcta en los mutantes (**Figura 48 D**).

Para analizar la formación de microtúbulos, compuestos por fibras de α y β tubulina, en las células agrupadas, se hizo un ensayo de **inmunofluorescencia** utilizando anticuerpos anti- α -tubulina y un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo CY3, que emite señal de fluorescencia roja, por lo que es posible observar las fibras de tubulina con un filtro de RODAMINA en el microscopio de fluorescencia. Además, se tiñieron las células con DAPI para observar los núcleos. Se observa cómo en la cepa mutante de delección *Δ rp119b*, en lugar de existir un solo haz de fibras de tubulina, como en una cepa WT (Machin *et al.*, 1995; Straight *et al.*, 1997), surgen incluso 2-3 ramificaciones (**Figura 48 E**), posiblemente debido a que las proteínas que intervienen en la polimerización o despolimerización de los microtúbulos en estos mutantes no se hayan sintetizado correctamente, dando por tanto defectos en la formación del huso mitótico y en la formación y orientación de los microtúbulos en estas células (Machin *et al.*, 1995).

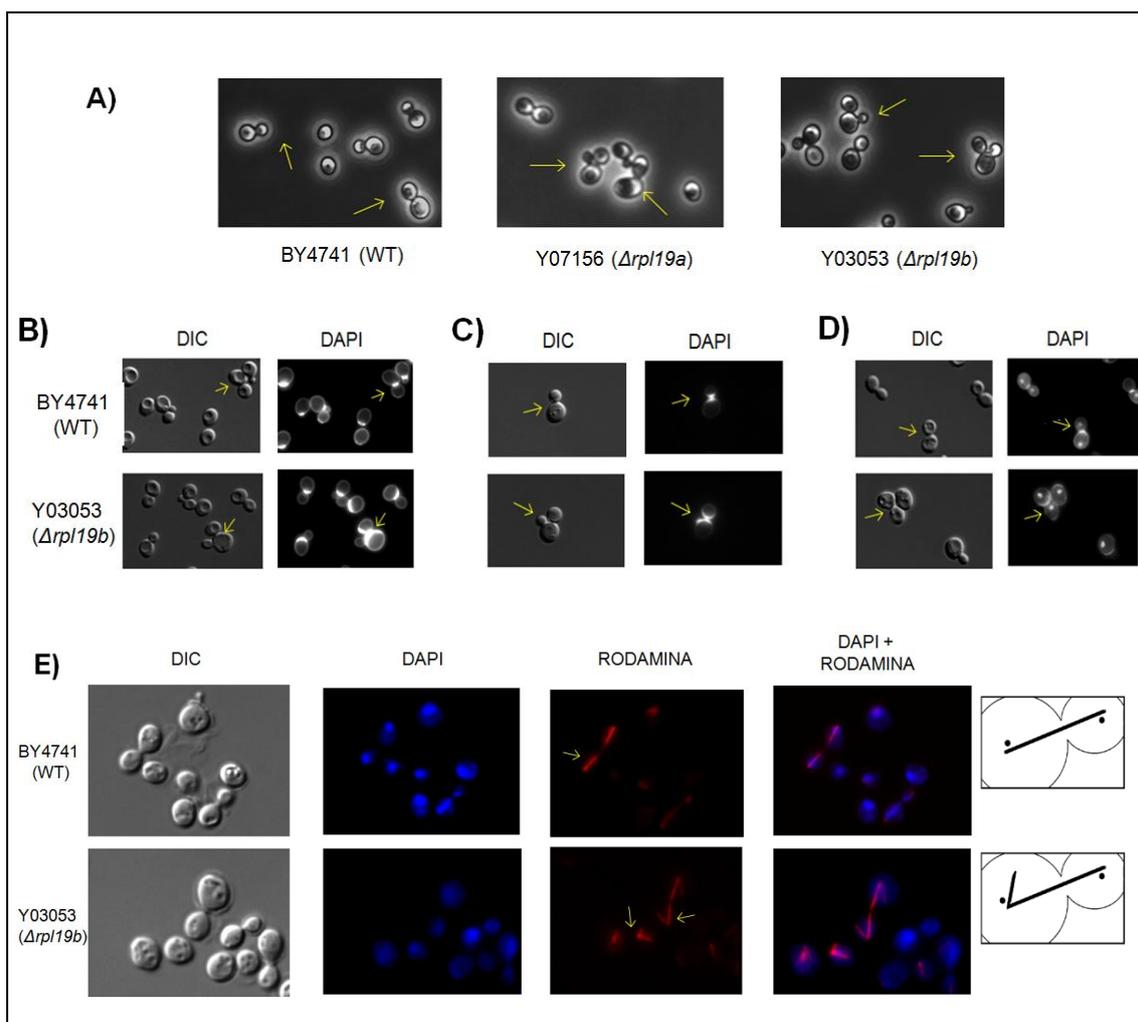


Figura 48. Fenotipo celular de mutantes de delección $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$. Fotografías del microscopio de contraste de fases y del de fluorescencia de células WT, $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$ (de Euroscarf). A) Células cultivadas en YEPD a 28°C durante 24h en el microscopio de contraste de fases. En los mutantes son más frecuentes las agrupaciones de 3 células, que se marcan en la figura con una flecha amarilla. B) C) y D) Tinciones con calcoflúor de células crecidas durante 24h a 28°C en YEPD. Se muestran a la izquierda de cada figura imágenes de DIC (contraste de interferencia diferencial) y a la derecha imágenes con el filtro de DAPI; se indican los tabiques de quitina fluorescentes marcados con flechas amarillas, y los engrosamientos de los mismos en el caso de los mutantes. B) Tinción con calcoflúor de las células directamente. C) Tinción con calcoflúor de células creciendo activamente. D) Tinción con calcoflúor y DAPI. E) Ensayo de inmunofluorescencia para fibras de α y β tubulina; se indican con flechas amarillas las ramificaciones de las fibras de tubulina en el mutante *Δrpl19b*.

5.3. Cantidad de transcritos *RPL19A* y *RPL19B*

Se analizó la **cantidad neta de los ARNm** que codifican las proteínas L19A y L19B en cepas isogénicas WT, $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$ de *S. cerevisiae* mediante ensayos de northern blot de ARNs totales del mismo número de células de cada cepa, cultivadas en SD⁺ a 28°C hasta fase exponencial. Para las hibridaciones se usaron como sondas moleculares dos oligonucleótidos marcados radiactivamente, *1-ARNm-A* y *1-ARNm-B*, que son complementarios e hibridan diferencialmente con los ARNm de los genes *RPL19A* y *RPL19B*, respectivamente (**Tabla IV de los Anexos**). En el mutante $\Delta rpl19a$ la cantidad del ARNm *RPL19B* es algo mayor que en la cepa WT (*RPL19A RPL19B*), y en ella se detecta menor cantidad del ARNm *RPL19A* que en el mutante $\Delta rpl19b$ (**Figura 49**).

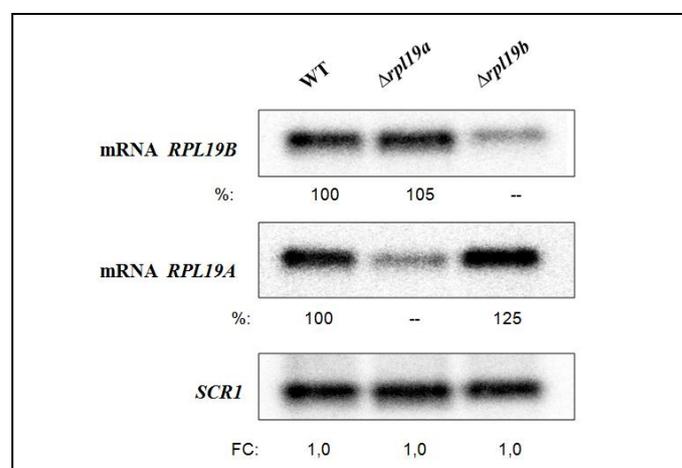


Figura 49. Análisis de la cantidad neta de los ARNm de *RPL19A* y *RPL19B*. Análisis de northern blot de 12 µg de ARN total con oligonucleótidos que detectan el ARNm *RPL19A* o el ARNm *RPL19B*. Se indican las cantidades de cada ARNm normalizadas en relación al ARN *SCRI*, y se expresan en porcentajes respecto al 100% de *RPL19B* o de *RPL19A* en la cepa WT.

Para comprobar que el fenotipo *slg* de las deleciones sencillas $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$ se debía a la deleción y no a alguna mutación espontánea adicional en otro gen, se transformaron las cepas mutantes con cada alelo silvestre clonados en los plásmidos centroméricos **pAJ8** (*RPL19A*) o **pAJ2** (*RPL19B*). Se analizó el tamaño de las colonias de los distintos transformantes en placas de SD⁺ incubadas durante 2 días a 28°C. En todos los casos, el fenotipo de crecimiento es similar al de la cepa WT (**Figura 50**).

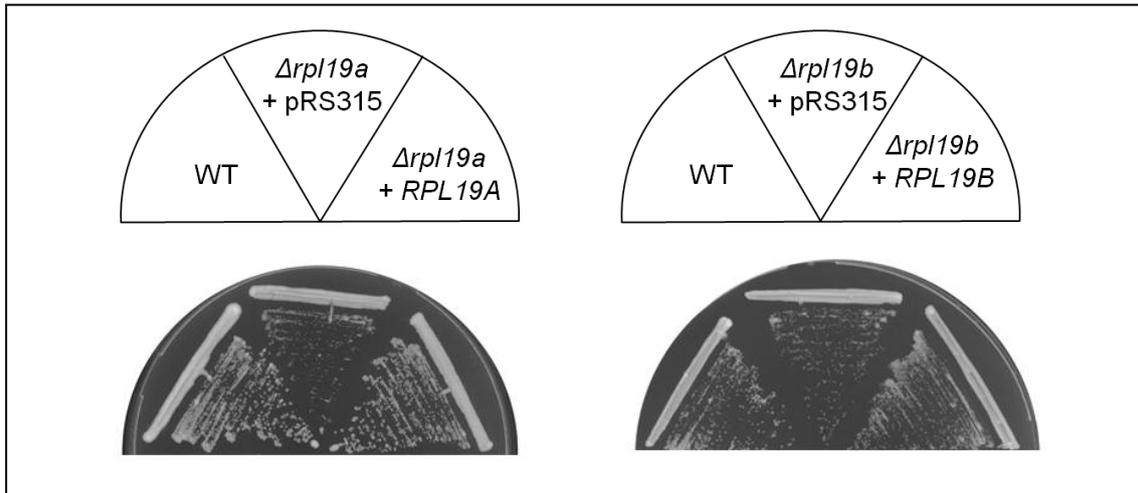


Figura 50. Fenotipo de crecimiento de cepas $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$. Se hicieron estrías en placas de medio selectivo SD⁺, que se incubaron durante 2 días a 28°C.

CAPÍTULO III:

BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN MUTANTES *rpl19b*

La biogénesis de ribosomas en *S. cerevisiae* es un proceso celular en el que tienen lugar el procesamiento del pre-ARNr y el ensamblaje de las proteínas ribosómicas de forma concomitante. Este proceso está facilitado por más de 250 factores que se incorporan transitoriamente a los pre-ribosomas y tienen actividades enzimáticas diversas. A partir de un transcrito primario, que es el precursor 35S, se producen una serie de cortes exo y endonucleolíticos para formarse los diversos intermediarios de las dos subunidades maduras, los de la subunidad 40S, que contiene 33 proteínas RPS y el ARNr 18S, y los de la subunidad 60S, que contiene 46 proteínas RPL y los ARNr 25S, 5,8S y 5S.

La incorporación de L19e en partículas precursoras de la subunidad 60S se ha investigado en análisis sistemáticos recientes en *S. cerevisiae*. Para ello, se expresó episómicamente en células haploides $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ un alelo condicional $pGAL::RPL19B_{\Delta}$, con promotor inducible, para reducir paulatinamente la síntesis de L19B tras transferir las células a medio con glucosa. De esta forma, se ha investigado cómo afecta la ausencia de L19e al procesamiento de varios precursores de los ARNr (Poll *et al.*, 2009). También se ha determinado que se trata de una proteína de ensamblaje temprano-medio en pre-ribosomas 66S (Ohmayer *et al.*, 2013; Gamalinda *et al.*, 2014). Los efectos que provoca la incorporación de versiones mutantes de L19e en la biogénesis de ribosomas y en la traducción formando parte del ribosoma maduro se puede investigar usando mutantes de pérdida parcial de función pLOF, como se ha indicado anteriormente, que no se han aislado previamente. Las mutaciones *rpl19b* obtenidas en este trabajo afectan a la secuencia primaria de aminoácidos de L19e y pueden alterar interacciones directas o indirectas de la proteína con factores de ensamblaje, con otros componentes de la subunidad 60S o del ribosoma, alterando la biogénesis de ribosomas y/o su funcionalidad.

1. PROCESAMIENTO DE LOS PRECURSORES DE LOS ARN RIBOSÓMICOS EN MUTANTES *rpl19*

Para investigar el fenotipo que confieren las mutaciones *rpl19b* en el procesamiento de precursores de los ARN ribosómicos, se cuantificaron mediante northern blot las cantidades netas (*steady-state*) de distintas moléculas precursoras y maduras en muestras de ARN total obtenidas de células crecidas en diferentes medios y temperaturas. La cantidad de los ARNr maduros 25S y 18S se estimó también con un bioanalizador. Las subunidades 60S y 40S se cuantificaron separando todas las subunidades (unidas o no a polisomas) en gradientes de sacarosa y se investigó la presencia de L19e WT en distintos tipos de pre-ribosomas 60S.

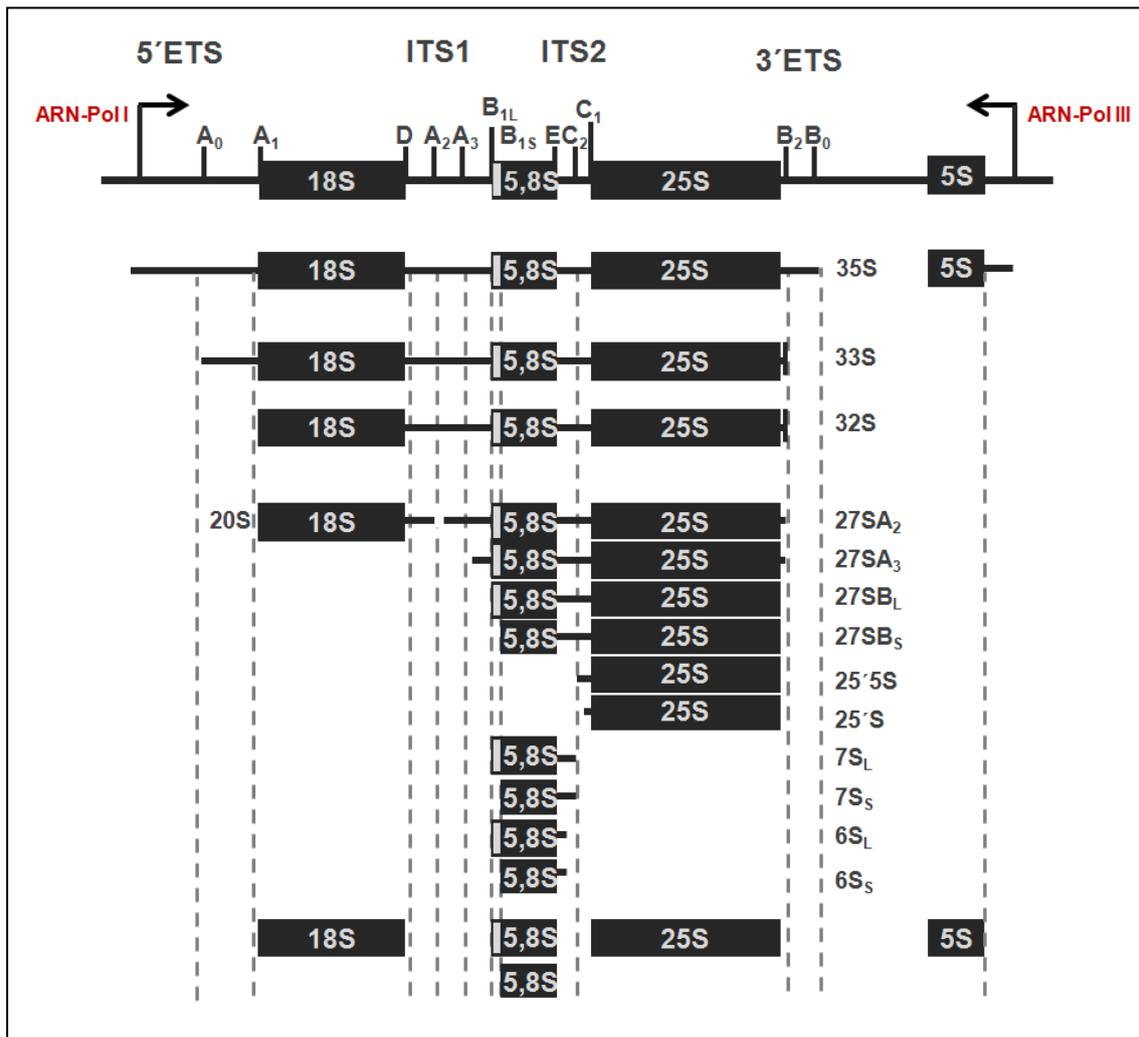


Figura 51. Esquema de la ruta de procesamiento de los ARN ribosómicos en *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestra el locus que codifica el precursor del pre-ARNr 35S y del 5S, y la ubicación de los sitios de procesamiento de los transcritos. El pre-ARNr 35S codifica los ARNr maduros 18S, 5,8S y 25S, que están flanqueados por los espaciadores externos 5' y 3' (5'-ETS y 3'-ETS) y separados por los espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2). El pre-ARNr 35S transcrito por la ARN-Pol I se va procesando por cortes exo y endonucleolíticos post-transcripcionales (que se marcan con líneas discontinuas). La escisión del corte en el sitio A₂ separa los precursores de las subunidades 40S y 60S. Alternativamente, el precursor 35S puede procesarse co-transcripcionalmente en los sitios A₀, A₁ y A₂ en el procesosoma del pre-ribosoma 43S. En esta subunidad, el precursor 20S se exporta hasta el citoplasma, donde completa su maduración dando lugar al ARNr 18S maduro. Por otro lado, en el pre-ribosoma 66S, el precursor 27SA₂ puede seguir dos rutas alternativas, donde un 85% se escinde en el sitio A₃ en el ITS2, y el 15% restante se procesa en el sitio B_{1L}. Por ambas vías los precursores se van procesando y salen al citoplasma, dando lugar finalmente a los ARNr maduros 5,8S y 25S. El pre-ARNr 5S es transcrito por la ARN-Pol III, y por procesamiento exonucleolítico produce el ARNr maduro 5S (Modificado de Granneman *et al.*, 2011).

Los ensayos de northern blot de ARN total se realizaron usando como sondas moleculares oligonucleótidos marcados radiactivamente en su extremo 5' que hibridan, específica y diferencialmente, con distintos precursores o con los ARNr maduros (**Figura 52** y **Tabla IV de los Anexos**).

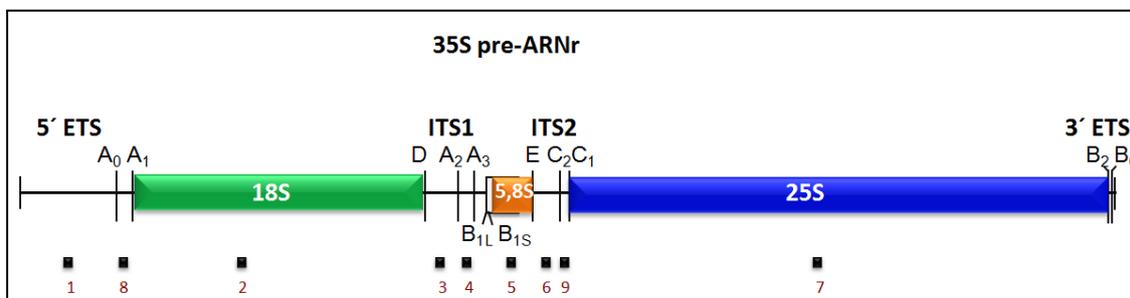


Figura 52. Esquema del precursor 35S de los ARNr de *S. cerevisiae* en el que se representan con pequeños cuadrados negros los oligonucleótidos usados como sondas moleculares alineados con las secuencias de ARNr complementarias a la secuencia de cada oligonucleótido, numerados del 1 al 9. En verde se representa la secuencia del ARNr 18S, en naranja la secuencia del ARNr 5,8S y en azul el ARNr 25S.

1.1. Mutantes *rpl19b* Δ CT

Se analizaron por northern blot muestras de $\sim 10\mu\text{g}$ de ARN total de cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19b* Δ CT, *CEN6 URA3*] cultivadas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial, y después de transferirlas 5h a 18°C (Materiales y Métodos). La carga se normalizó en relación a la señal de hibridación del ARN *SCR1*.

En la **Figura 54** se muestran los resultados de uno de los análisis de northern de los mutantes *rpl19b* Δ CT. A 28°C, la cantidad de los ARNr maduros **25S** y **18S** no disminuye respecto a la cepa silvestre isogénica Hm568, que porta un alelo de *RPL19B* sin intrón, *RPL19B* Δ_i , excepto en el mutante *rpl19b* Δ 27, en el que el ARNr 25S disminuye $\sim 10\%$. A 18°C, las cantidades de 25S y 18S se reducen $\sim 10\text{-}20\%$ en los mutantes *rpl19b* Δ CT, siendo más acusada en *rpl19b* Δ 27 (20%), lo que concuerda con un fenotipo *slg* más acentuado de este mutante (**Figura 35**). Sin embargo, el cociente **25S/18S** no varía significativamente en ninguno de los mutantes *rpl19b* Δ CT respecto al de la cepa WT, lo que sugiere que no debe existir un desequilibrio significativo entre las cantidades finales de subunidades 60 y 40S maduras (**Figura 54** y **Tablas 12 y 13**).

Para analizar las demás especies moleculares precursoras de los ARNr maduros, se usó el oligonucleótido **4** –complementario a una secuencia de ARN localizada entre los sitios de

procesamiento A_2 - A_3 – que permite detectar los precursores canónicos que son más abundantes en *S. cerevisiae*: 35S, 33S/32S y 27SA₂, que se procesan para dar lugar a los transcritos maduros 25S y 5,8S de la subunidad 60S. Se detecta una notable acumulación de ~1,6-4,8 veces del transcrito primario **35S** en los mutantes *rpl19bΔCT*, más acentuado en *rpl19bΔ32* a 28°C y en *rpl19bΔ27* a 18°C (**Figura 54** y **Tabla 12**). Estos datos sugieren que el corte endonucleolítico temprano que ocurre en A_0 en el 5'-ETS del precursor 35S estaría impedido o retrasado en los mutantes *rpl19bΔCT*. Se observa también una ligera acumulación de los precursores 33S y 32S que sugiere que también el procesamiento en A_2 está alterado en los mutantes (**Tabla 12**). Estos datos indican que los cortes tempranos en A_0 - A_1 - A_2 del precursor 35S están alterados en los mutante *rpl19bΔCT*, como se deduce de la ruta de procesamiento en *S. cerevisiae*.

La acumulación de 27SA₂ que se observa en los mutantes *rpl19b ΔCT* a 28°C indica un defecto en el procesamiento en A_3 ; Sin embargo, no se observa a 18°C, lo que sugiere que el procesamiento en A_2 del 35S estaría más afectado a esta temperatura. También se observa una acumulación de todos los precursores 27SA₂, 27SA₃ y 27SB a 28°C, que se detectan en la hibridación con el oligonucleótido **6**, cuya secuencia es complementaria a secuencias en E - C_2 (**Figura 52**). Esta acumulación sugiere defectos en el procesamiento en C_2 en los mutantes *rpl19bΔCT* a 28°C. Además, la cantidad de estos precursores 27S en todos los mutantes es mayor que la del precursor 27SA₂ a las dos temperaturas (**Figura 54** y **Tabla 12**). Por consiguiente, el cociente 27SA₂/27SB disminuye un 10-30 % en los mutantes *rpl19b ΔCT* (**Tabla 13**), lo que indica que está gravemente impedido el procesamiento endonucleolítico en C_2 , en el que participan hasta 14 factores de ensamblaje.

La hibridación con el oligonucleótido **6** también permite detectar una ligera acumulación en los mutantes *rpl19bΔCT* del precursor **7S** de los ARNr 5,8S (**Figura 54** y **Tabla 12**). A 28°C el cociente 27S/7S es mayor en los mutantes *rpl19bΔCT* que en el WT, lo que concuerda con un defecto en el procesamiento en C_2 ; sin embargo, a 18°C el cociente es menor, debido a que el procesamiento temprano de 27SA₂ y de todos los 27S ocurriría más lentamente a bajas temperaturas (**Tabla 13**).

La hibridación con el oligonucleótido **4** permite detectar en los mutantes *rpl19bΔCT* una especie molecular adicional que se acumula a 18°C (**Figura 54**). Dicha especie molecular no se detecta con el oligonucleótido **8** complementario a secuencias de A_0 y A_1 , con la que sí se detectan los pre-ARNr 23S y 24S, pero no 22S y 22,5S (**Figura 54**). Estos resultados indican que puede tratarse de la especie molecular **21S**, que se extendería desde A_1 hasta A_3 , y contiene el ARNr 18S (**Figura 53**, precursores no canónicos o aberrantes descritos en *S. cerevisiae*). Se ha descrito que la inhibición del procesamiento endonucleolítico temprano del precursor

primario 35S en A_0 y A_1 impide el procesamiento subsiguiente en A_2 , y conduce en determinadas cepas o mutantes a que se produzca el procesamiento en A_3 en lugar de en A_2 (Venema and Tollervey, 1999; Granneman and Baserga, 2004; Garcia-Gomez *et al.*, 2011a). El procesamiento en A_3 permite que se genere también el precursor **23S**, que aparece en determinados fondos genéticos de *S. cerevisiae* (Dunbar *et al.*, 1997; Lee and Baserga, 1997; Granneman and Baserga, 2004; Garcia-Gomez *et al.*, 2011a). En los mutantes *rpl19bΔCT*, el precursor 21S que se acumula a 18°C se produciría por el procesamiento en A_0 y A_1 pero no en A_2 y sí en A_3 (**Figura 53**), y aparece también al reducir la dosis de las proteínas L3, S0, S2, S3, S18, S19 y S20 (Venema and Tollervey, 1999; Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Rosado *et al.*, 2007b).

En los tres mutantes *rpl19bΔCT* analizados ($\Delta 22$, $\Delta 27$ y $\Delta 32$) se observa una pequeña acumulación del precursor **24S** en relación al WT (**Figura 54 y Tabla 12**). Este precursor 24S se ha detectado en otros mutantes de *S. cerevisiae*, como *rrp2-2* (Lindahl *et al.*, 1992), en mutantes de la endonucleasa *MRP* (Lindahl *et al.*, 2009), o en mutantes *rrp5* (Venema and Tollervey, 1996) o en el mutante de la proteína ribosómica *rpl33a-G76R* (Martin-Marcos *et al.*, 2007). El 24S se produciría por procesamiento del transcrito 35S en C_2 sin haber ocurrido previamente los cortes endonucleolíticos tempranos en los sitios A_0 , A_1 , A_2 y A_3 (**Figura 53**).

Además, se detecta una acumulación del precursor **23S** en los mutantes *rpl19bΔCT*, mayor en el mutante *rpl19bΔ27* a 18°C (**Figura 54 y Tabla 12**). El precursor 23S se genera por corte endonucleolítico directo en A_3 cuando están impedidos los cortes A_0 , A_1 y A_2 (**Figura 53**) llevado a cabo por la RNasa MRP, pero en la mayoría de los casos es degradado rápidamente por el exosoma (Venema and Tollervey, 1999; Allmang *et al.*, 2000), aunque también se ha indicado que podría procesarse hasta dar lugar al ARNr maduro 18S (Granneman and Baserga, 2004).

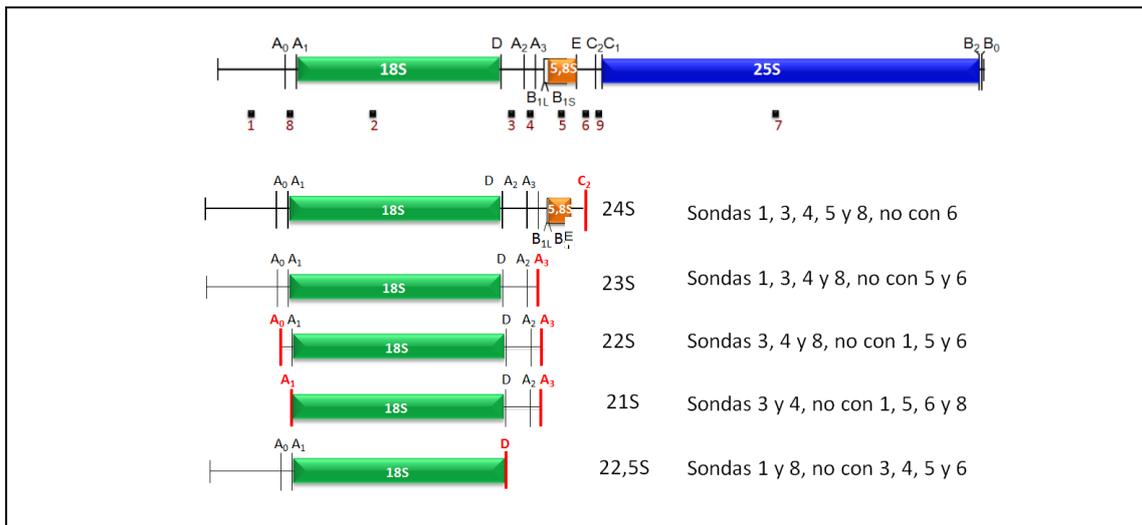


Figura 53. Especies moleculares no canónicas, minoritarias o aberrantes del procesamiento de precursores de los ARNr en *S. cerevisiae*. Se indican las sondas moleculares con las que hibridan o no cada uno de ellos.

La hibridación con el oligonucleótido **3**, complementario a una secuencia localizada entre los sitios de procesamiento **D-A₂**, permite detectar una notable acumulación del precursor **20S** del ARNr 18S en todos los mutantes *rpl19bΔCT*, mayor a 18°C que a 28°C (**Figura 54 y Tabla 12**). El cociente 20S/18S es 1,2-1,8 veces mayor en los mutantes *rpl19bΔCT* que en el WT a 28°C, y 4-4,5 veces mayor a 18°C, lo que indica que el procesamiento en el sitio **D** también está alterado en estos mutantes (**Figura 54**).

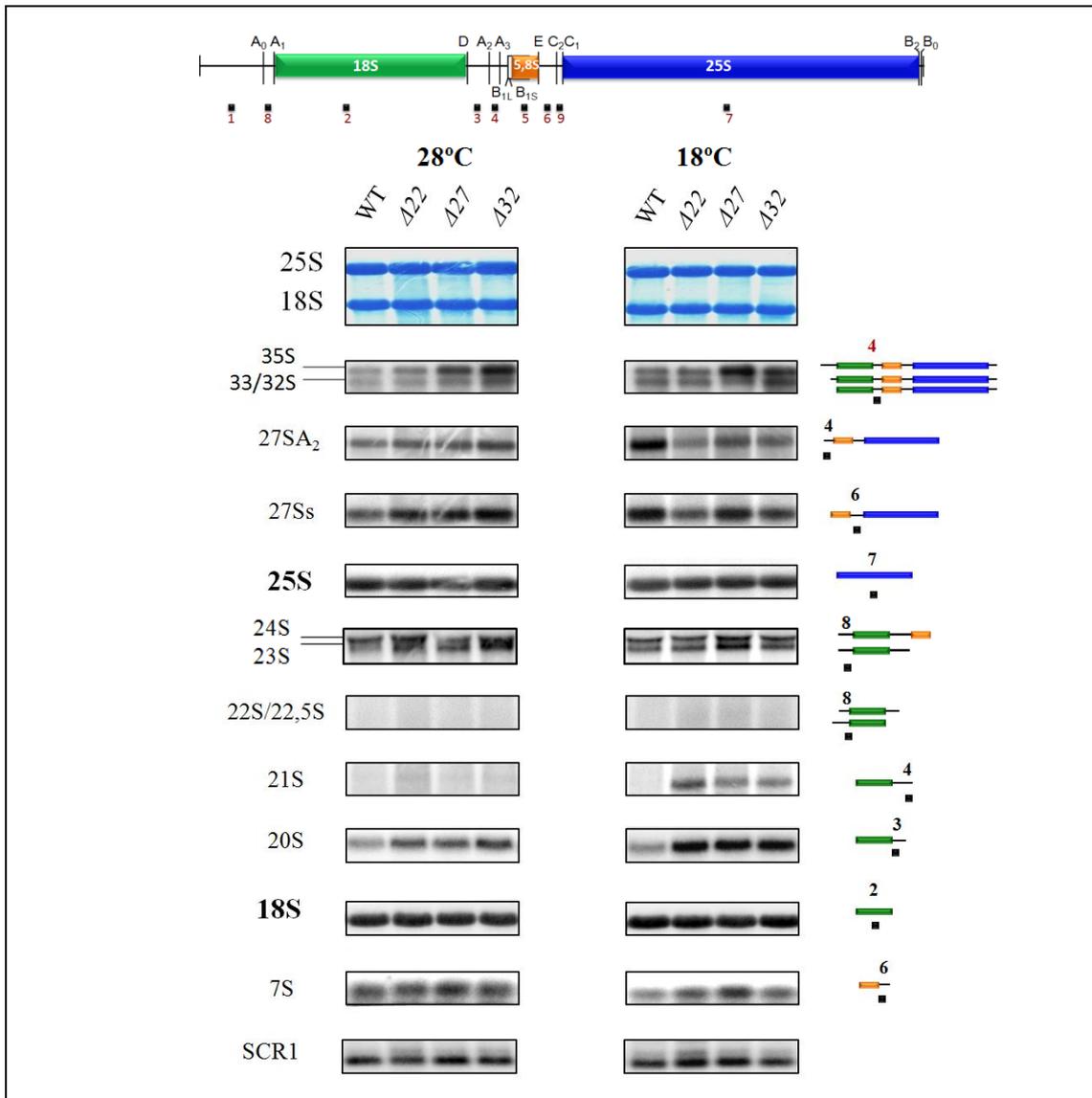


Figura 54. Defectos en el procesamiento y acumulación de los ARNr de mutantes *rpl19bΔCT*. El esquema de la ruta completa del procesamiento de los ARNr ribosómicos en *S. cerevisiae* se muestra en la Figura 14 (Introducción y tarjeta que acompaña a la Memoria). El pre-ARNr contiene las secuencias de los ARNr maduros (18S, 5,8S y 25S) separadas por dos secuencias espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) y flanqueadas por dos secuencias espaciadoras externas (5'ETS y 3'ETS). Los ARNr se representan como barras coloreadas y las secuencias espaciadoras de los transcritos como líneas. Las sondas moleculares empleadas en las hibridaciones (oligonucleótidos 1-9) se indican con cuadrados negros alineados con las secuencias complementarias con las que hibridan. Las cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$, silvestre Hm568 [*RPL19B Δ* , *CEN6 URA3*] y las 3 mutantes, *rpl19b ΔCT* (Hm575: $\Delta 22$, Hm574: $\Delta 27$ y Hm573: $\Delta 32$), se cultivaron en YEPD a 28°C hasta fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0,8$), y los ensayos de northern blot se realizaron como se ha descrito previamente en la página 61. En verde se representa la secuencia del 18S, en naranja la secuencia del 5,8S y en azul la del 25S.

Temperatura:		28°C			18°C			
Alelos <i>rpl19b</i> :	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$
Especie molecular de ARNr:								
35S	100	235	305	480	100	160	320	245
33S+32S	100	115	140	210	100	130	95	190
27SA₂	100	150	130	155	100	40	65	60
27S	100	170	160	165	100	60	85	80
25S	100	115	90	105	100	95	85	105
<25S	100	160	120	150	100	90	130	120
24S	100	150	100	120	100	95	105	105
23S	100	170	150	160	100	110	190	130
21S	100	110	105	105	100	285	205	240
20S	100	210	145	200	100	365	320	360
18S	100	120	110	110	100	90	80	85
7S	100	110	120	120	100	120	130	115

Tabla 12. Cantidad neta de precursores y ARNr maduros en mutantes *rpl19b* Δ ACT (Figura 54). Las señales de hibridación se cuantificaron con un Phosphorimager y se normalizaron respecto a la señal de hibridación del ARN *SCR1*, un transcrito de la ARN-Polimerasa III que se empleó siempre y en adelante como control de carga. Los valores de las cantidades de cada especie de ARNr se expresan en porcentajes en relación a los de la cepa WT (100%).

Temperatura:		28°C			18°C			
Alelos <i>rpl19b</i> :	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$
Proporción entre especies moleculares de ARNr:								
35S / 33+32S	1,0	2,0	2,2	2,3	1,0	1,2	3,4	1,3
35S / 27SA₂	1,0	1,6	2,3	3,1	1,0	4,0	4,9	4,1
35S / 27S	1,0	1,4	1,9	2,9	1,0	2,7	3,8	3,1
35S / 20S	1,0	1,1	2,1	2,4	1,0	0,4	1,0	0,7
27SA₂ / 27S	1,0	0,9	0,8	0,9	1,0	0,7	0,8	0,8
27S / 7S	1,0	1,5	1,3	1,4	1,0	0,5	0,7	0,7
24S / 23S	1,0	0,9	0,7	0,8	1,0	0,9	0,6	0,8
20S / 18S	1,0	1,8	1,2	1,8	1,0	4,1	4,6	4,2
25S / 18S	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,1	1,1	1,2

Tabla 13. Proporción relativa entre distintas especies moleculares de ARNr en mutantes *rpl19b Δ CT* (Figura 54). Los valores de los cocientes en los mutantes se expresan en relación a los obtenidos para la cepa WT [*RPL19B Δ i*, *CEN6 URA3*], a los que se les ha asignado el valor de 1,0 a cada temperatura.

Además, se analizaron por northern blot las cantidades de los precursores y de los ARNs de pequeño tamaño 5,8S y 5S usando muestras de $\sim 5\mu\text{g}$ de los mismos ARN empleados en el experimento anterior, que se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/urea (Materiales y Métodos). La hibridación se realizó secuencialmente con las oligonucleótidos **5** y **6** (Figura 52) y una complementaria al **5S**. Estos oligonucleótidos hibridan respectivamente con los ARNr 5,8S_L y 5,8S_S, con el precursor 7S y con el ARNr 5S, transcrito por la ARN-Polimerasa III (Figura 55). En este caso, para normalizar la carga se usó la señal de hibridación del ARN **U4**, componente del espliceosoma (Fournier and Maxwell, 1993), la maquinaria molecular responsable del procesamiento y eliminación de intrones de los ARN mensajeros. Este ARN es codificado por el gen *SNR14*, y es transcrito por la ARN-Polimerasa II en levaduras.

En los mutantes *rpl19b Δ CT* se observa a 28°C una ligera acumulación del precursor **7S** de los ARNr 5,8S y cantidades similares a las de la cepa *RPL19B Δ i* de los ARNr maduros **5,8S**

(5,8S_L + 5,8S_S) y 5S. A 18°C, las cantidades de 7S no varían significativamente, pero los ARNr maduros 5,8S y 5S disminuyen un 20-35% en los mutantes *rpl19bΔCT* (Figura 55 y Tabla 14). Los cocientes entre las cantidades de 7S y las de los ARNr 5,8S_S + 5,8S_L son por tanto mayores en los mutantes que en el WT, especialmente a 18°C, lo que sugiere un defecto en los últimos pasos de la rama “60S” de la ruta de procesamiento de precursores de los ARNr en mutantes *rpl19bΔCT*.

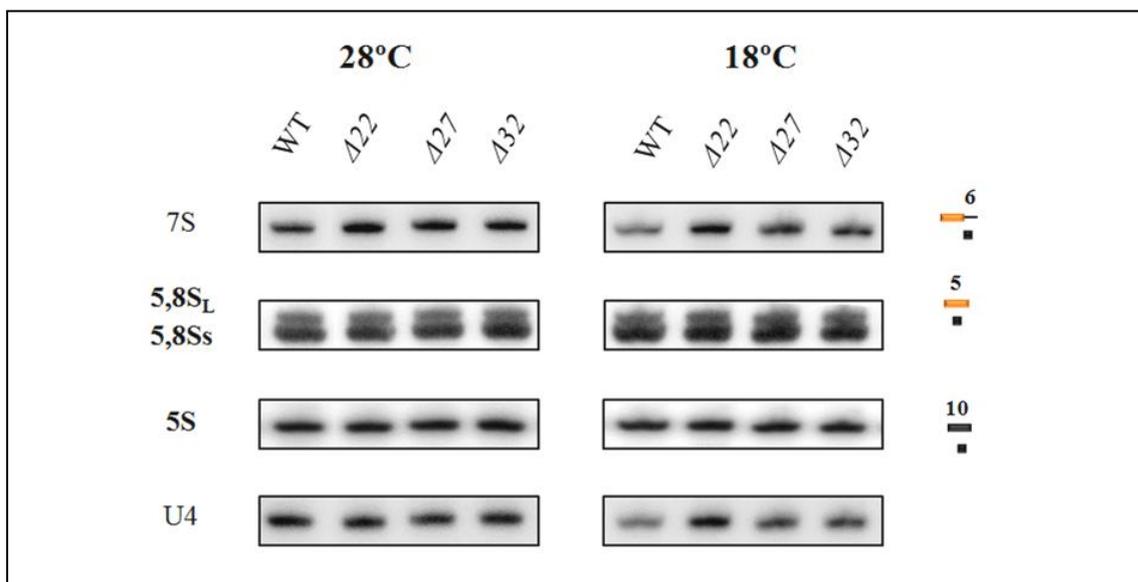


Figura 55. Especies moleculares de ARNr de pequeño tamaño en mutantes *rpl19bΔCT*. Los mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19bΔCT]* (*Δ22*, *Δ27* y *Δ32*) y la cepa isogénica silvestre (*Δrpl19a Δrpl19b [RPL19B_{Δi}]*) se cultivaron en YEPD a 28°C y durante 5 h a 18°C. A la derecha del panel de 18°C se representan esquemáticamente los diversos transcritos analizados. La hibridación se realizó secuencialmente con los oligonucleótidos 5, 6 y 5S, indicados como cuadrados negros y alineados con la secuencia específica con la que hibridan. La carga se normalizó en relación a la cantidad del ARN *U4*.

Temperatura		28°C			18°C			
Alelos <i>pGAL::rpl19b</i>	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$
Especie molecular de ARNr:								
7S	100	135	135	125	100	100	110	110
5,8S	100	120	115	115	100	65	80	85
5S	100	110	115	115	100	65	80	80
Proporción relativa de especies moleculares de ARNr:								
7S / 5,8S	1,0	1,1	1,2	1,1	1,0	1,5	1,4	1,3

Tabla 14. Cantidad y proporciones relativas de especies moleculares de ARNr de pequeño tamaño en mutantes *rpl19b Δ CT* (Figura 55).

1.2. Mutantes *pGAL::rpl19b Δ CT*

Se analizó si las cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ que portan alelos *pGAL::rpl19b Δ CT* de sobreexpresión tienen defectos en el procesamiento de los precursores de los ARN ribosómicos similares o diferentes a los de cepas que expresan los mismos alelos *rpl19b Δ CT* clonados con su promotor natural, cuyos resultados se acaban de describir. La razón de usar alelos para sobreexpresar las proteínas mutantes L19e Δ CT fue determinar si los defectos en procesamiento se debían exclusivamente a las mutaciones Δ CT y no a una posible pseudo-haploinsuficiencia de L19e al expresar uno sólo de los genes parálogos en cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$.

Para ello, se obtuvieron muestras de ARN total de 3 mutantes *pGAL::rpl19b Δ CT* ($\Delta 22$, $\Delta 27$ y $\Delta 32$) y de la cepa isogénica *pGAL::RPL19B Δ _i* (Hm670) cultivadas en YEPG. Por otra parte, células de la cepa Hm670 *pGAL::RPL19B Δ _i* se cultivaron a 28°C en YEPG y se transfirieron durante 2, 4, 8 y 16 h a 28°C a medio con glucosa YEPD para reprimir progresivamente la expresión de los alelos *pGAL*.

En los 3 mutantes haploides $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::rpl19b Δ CT*] se observa una reducción que oscila entre ~5-30% de la cantidad de los ARNr maduros **25S** y **18S** en relación al WT, tanto a 28°C como a 18°C, siendo estas reducciones algo mayores que en el caso de cepas que expresan los mismos alelos mutantes con su promotor natural (**Figura 56 A**). Sin embargo, el cociente 25S/18S es también muy similar en los mutantes en relación al de la cepa WT (**Tabla 15**).

Se observa también en algunos de los mutantes una acumulación de hasta 2,5 veces del precursor **35S** a las dos temperaturas (hibridación con el oligonucleótido **4**) (**Figura 56 A y Tabla 15**), y de **27SA₂** y los **27S** a 28°C, pero no a 18°C (hibridación con el oligonucleótido **6**), menos acusadas que en los mutantes *rpl19bΔCT*. Además, también se detecta en los mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* una disminución de ~10-35% de la cantidad del precursor **7S** del ARNr 5,8S respecto al WT, tanto a 28°C como a 18°C (oligonucleótido **6**) (**Figura 56 A y Tabla 15**), con el correspondiente incremento del cociente 27S/7S en los mutantes (**Tabla 15**).

También se acumula en mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* a 28°C el precursor **20S** del ARNr 18S e incrementan los cocientes 20S/18S en relación a la cepa WT *pGAL::RPL19B_{Δi}* (**Tabla 15**); sin embargo, a diferencia de lo observado en mutantes *rpl19bΔCT* (**Figura 54**), 20S no se acumula a 18°C, y a 28°C la acumulación es menor (oligonucleótido **3**, **Figura 56 A y Tabla 15**). Este resultado indica que el procesamiento en el sitio **D** del precursor 20S del ARNr 18S – componente de la subunidad 40S – es defectivo en mutantes *pGAL::rpl19bΔCT* a 28°C.

Además, se detecta **a**) una ligera acumulación del precursor minoritario **24S** en los mutantes *pGAL::rpl19bΔ22* (2X) y *pGAL::rpl19bΔ32* (1,4X) respecto a la cepa WT a 28°C, pero no a 18°C; **b**) de **23S** a 18°C en Δ22 (1,8X) y en Δ27 a 28°C (1,3X) y a 18°C (3,4X), pero no en Δ32; **c**) 21S, que aparece en los mutantes *rpl19bΔCT* a 18°C, no se detecta en los análisis de northern de estos mutantes (**Figura 56 A y Tabla 15**).

Por tanto, algunos defectos son similares y otros diferentes, cualitativa (21S, 20S y 7S no se acumulan a 18°C en los *pGAL*) o cuantitativamente (en general, menos afectado el procesamiento en la sobreexpresión con *pGAL*) entre los mutantes *rpl19bΔCT* y *pGAL::rpl19bΔCT*, lo que podría atribuirse a que los últimos solamente crecen en medio con galactosa como fuente de carbono y/o a diferencias debidas a la sobreexpresión de los genes correspondientes.

1.3. Reducción de dosis de L19e

Se decidió investigar los requerimientos de función de L19e en el procesamiento de precursores de los ARNr utilizando el alelo condicional *pGAL::RPL19B_{Δi}*, con el fin de determinar si los efectos producidos por carencia de L19e eran similares a los descritos en la literatura (Poll *et al.*, 2009; Ohmayer *et al.*, 2013) y si el efecto de la insuficiencia de la proteína sobre este proceso difería de los observados en nuestros dos tipos de mutantes *rpl19bΔCT*.

Para ello, se analizaron muestras de ARN total obtenidas de células de la cepa Hm670 (*Δrpl19a Δrpl19b [pGAL::RPL19B_{Δi}]*) durante el crecimiento a 28°C en YEPG (con

galactosa/rafinosa para inducir la síntesis de L19e por galactosa) y tras transferirlas durante varias horas a YEPD (represión por glucosa de la expresión del alelo condicional *pGAL::RPL19B_{Δi}*).

El análisis de northern blot con sondas moleculares (oligonucleótidos 1-8, **Figura 52**) revela que la reducción progresiva de la síntesis de L19e causa una disminución también progresiva de las cantidades de los ARNr **25S** y **18S**, siendo más acusada la de **25S** (**Figura 56 B y Tabla 16**).

En la hibridación con el oligonucleótido **4** se detecta una notable acumulación del precursor **35S**, especialmente tras 2 (19X) y 4 horas (20X) de la transferencia de las células a YEPD; una acumulación del precursor **27SA₂** a las 2 h, y una acumulación de todos los precursores **27S**, que se detectan con el oligonucleótido **6** (**Figura 56 B, Tabla 16**) también a las 2 y 4 h de represión de la síntesis de L19e. Estos resultados indican que no se puede producir de forma eficaz el procesamiento temprano en **A₀**, **A₁**, **A₂**, **A₃** del transcrito primario 35S, ni el procesamiento en **C₂**. Un impedimento del corte endonucleolítico en **C₂** concuerda con la reducción progresiva en la cantidad del precursor **7S** del ARNr 5,8S (**Figura 56 B**). Por lo tanto, una reducción progresiva del contenido intracelular de L19e – probablemente en el nucléolo o en el núcleo (Gamalinda *et al.*, 2014) – resulta en la reducción del cociente 27SA₂/27S y en un incremento del cociente 27S/7S (**Tabla 16**).

El precursor **24S** disminuye también durante el crecimiento en YEPD y no se detecta **21S**. Por lo tanto, 21S parece producirse como consecuencia de las mutaciones *rpl19bΔCT* pero no se sintetiza cuando se reduce la cantidad de L19e. Por el contrario, **23S** se acumula en las células transferidas a YEPD, indicando que al reprimir la síntesis de L19e también se inhiben los cortes tempranos en **A₀**, **A₁** y **A₂** y se favorece el procesamiento en **A₃** (**Figura 56 B**).

Finalmente, a diferencia de lo que se observa en los mutantes *rpl19bΔCT*, el precursor **20S** del ARNr 18S disminuye al reducir la dosis de L19e de forma progresiva, probablemente como consecuencia de una inhibición de los cortes tempranos del precursor 35S (**Figura 56 B, Tabla 16**). Estos resultados sugieren que o bien L19e es una proteína de ensamblaje temprano en el pre-ribosoma 90S, o bien de ensamblaje temprano-medio en la ruta de maduración de los pre-ribosomas 66S, como se discutirá posteriormente.

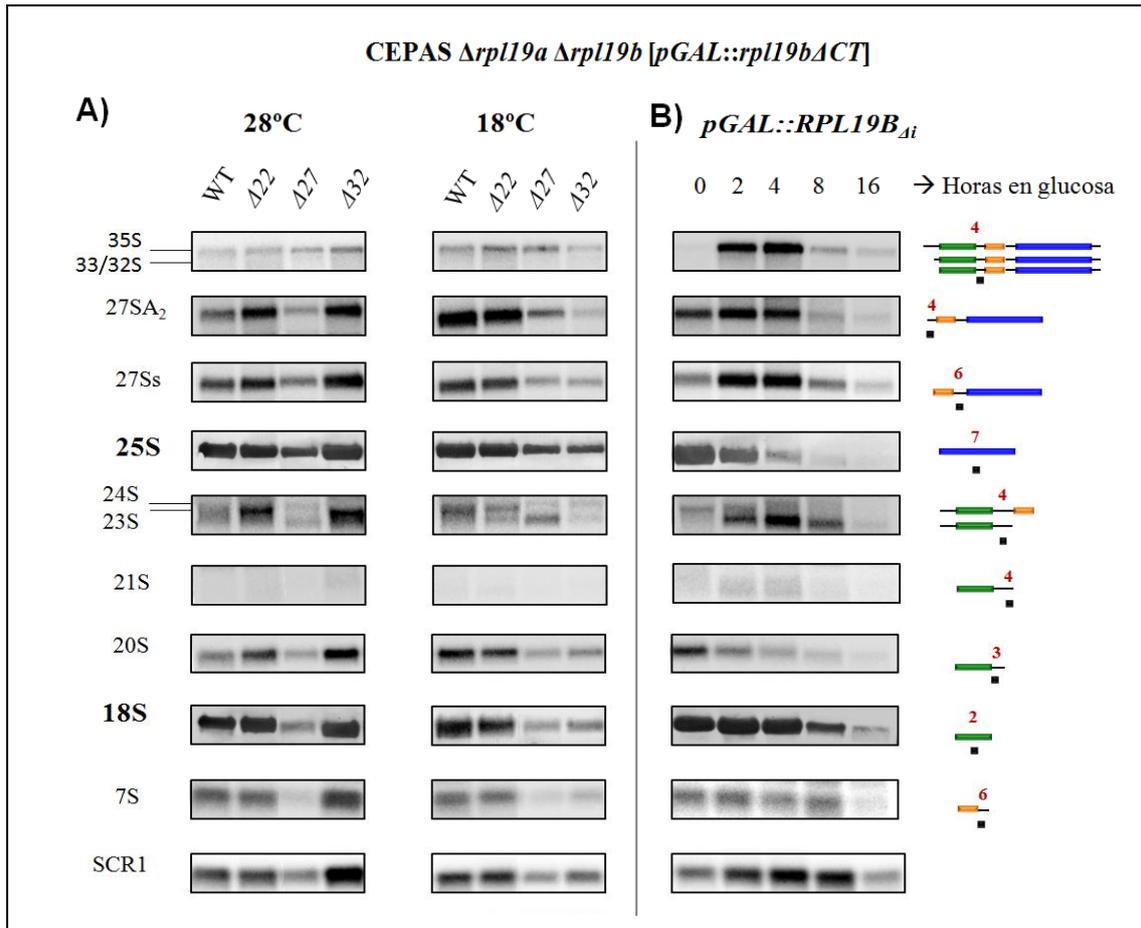


Figura 56. Defectos en el procesamiento de precursores y en la acumulación de ARN ribosómicos maduros A) en mutantes *pGAL::rpl19bACT* y B) al reprimir la síntesis de L19e. A) Las cepas mutantes $\Delta 22$, $\Delta 27$ y $\Delta 32$ ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::rpl19bACT*]) y la cepa isogénica silvestre Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B Δi*]) se cultivaron en YEPG a 28°C y durante 5 h a 18°C. **B)** Represión progresiva de la síntesis de L19e al transferir células de la cepa silvestre Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B Δi*]) de YEPG a YEPD durante 2, 4, 8 y 16 h. A la derecha del panel **B** se representan esquemáticamente los diversos transcritos precursores y maduros de los ARN ribosómicos. La hibridación se realizó secuencialmente con los oligonucleótidos 4, 6, 7, 3 y 2, en este orden que se indica, los cuales están representados como cuadrados negros y alineados con la secuencia específica con la que hibridan.

Temperatura		28°C			18°C			
Alelos <i>pGAL::rpl19b</i>	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$	WT	$\Delta 22$	$\Delta 27$	$\Delta 32$
Especie molecular de ARNr:								
35S	100	150	215	115	100	105	255	105
27SA ₂	100	180	105	120	100	70	85	50
27S	100	120	110	90	100	105	90	80
25S	100	90	95	75	100	90	80	70
24S	100	205	100	140	100	90	105	110
23S	100	100	130	95	100	180	340	110
20S	100	180	110	145	100	80	60	50
18S	100	95	75	70	100	80	65	70
7S	100	95	65	80	100	85	60	70
Proporción relativa de especies moleculares de ARNr:								
35S / 27SA ₂	1,0	0,8	2,0	1,0	1,0	1,5	3,0	2,1
35S / 27S	1,0	1,3	2,0	1,3	1,0	1,0	2,8	1,3
35S / 20S	1,0	0,8	2,0	0,8	1,0	1,3	4,3	2,1
27SA ₂ / 27S	1,0	1,5	1,0	1,3	1,0	0,7	0,9	0,6
27S / 7S	1,0	1,3	1,7	1,1	1,0	1,2	1,5	1,1
24S / 23S	1,0	2,1	0,8	1,5	1,0	0,5	0,3	1,0
20S / 18S	1,0	1,9	1,5	2,1	1,0	1,0	0,9	0,7
25S / 18S	1,0	0,9	1,3	1,1	1,0	1,1	1,2	1,0

Tabla 15. Cantidad y proporciones relativas de especies moleculares de ARNr en mutantes *pGAL::rpl19b* Δ ACT (Figura 56). Cepas isogénicas mutantes y silvestre se cultivaron en YEPG a 28°C y 5 h a 18°C. Las señales de hibridación obtenidas se cuantificaron, se normalizaron y se expresan como ya se ha descrito anteriormente.

Gluc (h):	0	2	4	8	16	Gluc (h):	0	2	4	8	16
Especies moleculares de ARNr:						Proporción entre especies moleculares de ARNr:					
35S	100	1900	2050	380	600						
27SA₂	100	140	60	20	20	35S/27SA₂	1,0	14	34	19	30
27S	100	285	155	60	55	35S/27S	1,0	7	13	6	11
25S	100	45	20	10	3	35S/20S	1,0	55	137	38	60
24S	100	45	40	20	5	27SA₂/27S	1,0	0,5	0,4	0,3	0,4
23S	100	675	1200	650	350	27S/7S	1,0	4,1	3,9	1,2	1,8
20S	100	35	15	10	10	24S/23S	1,0	0,07	0,03	0,03	0,01
18S	100	85	80	30	15	20S/18S	1,0	0,4	0,2	0,3	0,7
7S	100	70	40	50	30	25S/18S	1,0	0,5	0,3	0,3	0,2

Tabla 16. Cuantificación y proporciones de especies moleculares de ARNr en condiciones de inducción y represión de la expresión del alelo *pGAL::RPL19B_{Δi}*. La cepa Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*]) se cultivó en YEPG hasta fase exponencial (inducción) y se transfirieron células a YEPD durante 2, 4, 8 y 16 h (represión). Las señales de hibridación obtenidas se cuantificaron, se normalizaron y se expresan como ya se ha descrito anteriormente.

1.4. Mutantes $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$

Finalmente, se analizó el fenotipo de procesamiento de precursores y acumulación de ARNr maduros en cepas de *S.cerevisiae* que carecen de uno de los dos genes parálogos que codifican L19e, *RPL19A* o *RPL19B*, para investigar las consecuencias sobre ese proceso de la disminución parcial de dosis de L19e (pseudo-haploinsuficiencia) y también si hay diferencias significativas con los fenotipos de otros mutantes *rpl19* ya analizados. Las cepas de la colección de Euroscarf BY4741 (WT), Y07156 ($\Delta rpl19a$), Y03053 ($\Delta rpl19b$) se cultivaron en SD⁺ a 28°C hasta fase exponencial y se transfirieron 2 h a 37°C. Los análisis de northern se realizaron como se ha descrito anteriormente (**Figura 57**).

Tanto la delección $\Delta rpl19a$ como $\Delta rpl19b$ causan reducciones significativas y de distinta magnitud en las cantidades de los ARNr **25S** y **18S** maduros, lo que indica que también las

cantidades de subunidades 60S y 40S y de ribosomas maduros se reducen en similar proporción (**Figura 57 y Tabla 17**).

Se acumulan los precursores **35S**, **27SA₂** (oligonucleótido **4**) y las distintas especies de **27S** (**27SA₃**, **27SB_S** y **27SB_L**, oligonucleótido **6**) en el mutante $\Delta rpl19b$, pero no en el mutante $\Delta rpl19a$. El precursor **7S** disminuye en ambos mutantes de delección y el cociente **27S/7S** aumenta, indicando que el procesamiento en **C₂** está parcialmente impedido como consecuencia de la pseudo-haploinsuficiencia de L19e (**Figura 57 y Tabla 17**).

No se detecta el precursor anómalo **21S** en ninguno de los dos mutantes de delección, y las cantidades de **24S** y **23S** no varían significativamente en el mutante $\Delta rpl19a$; sin embargo, en $\Delta rpl19b$, ambos precursores se acumulan a 28°C y 37°C en relación a las cantidades de la cepa silvestre isogénica, siendo la acumulación de **23S** mayor a 37°C (4,6X) (**Figura 57 y Tabla 17**).

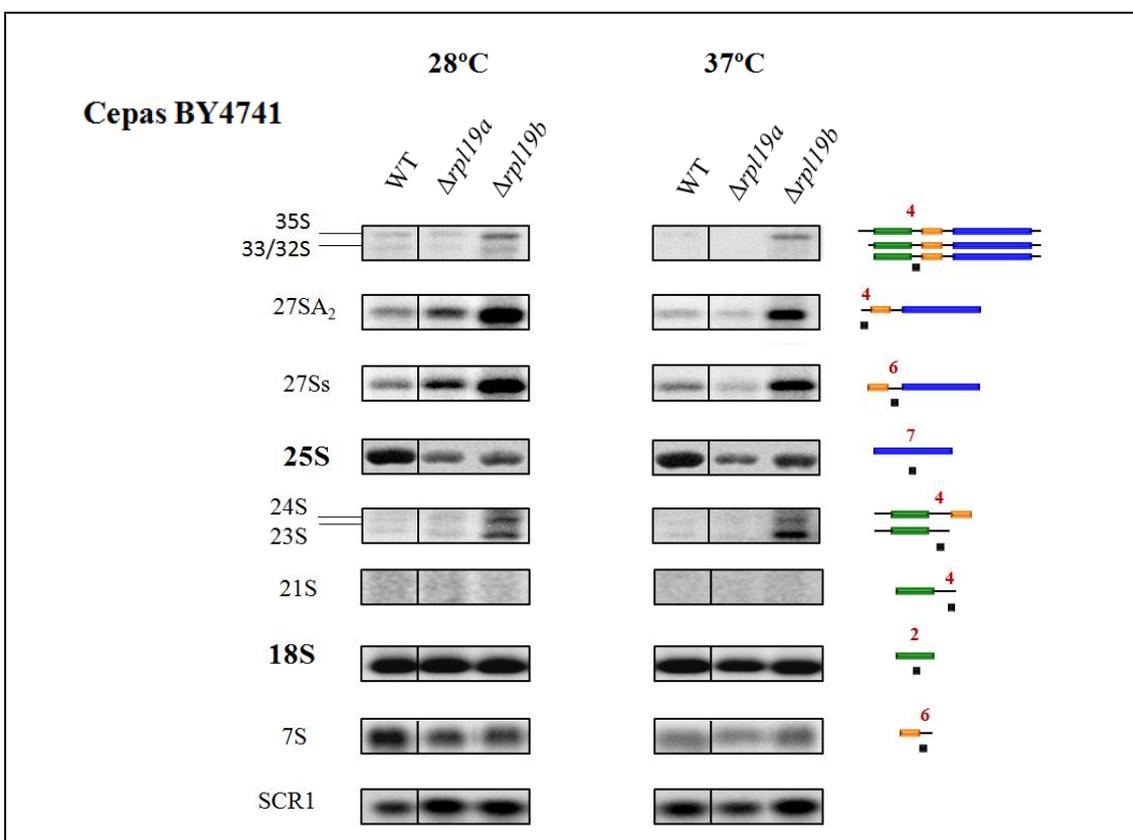


Figura 57. Procesamiento de precursores y acumulación de ARNr maduros en mutantes $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$. Las cepas BY4741 (WT), Y07156 ($\Delta rpl19a$), Y03053 ($\Delta rpl19b$), se cultivaron en SD⁺ a 28°C hasta fase exponencial y se transfirieron durante 2 h a 37°C. La hibridación se realizó secuencialmente con las sondas 4, 6, 7 y 2, que hibridan con las secuencias con las que aparecen alineadas en el esquema de la derecha. Las cuantificaciones de las señales radiactivas se recogen en la Tabla 17.

		28°C		37°C		
Cepas BY (Euroscarf):	<i>RPL19A</i> <i>RPL19B</i>	<i>Arpl19a</i>	<i>Arpl19b</i>	<i>RPL19A</i> <i>RPL19B</i>	<i>Arpl19a</i>	<i>Arpl19b</i>
Especies moleculares de ARNr:						
35S	100	100	300	100	110	790
33+32S	100	90	230	100	110	200
27SA₂	100	120	250	100	90	370
27S	100	120	310	100	90	280
25S	100	50	60	100	40	60
24S	100	110	300	100	80	270
23S	100	90	290	100	130	460
18S	100	80	70	100	80	70
7S	100	60	70	100	90	90
Proporción relativa de especies moleculares de ARNr:						
35S / 33+32S	1,0	1,1	1,3	1,0	1,0	4,0
35S / 27SA₂	1,0	0,8	1,2	1,0	1,2	2,1
35S / 27S	1,0	0,8	1,0	1,0	1,2	2,8
27SA₂ / 27S	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,3
27S / 7S	1,0	2,0	4,4	1,0	1,0	3,1
24S / 23S	1,0	1,2	1,0	1,0	0,6	0,6
25S / 18S	1,0	0,6	0,9	1,0	0,5	0,9

Tabla 17. Cuantificación y proporciones relativas de las especies moleculares de ARNr en mutantes de delección *Arpl19a* y *Arpl19b* (Figura 57). Las cepas BY4741 (WT), Y07156 (*Arpl19a*), Y03053 (*Arpl19b*), se cultivaron en SD⁺ a 28°C y 2 h a 37°C. Las señales de hibridación obtenidas se cuantificaron, se normalizaron y se expresaron como ya se ha descrito anteriormente.

2. CUANTIFICACIÓN DE 25S y 18S EN MUTANTES *rpl19*

Las cantidades de los ARNr maduros 25S y 18S provienen de subunidades 60S y 40S maduras, respectivamente, que son muy abundantes en el citoplasma celular. Se estima que existen unos 200.000 ribosomas por célula haploide de levadura y que se sintetizan ~ 2000/min (Warner, 1999). La hibridación con las sondas moleculares que los detectan (oligonucleótidos **2** y **7**) no permite detectar reducciones de pequeña magnitud en 25S y 18S. Para tener una medida más precisa de la cantidad de los dos transcritos maduros, alícuotas de ARN total de las mismas muestras y cepas empleadas en los distintos análisis de northern blot se sometieron a **electroforesis capilar** (~100 ng) y se cuantificaron con un Bioanalizador (Materiales y Métodos). Se empleó ARN de cepas $\Delta rpl19a$ $\Delta rpl19b$ [*rpl19b* Δ CT, *CEN6 URA3*] cultivadas como se indica en la **Figura 54**. Como se muestra en la **Figura 58 A**, el cociente **25S/18S** en todos los casos es muy similar al de la cepa WT, excepto en el mutante *rpl19b* Δ 27 a 28°C que se reduce un 12% y en *rpl19b* Δ 22 que disminuye un 20% a 18°C, por lo que se producirá una reducción de magnitud similar en las cantidades de subunidades 60S maduras en esos mutantes y en esas condiciones.

Al analizar los ARN de las cepas de Euroscarf (**Figura 57**) se observa que el cociente **25S/18S** en los mutantes $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ se reduce notablemente en relación al de la cepa WT de referencia BY4741, un **50%** en $\Delta rpl19a$ y un **25%** en $\Delta rpl19b$ a 28°C, llegando a una reducción del **60%** a 37°C en $\Delta rpl19b$ (**Figura 58 B**). Estos datos indican que la reducción parcial de dosis de L19e causa una grave reducción del cociente 25S/18S y, por lo tanto, de subunidades 60S respecto a las 40S maduras (véase más adelante).

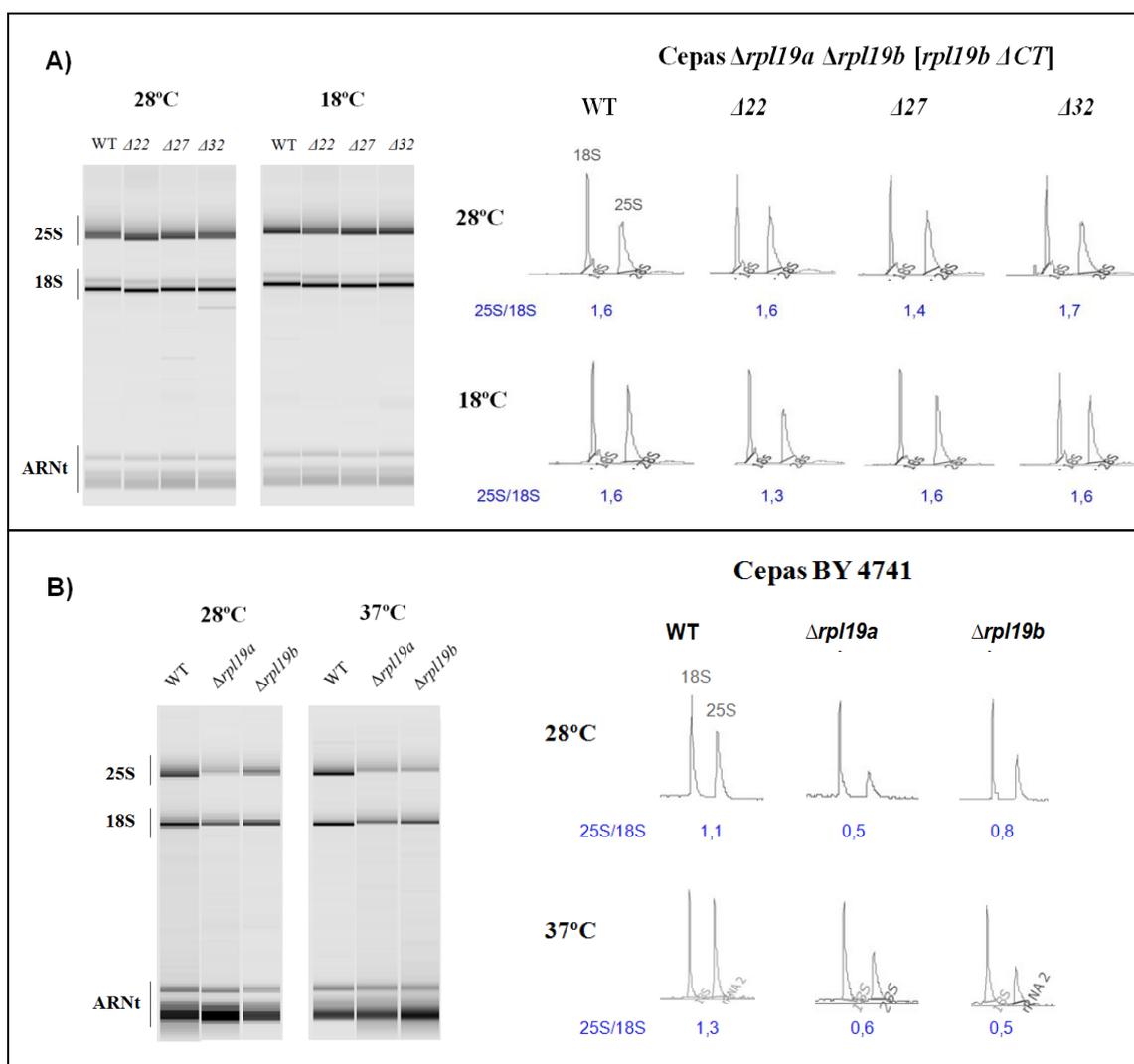


Figura 58. Análisis de la cantidad e integridad de 25S y 18S en muestras de ARNr de mutantes *rpl19*. Se utilizaron ~100 ng de ARN total **A)** de cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [$rpl19b \Delta CT$, *CEN6 URA3*] cultivadas en YEPD a 28°C y 5 h a 18°C, y **B)** de cepas BY4741 WT, $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ cultivadas en SD⁺ a 28°C y 2 h a 37°C. A la izquierda se muestran los geles capilares y se indican las especies moleculares que se resuelven; a la derecha, los picos correspondientes a 25S y 18S, y se indican los cocientes 25S/18S en cada cepa.

3. CUANTIFICACIÓN DE SUBUNIDADES MADURAS 60S Y 40S EN MUTANTES *rpl19*

Se cuantificó el contenido intracelular total de subunidades ribosómicas maduras 60S y 40S en distintas cepas de *S. cerevisiae*, tanto de subunidades libres como las involucradas en traducción y unidas a ARN mensajeros. Para ello, todas las subunidades se separaron en **gradientes de sacarosa** del 7% al 47% sin cicloheximida y con baja concentración de Mg²⁺

(Materiales y Métodos). Mediante este procedimiento se cuantifican todas las subunidades, ya que las que realizan la traducción como ribosomas 80S en polisomas se disocian de los mensajeros. Así, se estimó que las mutaciones *rpl19b* Δ CT afectan ligeramente a la cantidad final de subunidades 60S maduras, ya que el cociente 60S/40S se reduce un **3-8%** a 28°C en los mutantes *rpl19b* Δ CT respecto al de la cepa WT isogénica de referencia (**Figura 59 A**). A 18°C el cociente 60S/40S disminuye hasta un **10-12%**, lo que sugiere que quizá como consecuencia de los defectos en el procesamiento de ARNr, la producción, y con ello, cantidades netas de subunidades ribosómicas, se enlentece, y aún más a baja temperatura, debido a la falta del extremo C-terminal de L19e. En los mutantes **BY** Δ *rpl19a* y Δ *rpl19b*, el cociente 60S/40S se reduce ya un **10-15%** a 28°C respecto a su cepa isogénica WT (**Figura 59 B**).

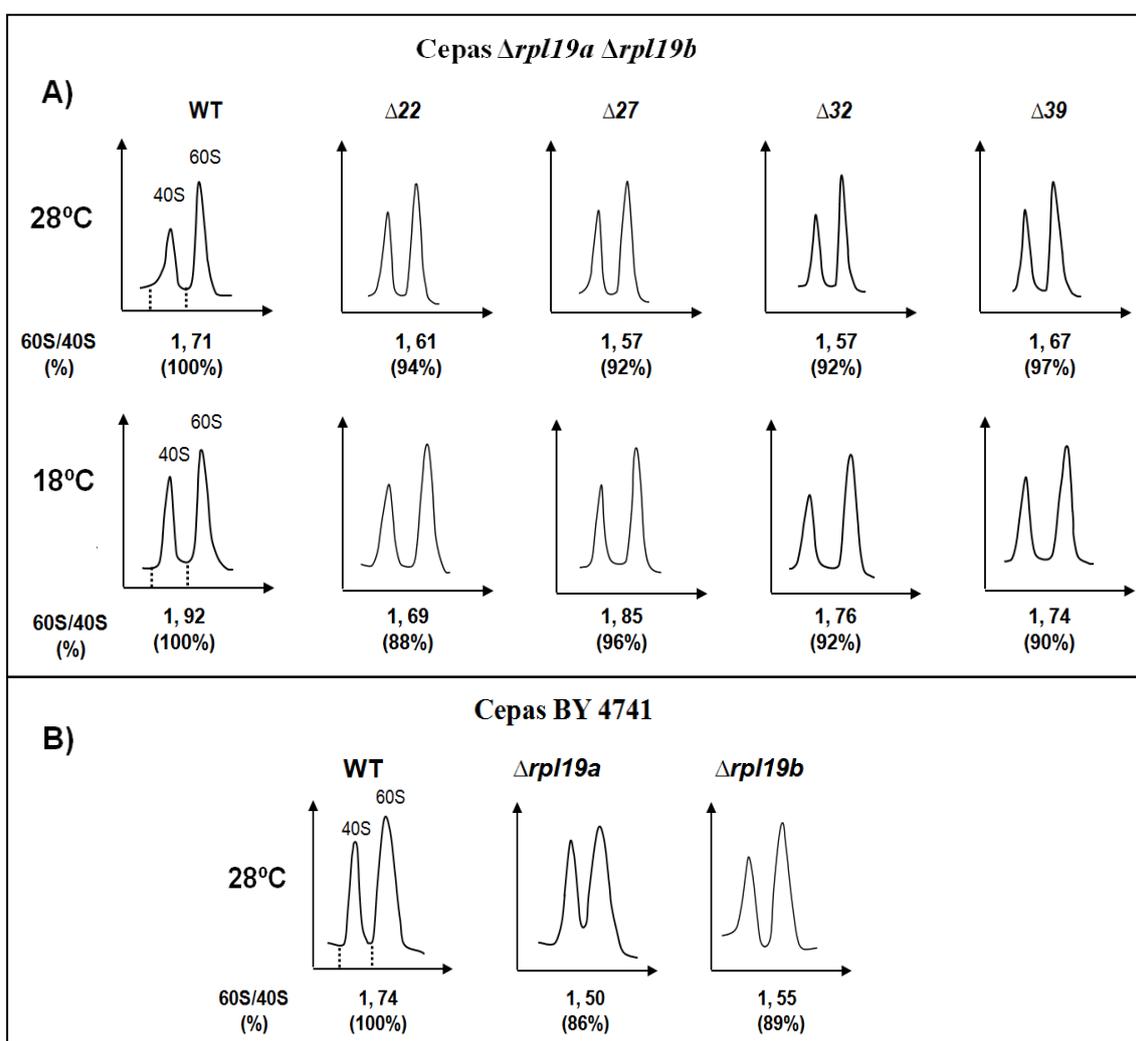


Figura 59. Cuantificación de subunidades ribosómicas 60S y 40S en mutantes *rpl19b*. Se prepararon extractos celulares y las subunidades ribosómicas maduras se separaron mediante centrifugación en gradientes de sacarosa del 7% al 47%, sin cicloheximida y con baja concentración de Mg^{2+} . **A)** Cepas Δ *rpl19a* Δ *rpl19b* [*rpl19b* Δ CT, *CEN6* *URA3*] cultivadas en YEPD a 28°C hasta y 5h a 18°C; **B)** Cepas BY WT, Δ *rpl19a* y Δ *rpl19b* cultivadas en YEPD a 28°C. Los resultados son repetitivos y reproducibles en al menos 3 replicados biológicos independientes.

4. ENSAMBLAJE DE L19E EN PRE-RIBOSOMAS

Para investigar cuándo se ensambla L19e en partículas pre-ribosómicas 66S precursoras de las 60S maduras, se analizó qué especies moleculares de precursores de ARNr están presentes en pre-ribosomas en las que ya se encuentra asociada L19e. Para ello, se purificaron por afinidad pre-ribosomas de la cepa Hm695 $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ que expresa un alelo de fusión de *RPL19B* con el epítipo TAP [*RPL19B::TAP::URA3*] integrado en el genoma en sustitución del gen *RPL19B* WT, y se realizaron análisis de extensión de un cebador o *primer extensión* (en colaboración con el Dr. John Woolford, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, EEUU). Se comprobó que el alelo de fusión *RPL19B::TAP::URA3* no confiere en principio ningún fenotipo observable y la cepa Hm695 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*RPL19B::TAP::URA3*]) crece con un tiempo de generación similar a Hm566, que expresa el alelo *RPL19B* sin el epítipo TAP. La cepa Hm695 se cultivó en YEPD a 28°C y se purificaron pre-ribosomas asociados a L19B::TAP con el epítipo en su extremo C-terminal (Materiales y Métodos). Se extrajo el ARN de los inmunoprecipitados y se usó un oligonucleótido marcado radiactivamente complementario a la región E-C₂ en el ITS2 (6, **Figura 52**), para realizar la reacción de extensión con una polimerasa dependiente de ARN, o retrotranscriptasa, que permite amplificar moléculas complementarias al 35S y a todos los 27S, pero no los ARNr maduros presentes en la subunidad 60S.

En paralelo, se realizó un ensayo de purificación de pre-ribosomas en una cepa con el epítipo TAP unido a NOP7, Hm694 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ *nop7::NOP7::TAP::URA3* [*RPL19B, CEN6 URA3*]). **NOP7** es un factor que se ensambla tempranamente en el pre-ribosoma nucleolar primario o 90S de *S. cerevisiae* (Harnpicharnchai *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2005; Sahasranaman *et al.*, 2011).

El resultado de estos ensayos indica que **L19e no se ensamblaría en el pre-ribosoma 90S** que contiene el precursor 35S, pues no se amplifican moléculas de ARN complementarias al mismo de pre-ribosomas asociados a L19B::TAP, pero sí a partir de inmunoprecipitados de pre-ribosomas asociados a NOP7::TAP (**Figura 60**). Se detecta una pequeñísima cantidad de moléculas correspondientes a **27SA₂**, presente en pre-ribosomas nucleolares 66SA₂ (Staley and Woolford, 2009; Gamalinda *et al.*, 2013); Sin embargo, las moléculas más abundantes, en la extensión de E-C₂ en dirección 3' → 5' hacia el 5'-ETS en las muestras de la cepa L19B::TAP corresponden a fragmentos con secuencias complementarias a **27SBs** y **27SB_L**, precursores presentes en pre-ribosomas nucleolares 66SB (Staley and Woolford, 2009; Gamalinda *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que L19e sería una proteína de **ensamblaje “intermedio”** que se asociaría a pre-ribosomas 66SA₂ minoritariamente o lábilmemente, pero se encuentra asociada establemente con pre-ribosomas 66SB que contienen el precursor 27SB (**Figura 60**).

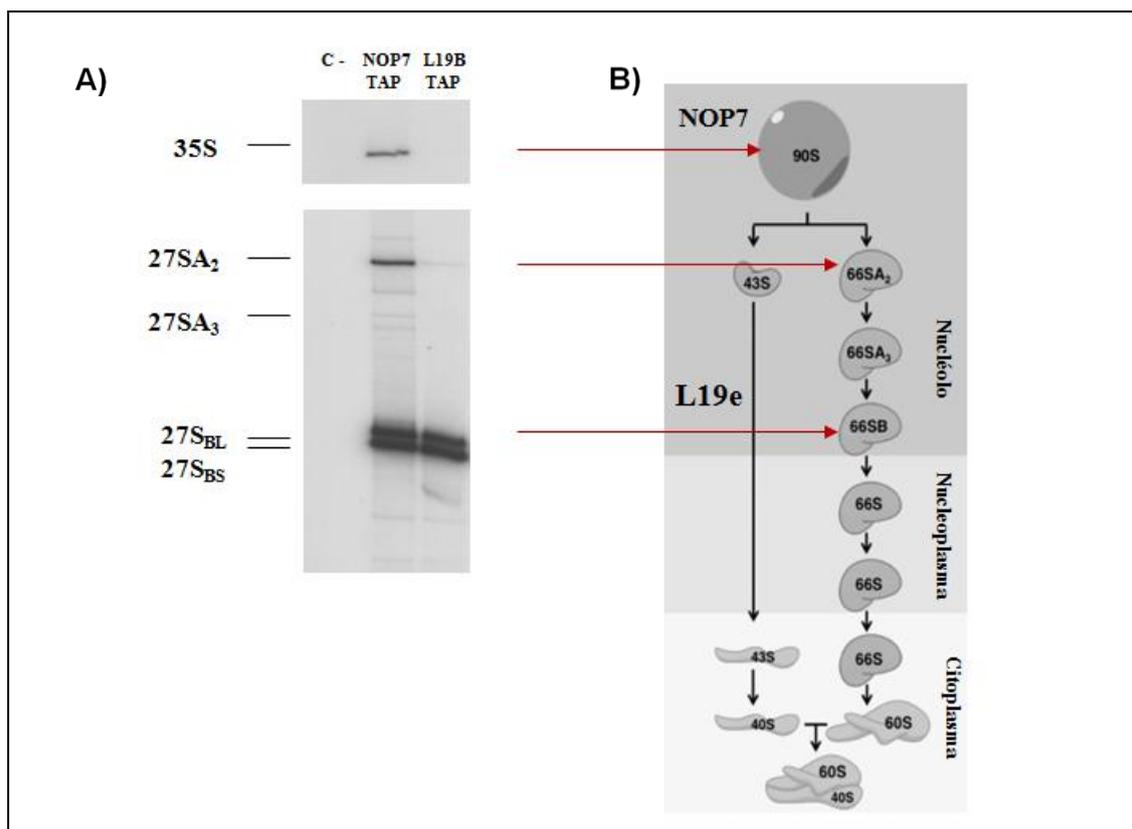


Figura 60. Incorporación de L19e a pre-ribosomas en la ruta de ensamblaje de la subunidad 60S de *S. cerevisiae*. Ensayos de extensión del cebador “E-C₂” (oligonucleótido 6 marcado radiactivamente) usando como molde muestras de ARN (~5µg) extraídas de pre-ribosomas asociados a NOP7::TAP (cepa Hm694) o a L19B::TAP (cepa Hm695). En **A**) se muestran las especies moleculares marcadas y se indican a la izquierda los precursores de ARNr a los que corresponden. **B**) Esquema en el que se indican los pre-ribosomas en los que se ensamblan NOP7 o L19e y el compartimento celular en el que se encuentran (Modificado de Gamalinda *et al.*, 2013).

4.1. Ensamblaje de pre-ribosomas en mutantes *rpl19bΔCT*

Se investigó qué efectos provoca el ensamblaje de proteínas L19e truncadas en su extremo C-terminal en pre-ribosomas, pues, como se ha indicado, cepas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ que expresan uno de los cuatro alelos *rpl19bΔCT* generados en este trabajo son viables ($\Delta 22$, $\Delta 27$, $\Delta 32$ y $\Delta 39$) y las correspondientes proteínas se deben ensamblar en subunidades 60S maduras.

Para ello, se integró la construcción [*nop7::NOP7-TAP::URA3*] en el locus *NOP7* genómico (cromosoma VII) de (i) tres de los mutantes $\Delta 22$, $\Delta 27$ y $\Delta 32$ ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT*, *CEN6 LEU2*]); (ii) la cepa Hm568 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*RPL19B_{Δi}*, *CEN6 URA3*]) y de la cepa TY1099 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 LEU2*]). A partir de dichas cepas se purificaron por cromatografía de afinidad partículas pre-ribosómicas que llevan la proteína NOP7::TAP (Materiales y Métodos). De estas muestras, se obtuvieron extractos de

proteínas totales y se analizó con anticuerpos policlonales específicos la presencia de proteínas ribosómicas y de factores no ribosómicos que se asocian a las distintas pre-partículas (Jakovljevic *et al.*, 2012; Talkish *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013). La proteína NOP7 está presente en pre-ribosomas 90S nucleolares y en todos los intermediarios 66S nucleolares o nucleares de la subunidad 60S. Los mutantes *rpl19bΔCT* y la cepa isogénica WT [*RPL19B_Δ*] se cultivaron en YEPD a 28°C, mientras que la cepa TY1099 (*Δrpl19a Δrpl19b [pGAL::RPL19B_Δ, CEN4 LEU2]*) con la construcción [*nop7::NOP7-TAP::URA3*] se cultivo en YEPG a 28°C y 16 h en YEPD para reprimir la síntesis de L19e.

Alícuotas de proteínas presentes en extractos celulares totales de todas las cepas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, se tiñeron con nitrato de plata para analizar su integridad y se realizaron ensayos de **western blot** con anticuerpos policlonales específicos frente a cada uno de los factores no ribosómicos y RP que se usan habitualmente en este tipo de análisis (Babiano *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013). En la **tinción de plata** se observa que tanto en los mutantes *rpl19bΔCT* como cuando disminuye la cantidad de la proteína L19e a lo largo del tiempo en glucosa, el perfil de proteínas totales es indistinguible a ese nivel del perfil de las de la cepa WT (**Figura 61 B y 61 C**).

Se analizó la presencia de factores no ribosómicos que se ensamblan en pre-90S, entre ellos **NOP7** y la DEAD-BOX-ATPasa **HAS1** (Adams *et al.*, 2002; Dembowski *et al.*, 2013); la proteína ribosómica **L17**, que se requiere para el procesamiento del precursor 27SA₂, y otras RP que se requieren para el procesamiento de 27SB, como **L3** y **L5** (Rosado *et al.*, 2007b; Zhang *et al.*, 2007). Además, también se analizaron algunos de los factores no ribosómicos que se requieren para el procesamiento de 27SB, como son los factores de unión al ARNr **TIF6**, **RLP24** y **NSA2**, el factor de andamiaje **NIP7**, o las GTPasas **NOG1** y **NOG2** (Talkish *et al.*, 2012) (**Figura 61 A**).

En los extractos proteicos de los mutantes *rpl19bΔCT* ($\Delta 22$, $\Delta 27$, $\Delta 32$) están presentes todas las proteínas investigadas, igual que en los de la cepa WT de referencia Hm694, lo que sugiere que **las truncaciones C-terminales de L19e no impiden ni afectan detectablemente a su ensamblaje en pre-ribosomas**, aunque podría ser menos eficiente o rápido el proceso que en presencia de la proteína silvestre L19e (**Figura 61 B**). Sin embargo, la presencia o incorporación a pre-ribosomas de la GTPasa **NOG2**, que se une tras el procesamiento del precursor 27SB, disminuye al reprimir la síntesis de L19e (**Figura 61 C**), indicando que sería necesaria para la asociación estable de factores de ensamblaje que se requieren para la eliminación del ITS2 en el pre-ARNr 27SB, como se propone y se ha observado al reprimir la expresión de L17, L35 y L37 (Gamalinda *et al.*, 2013).

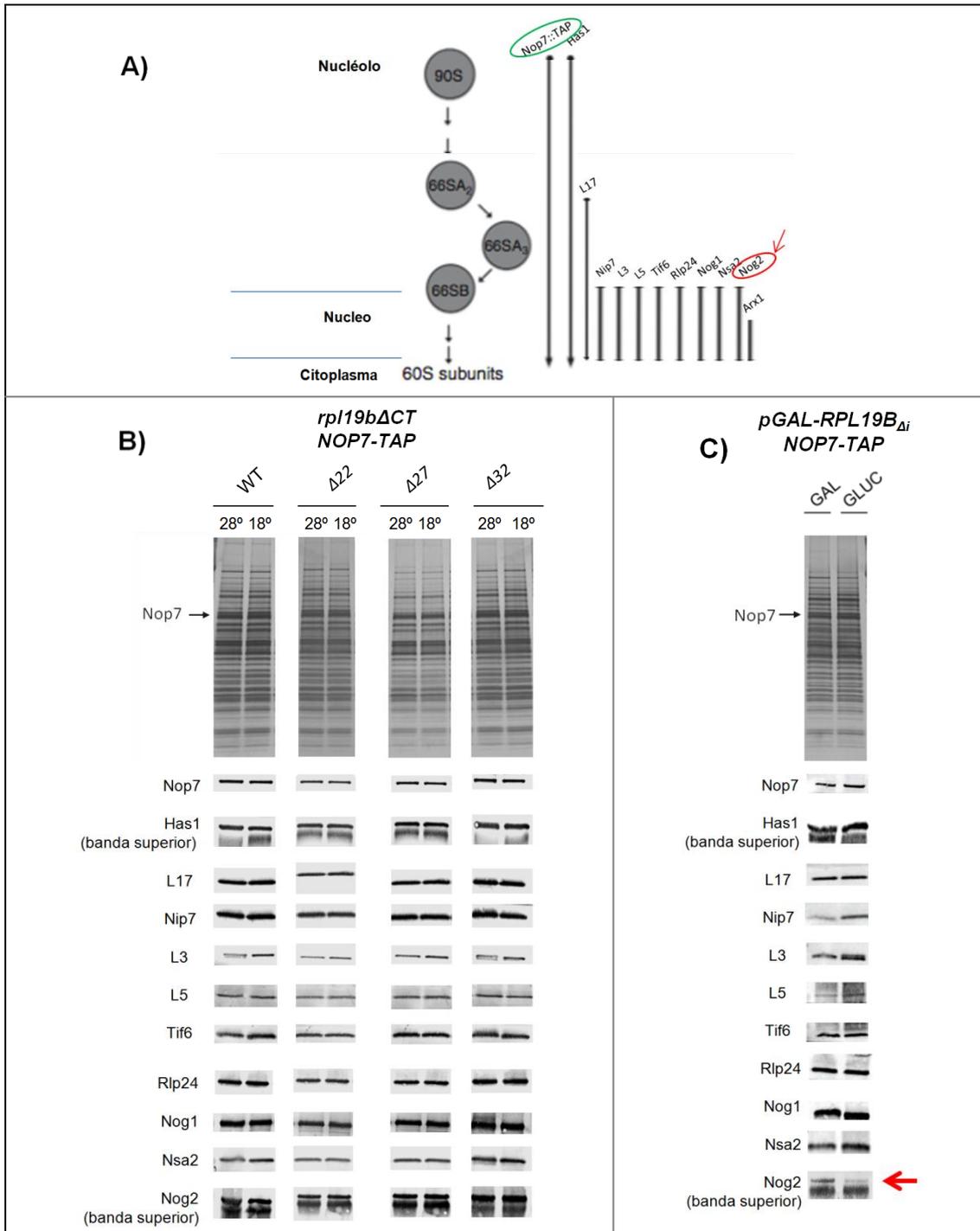


Figura 61. Ensamblaje de pre-ribosomas en mutantes *rpl19bΔCT*. **A)** El factor de ensamblaje NOP7 marcado con el epítipo TAP (presente en pre-90S y en todas las pre-partículas ribosómicas 66S) se usó para purificar por afinidad los pre-ribosomas, conteniendo algunos factores no ribosómicos definidos que están asociados temporalmente y proteínas ribosómicas incorporadas establemente (Modificado de Gamalinda *et al.*, 2013). **B)** Muestras obtenidas de cepas con genotipo $\Delta rpl19a \Delta rpl19b nop7::NOP7-TAP::URA3$, crecidas en YEPD, portadoras de plásmidos [*rpl19bΔCT*, *CEN6 LEU2*], o **C)** de cepas [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 LEU2*], crecidas en YEPG o durante 16h en YEPD para reprimir la síntesis de L19e, se analizaron en geles de acrilamida y se tiñeron con nitrato de plata. Se analizaron también por western blot mediante el uso de anticuerpos específicos frente a varios factores de ensamblaje y RPs.

5. TRANSPORTE INTRACELULAR DE SUBUNIDADES 60S EN MUTANTES *rpl19b*ΔCT

Para investigar si las mutaciones *rpl19b*ΔCT afectan al transporte hacia el citoplasma de subunidades 60S que incorporan cada una de las 4 proteínas truncadas, se transformaron los mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19b*ΔCT, *CEN6 LEU2]* y la cepa TY1099 que sobreexpresa un alelo silvestre (*Δrpl19a Δrpl19b [pGAL::RPL19B_{Δi}, CEN4 LEU2]*), con el plásmido p1877 (*CEN4 URA3*) que contiene el alelo **RPL25::eGFP**. La proteína L25 se ensambla en el nucléolo de modo que se puede monitorizar el viaje a través de los diversos compartimentos celulares de los pre-ribosomas 66S y de la subunidad 60S fluorescente (Tschochner and Hurt, 2003). Mutaciones que alteran la exportación de esas partículas ribosómicas, provocan retenciones del tráfico y de la fluorescencia en el nucléolo y el núcleo, como se ha observado en otros mutantes *rpl* (Rosado *et al.*, 2007b; Fernández-Pevida *et al.*, 2012; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013), o bien defectos en la entrada a esos compartimentos de proteínas mutadas que se sintetizan en el citoplasma (Underwood and Fried, 1990). Para identificar la posición de los núcleos, se tiñeron las células con **DAPI** (4',6-diamino-2-fenilindol), compuesto se une específicamente al ADN (Materiales y Métodos).

Para analizar el efecto de las truncaciones L19eΔCT en dicho proceso, se incubaron cultivos de transformantes *Δrpl19a Δrpl19b [RPL25::eGFP, CEN4 URA3]*, mutantes [*rpl19b*ΔCT, *CEN6 LEU2]* y WT [*RPL19B_{Δi}, CEN6 LEU2]*, en SD⁺ a 28°C y 5 h a 18°C. Como se observa en la **Figura 62**, la localización de L25 es principalmente citoplasmática en la cepa WT, mientras que en los mutantes *rpl19b*Δ27 y *rpl19b*Δ39 se observa en un **10-15%** de las células fluorescencia en el compartimento nuclear/nucleolar, posiblemente debida a un retraso en la salida de las subunidades 60S con L19eΔCT al citoplasma respecto a la cepa WT cuyas 60S llevan ensamblada L19e.

Estudiamos también el posible efecto que causa la disminución de dosis de L19e en el transporte de los pre-ribosomas al citoplasma, para lo que incubamos la cepa TY1099 (*Δrpl19a Δrpl19b [pGAL::RPL19B_{Δi}, CEN4 LEU2]*) con el plásmido p1877 (*CEN4 URA3*) en medio con galactosa y rafinosa YEPG, y se transfirieron los cultivos durante 2, 4, 8, 10 y 16 horas a un medio fresco con glucosa YEPD, reprimiendo así la síntesis de L19e. A medida que se disminuye la dosis de L19e, se observa un incremento progresivo de la fluorescencia en el núcleo/nuécleolo, en más de un **50%** de las células ya a las 2 h de transferencia a glucosa, y en un **95%** de las células a las 16 h en glucosa, ya que los pre-ribosomas que dejan de ensamblar una proteína L19e son incompletos o aberrantes y quedan retenidos en el nucléolo aparentemente en algunos casos (forma de media luna, **Figura 63**) y en el núcleo en general.

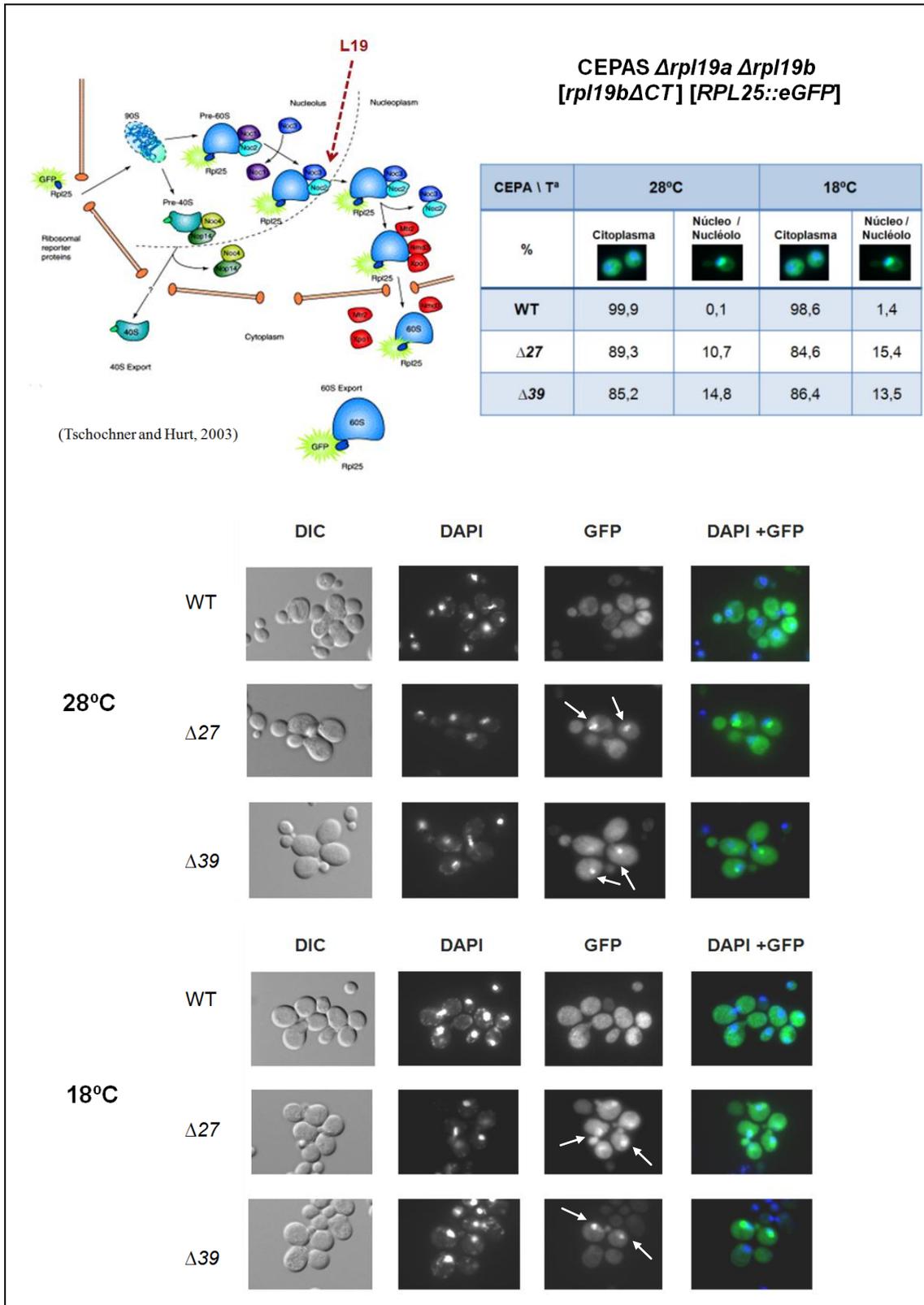


Figura 62. Transporte intracelular de pre-ribosomas y subunidades 60S en mutantes $rpl19b\Delta CT$. En la figura se indica con flechas blancas la localización de L25::eGFP en las células. Para calcular el porcentaje de células que acumulan L25::eGFP en núcleo/citoplasma se analizó la co-localización de la fluorescencia verde emitida con la señal de DAPI de los núcleos de 150-250 células en cada caso.

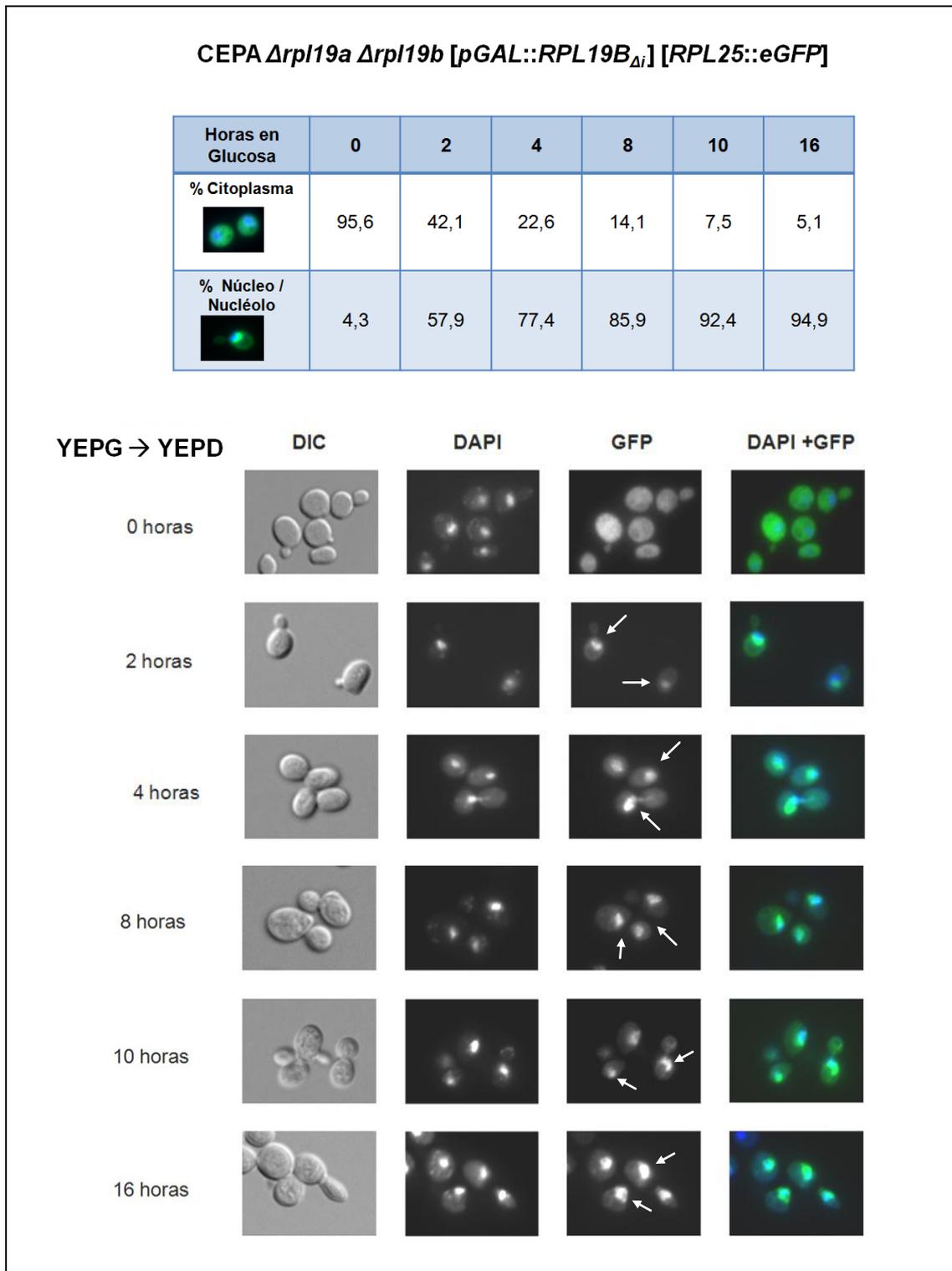


Figura 63. La disminución de dosis de L19e impide el transporte núcleo-citoplasmático de las pre-partículas 66S. En la figura se muestra la localización de L25::eGFP en células crecidas en YEPG a 28°C y tras ser transferidas durante 2, 4, 8, 10 y 16 h a medio con glucosa YEPD. Para calcular el porcentaje de células que acumulan L25::eGFP en núcleo/citoplasma se analizó la co-localización de la fluorescencia verde emitida con la señal de DAPI de los núcleos de 50-150 células en cada caso.

CAPÍTULO IV:

DEFECTOS EN TRADUCCIÓN DE MUTANTES *rpl19*

Numerosas evidencias experimentales indican que el ribosoma 80S desempeña un papel regulador de la eficiencia y/o la especificidad de la traducción en eucariotas, además de las funciones básicas de descodificación del mensaje genético que comparte con el ribosoma bacteriano (Jackson *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Rhodin *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012; Melnikov *et al.*, 2012). Entre otras razones, las funciones reguladoras se pueden atribuir a la heterogeneidad en la composición de las subunidades ribosómicas, como variaciones en las modificaciones de las bases de los ARNr (Decatur and Fournier, 2002; Badis *et al.*, 2003) o debidas al ensamblaje de proteínas ribosómicas parálogas no siempre idénticas cuya cantidad puede estar regulada diferencialmente en diferentes situaciones de crecimiento en levaduras (Komili *et al.*, 2007; Gilbert, 2011; Xue and Barna, 2012; Bauer *et al.*, 2013). Además, interacciones de las subunidades ribosómicas y sus componentes – RP, ARNr – con otros elementos de la maquinaria traduccional, como los ARNm, los ARNt o factores solubles de la traducción (eIFs, eEFs, eRFs), o bien con proteínas que regulan la expresión de ARNm específicos, pueden contribuir a la regulación de la traducción, tanto en levaduras (Spahn *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2011; Rhodin *et al.*, 2011) como en organismos pluricelulares (Anger *et al.*, 2013; Lomakin and Steitz, 2013; Voorhees *et al.*, 2014). Alteraciones de la biogénesis de los ribosomas o de la integridad estructural de algunas RP aparecen asociadas o contribuyen a la etiología de algunas enfermedades humanas, como la anemia *Diamond-Blackfan* (DBA), el síndrome de *Shwachman-Diamond* (SDS) o varios tipos de cáncer (Mauro and Edelman, 2007; Xue and Barna, 2012).

Mediante la obtención de mutantes *rpl19b* de *S. cerevisiae* y el análisis de sus fenotipos traduccionales, se ha investigado el papel que desempeña L19e en la traducción global de los ARNm y en la regulación traduccional del ARNm específico de *GCN4*.

1. DEFECTOS TRADUCCIONALES DE MUTANTES *rpl19ΔCT*

1.1. Análisis de defectos en el inicio de la traducción general de los ARNm

La iniciación de la traducción es la etapa de la síntesis de proteínas en la que intervienen la mayoría de mecanismos reguladores del proceso, lo que permite un control rápido y reversible de la expresión génica ante condiciones fisiológicas y ambientales cambiantes (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.*, 2010).

Esta etapa de la traducción se puede dividir en 3 pasos:

- 1) Formación del complejo ternario (CT) de $\text{ARNt}_i^{\text{Met}} \cdot \text{GTP} \cdot \text{eIF2}$ y su asociación a la subunidad ribosómica 40S, formando el complejo de pre-iniciación (PIC) 43S.
- 2) Unión del PIC 43S al ARNm formando el PIC 48S y localización por éste del codón de inicio de la traducción correcto en el ARNm.
- 3) Unión de la subunidad ribosómica 60S a la 40S en el AUG, formándose los monosomas 80S.

Para investigar qué defectos en traducción causan las mutaciones *rpl19b Δ ACT*, se obtuvieron perfiles de polisomas de los mutantes correspondientes. Para ello, se obtuvieron extractos celulares totales (ECT) de cada mutante (*Δ rpl19a Δ rpl19b [rpl19b Δ ACT CEN6 URA3]*) y de la correspondiente cepa isogénica silvestre (*Δ rpl19a Δ rpl19b [RPL19B $_{\Delta i}$ CEN6 URA3]*), tras cultivar células en medio líquido YEPD a 28°C y 250 rpm hasta fase exponencial, y después de transferirlas durante 5 horas a 18°C. Los ECT se obtuvieron utilizando un buffer de lisis con Mg^{2+} para impedir que los ribosomas unidos al ARNm se disocien, y altas concentraciones de cicloheximida (125 $\mu\text{g/ml}$), para inhibir tanto la iniciación como la elongación de la traducción, por lo que se obtiene una “imagen fija” del estado de la maquinaria traduccional *in vivo* en el momento en el que se preparan los extractos (Helser *et al.*, 1981; Melamed *et al.*, 2009).

Cantidades de los ECT correspondientes a 10 unidades de $\text{DO}_{260\text{nm}}$ de extracto se fraccionaron por centrifugación a alta velocidad en gradientes continuos del 7% al 47% de sacarosa para separar las subunidades ribosómicas 40S y 60S, los monosomas y los polisomas en función de su coeficiente de sedimentación en el gradiente (Materiales y Métodos). Se obtienen los perfiles del gradiente, monitorizando los ARN (los ribosómicos y los mensajeros a los que estarían unidos) con una lámpara de UV (254 nm) acoplada a un registrador en papel. El primer pico del perfil que aparece en la zona del gradiente del 10-15% de sacarosa corresponde a las subunidades 40S (ARNr 18S), el segundo las subunidades 60S (ARNr 25S, 5,8S y 5S) y el tercero los monosomas (subunidades 80S unidas al ARN mensajero que contienen todos los ARNr maduros). Los siguientes picos son los polisomas: disomas (dos ribosomas unidos al ARNm), trisomas (tres ribosomas unidos al ARNm), tetrasomas, etc. En nuestros gráficos se llegan a resolver en los polisomas, generalmente, hasta 8 o 9 picos que corresponden a 8-9 ribosomas unidos a los ARNm.

Cuando un mutante de *S.cerevisiae* tiene graves defectos en el inicio de la traducción, aumenta la cantidad de los monosomas y se reduce la de los polisomas en el perfil, por lo que también se reduce el cociente polisomas/monosomas (P/M) respecto al de una cepa silvestre. Además, en algunos mutantes, el tamaño medio de los polisomas también disminuye (Hartwell and McLaughlin, 1969; Garcia-Barrio *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 1999). Una reducción de

subunidades 60S, o de su funcionalidad en la unión a las 40S, determina la aparición de una especie de hombros, adyacentes a la derecha de los de los monosomas y/o de polisomas de distinto tamaño en el perfil, que se denominan en inglés *halfmers* y que corresponden a PICs 43S unidos a los ARNm a los que no se ha unido aún una subunidad 60S, bien antes de llegar al AUG o bien detenidos en el mismo (Helser *et al.*, 1981).

En los perfiles de los mutantes *rpl19bΔCT* se observa una ligera reducción de la cantidad de **polisomas** respecto a la cepa que expresa el alelo WT *RPL19B_{Δi}*, aunque en este caso no es concomitante con un aumento detectable de los monosomas, como ocurre en otros mutantes con defectos en la iniciación de la traducción (Dorris *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 1999; Cheung *et al.*, 2007; Szamecz *et al.*, 2008; Deplazes *et al.*, 2009; Brina *et al.*, 2011). El cociente **P/M**, sin embargo, sí se reduce en los mutantes *rpl19bΔCT* respecto al calculado para la cepa isogénica silvestre (*RPL19B_{Δi}*), tanto a 28°C como a 18°C (**Figura 64**).

Además, en los perfiles de los mutantes *rpl19bΔCT* se observa una notable acumulación de lo que podrían ser subunidades **60S**, tanto a 28°C como a 18°C, lo que sugiere que las subunidades 60S mutantes (L19eΔCT) podrían tener defectos en unirse a complejos de pre-iniciación 43S. Sin embargo, no se observan *halfmers* en ninguno de los perfiles de las cepas mutantes (PICs 43S que no han accedido al AUG, o bien están ya posicionados en el mismo sin unirse a una 60S, en los ARNm que ya están siendo traducidos por uno o más ribosomas 80S funcionales).

Para investigar la identidad del pico que aparece incrementado en los perfiles de polisomas de los mutantes *rpl19bΔCT* (la mayoría están tipificados en función de las fracciones con determinado porcentaje de sacarosa en las que sedimentan en los gradientes), se purificaron algunas **fracciones de los gradientes** y se analizó la presencia de ARN ribosómicos maduros presentes en las más ligeras (10% al 20%). Para esto, se extrajeron los ARN de las fracciones y ~5 μg se analizaron mediante ensayos de **northern blot** con sondas moleculares de oligonucleótidos marcados radiactivamente complementarios a los ARNr **25S** y **18S** (**Tabla IV de los Anexos**). En las fracciones correspondientes a la zona de sedimentación del primer pico (10-15% sacarosa) se detecta el ARNr 18S, siendo por tanto subunidades 40S. Las siguientes 2 fracciones (15-20% sacarosa) contienen sólo el ARNr 25S y no el 18S, por lo que el pico que incrementa en los mutantes y que aparece en esta zona del gradiente correspondería, en principio, a subunidades 60S maduras (**Figura 65**).

Además, se hibridaron las mismas membranas con un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la secuencia D-A₂ del ITS1 del pre-ARN 35S, detectándose con él la presencia del precursor **20S** del ARNr 18S, tanto en fracciones del WT como de los mutantes. Al hibridar las membranas con el oligonucleótido E-C₂ complementario a la región del ITS2 del

pre-ARNr 35S, se obtuvo una señal que indicaría la presencia de precursores **27Ss** en las fracciones del gradiente correspondientes al 15-20% de sacarosa, en mayor cantidad en el mutante *rpl19bΔ22* que en el WT. Se detecta además la presencia del precursor **24S**, más abundante en las fracciones del mutante *rpl19bΔ22* que en el WT y que en el mutante *rpl19bΔ27*. Estos datos sugieren que, además de subunidades maduras, existirían subunidades inmaduras pre-40S (20S) y pre-60S (27Ss) en las fracciones del gradiente, quizá presentes como contaminantes y no asociados a ARNm. Sin embargo, sí se han detectado en polisomas – involucradas o comprometidas en traducción – subunidades inmaduras pre-40S que contienen el pre-ARNr 20S en algunos mutantes de levadura (Soudet *et al.*, 2010; Garcia-Gomez *et al.*, 2014), pero no subunidades inmaduras pre-60S que contengan alguno de los pre-ARNr 27S.

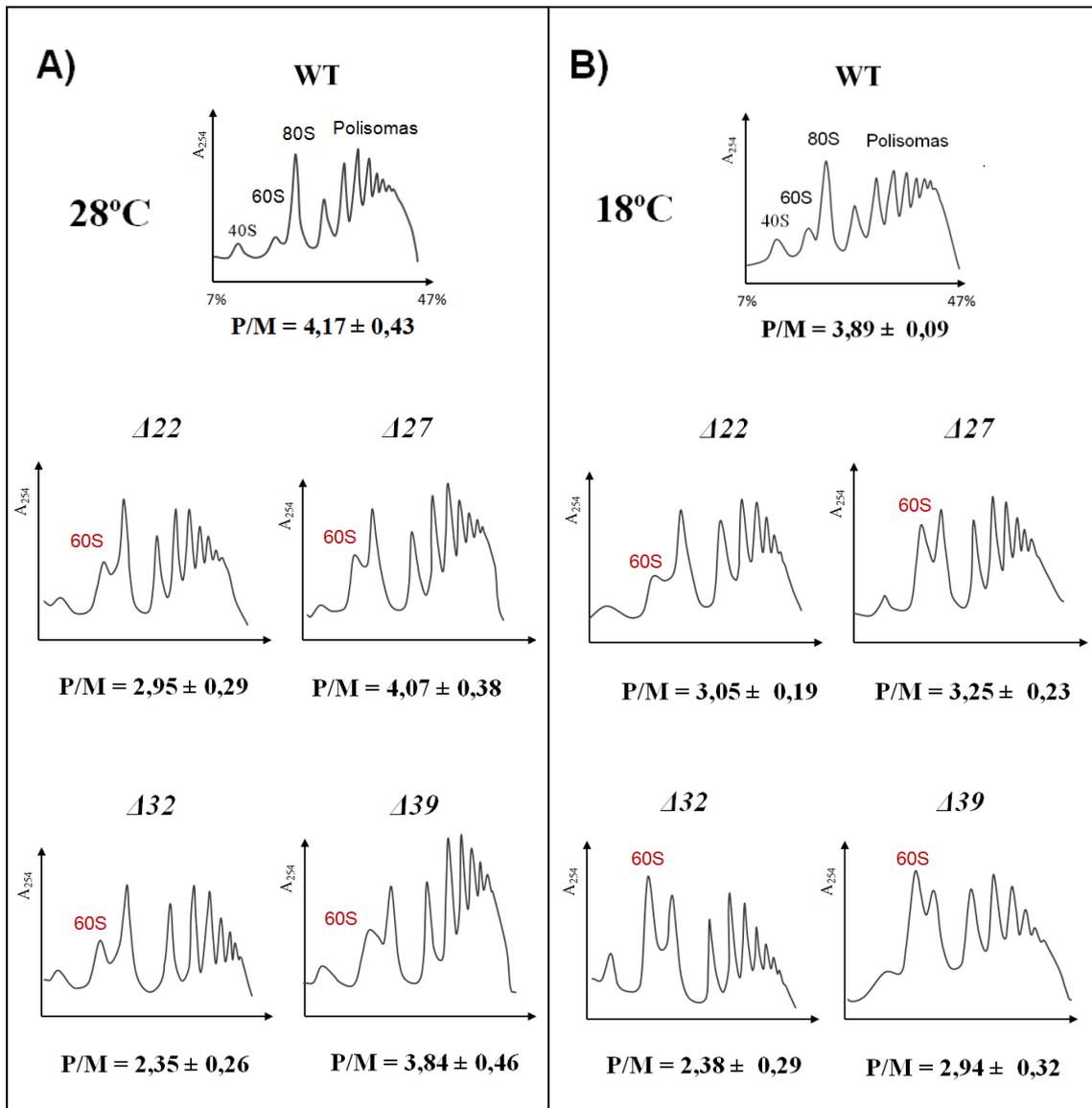


Figura 64. Perfiles de polisomas de los 4 mutantes *rpl19bΔCT*. Células de cada uno de los mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19bΔCT, CEN6 URA3]* se cultivaron a 28°C (**A**) y se transfirieron durante 5 horas a 18°C (**B**). Los picos corresponden (de izquierda a derecha) a subunidades 40S, 60S, a los ribosomas 80S y a los polisomas (disomas, trisomas, etc.). Los valores son la media de 2-3 experimentos realizados de manera independiente (replicados biológicos). Bajo cada perfil se indica el valor del cociente polisomas/monosomas (P/M) de cada cepa y el error estándar de la media de los experimentos.

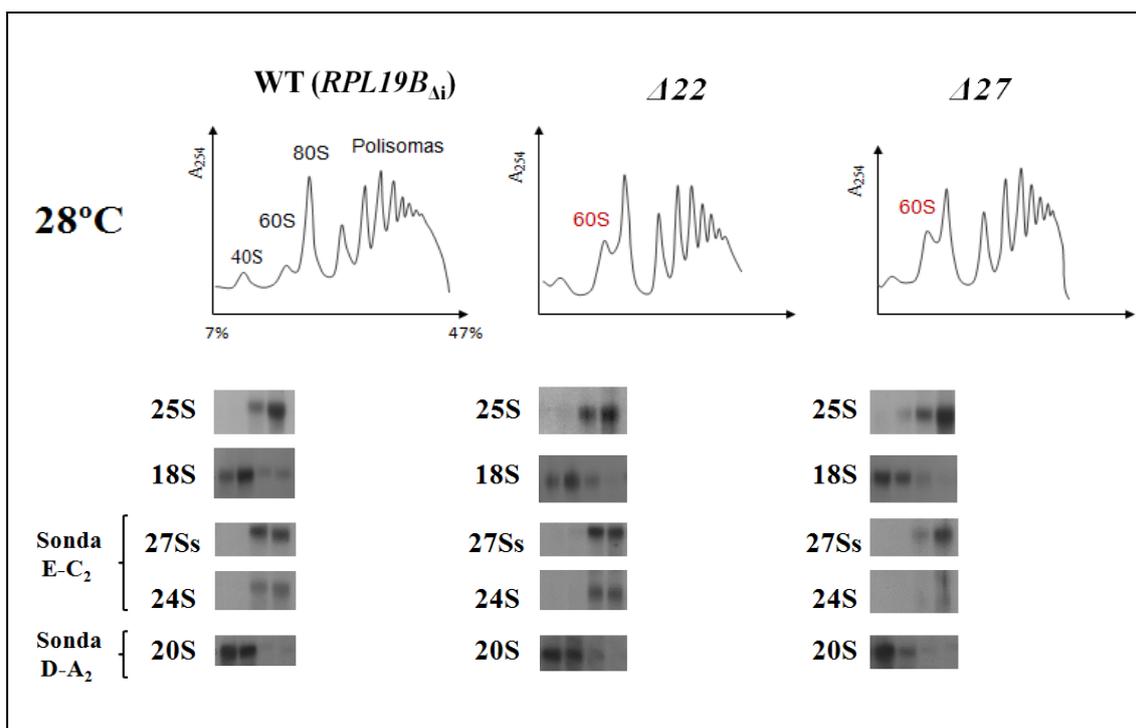


Figura 65. Los mutantes *Arpl19a Arpl19b [rpl19bΔCT, CEN6 URA3]* acumulan subunidades 60S. Se recogieron 4 fracciones de cada uno de los gradientes de polisomas que se representan en la parte superior de la figura, en concreto, en la zona del gradiente continuo que contiene ~10-20% de sacarosa, y se extrajo el ARN total de cada una y se analizaron ~5 μg por northern blot usando como sondas oligonucleótidos marcados radiactivamente que son complementarios al ITS1 (D-A₂) y al ITS2 (E-C₂) del pre-ARNr 35S. Los resultados se muestran en la parte inferior de la figura.

1.2. Defectos en elongación de la traducción general de los ARNm

La elongación es el proceso por el que se forma la cadena polipeptídica de la proteína codificada en el ARNm. Es un proceso cíclico que ocurre en 3 etapas:

- 1) Unión del ARNt cargado con el aminoácido correspondiente en el sitio A del ribosoma.
- 2) Formación del enlace peptídico con el aminoácido anterior.
- 3) Translocación al sitio P del ribosoma, al que está unido el ARNt_i^{Met} – en el primer paso de la elongación – o a la cadena polipeptídica creciente, y salida del ARNt descargado por el sitio E del ribosoma.

Para evaluar la existencia de un posible defecto de los mutantes *rpl19bΔCT* en la elongación de la traducción, se obtuvieron perfiles de polisomas totales de las 4 cepas mutantes *Δrpl19a Δrpl19b [rpl19bΔCT, CEN6 URA3]*. Las células se cultivaron a 28°C en YEPD hasta alcanzar la fase exponencial y se obtuvieron los ECT en ese momento ($t = 0 \text{ min}$) y tras privarlas durante **2 y 5 minutos** de glucosa justo antes de obtener los extractos celulares

(Materiales y Métodos). Se ha descrito que la iniciación de la traducción en levaduras es inhibida rápidamente por la eliminación breve de la glucosa del medio de crecimiento, por lo que no inician nuevos ribosomas la traducción. De este modo, es posible detectar un defecto en elongación, en ausencia de nuevos eventos de iniciación, valorando la velocidad con la que ocurre un “*polysomal run off*”, o desensamblaje de los ribosomas involucrados en la traducción global de los ARNm. La inhibición de la traducción es rápida, reversible y específica para la eliminación de glucosa o fructosa en *S. cerevisiae* y no afecta de forma detectable a la transcripción de los ARNm por la ARN-Polimerasa II (Ashe *et al.*, 2000). Los ECT se obtienen en ausencia de cicloheximida, por lo que, en esta situación, queda inhibida la iniciación por la privación de glucosa, pero no la elongación. Por tanto, en estas condiciones, se puede observar el “*run off*” de los polisomas, el cual se produce más lentamente en mutantes de elongación que en las cepas WT, y es concomitante con un aumento en la fracción de monosomas 80S (Ashe *et al.*, 2000; Iglesias-Gato *et al.*, 2011). Por lo tanto, la fracción observable de polisomas residuales tras el *run off* en una cepa WT sería menor que en cepas mutantes con defectos en elongación.

En las condiciones indicadas, se observa siempre que la cantidad residual de **polisomas** se reduce respecto a la fracción libre de los **monosomas** que aumenta notablemente (se reduce drásticamente el cociente P/M) e incrementan las cantidades de **60S** y **40S** al estar impedida la iniciación (**Figura 66**). El cociente o cantidad relativa de polisomas/monosomas **P/M** sería mayor en los mutantes que en el WT cuando defectos en elongación, independientemente de que el contenido total o neto de monosomas y polisomas sea menor en los mutantes que en un WT. Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que no está alterada la cinética de elongación de la traducción en los mutantes *rpl19bΔCT* (**Figura 66**). No obstante, en el mutante *rpl19bΔ22* el cociente P/M es ligeramente mayor (0,63) que el de la cepa WT tras 2 minutos sin glucosa (0,55). En estos experimentos se observa además que la privación de glucosa 2 min es suficiente para inhibir completamente la iniciación en las cepas empleadas (**Figura 66**).

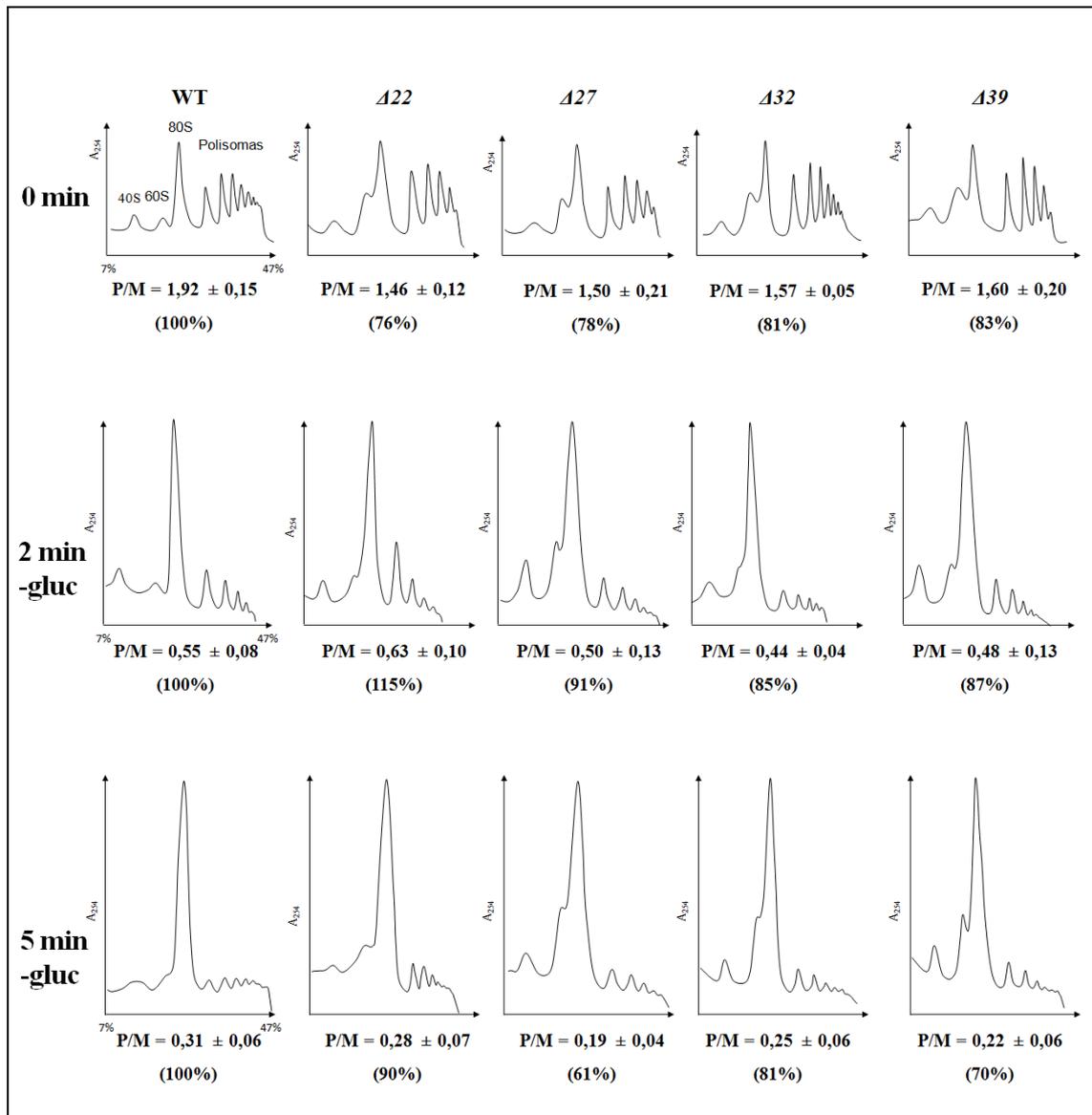


Figura 66. Perfiles de polisomas de los 4 mutantes *rpl19b*ΔCT. Se obtuvieron ECT de los 4 mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19b*ΔCT, *CEN6 URA3*] y de la cepa isogénica silvestre (*RPL19B*_{Δi}) tras cultivar células de cada una de las cepas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial (t = 0 min) y después de inhibir la iniciación de la traducción 2 ó 5 minutos mediante la privación de glucosa. Bajo cada perfil se indica el cociente P/M y el error estándar de la media. Los valores son la media de 2-3 experimentos realizados de manera independiente.

2. DEFECTOS TRADUCCIONALES DE MUTANTES CON INSUFICIENCIA DE L19e

2.1. Disminución progresiva de la dosis de L19e

Para investigar cómo afecta a la traducción la reducción progresiva de la dosis de L19e, se obtuvieron perfiles de polisomas de la cepa Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [$pGAL::RPL19B_{\Delta i}$, $CEN4 URA3$]). Para ello, células de esta cepa se cultivaron en dos condiciones, primero en YEPG (para inducir la síntesis de la proteína L19e en cantidad elevada) hasta fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0,8$), y después se transferirlas a YEPD durante 8 y 16 horas a 28°C para reprimir la síntesis de L19e (**Figura 67**). Antes de transferir las células a YEPD (**0 horas**) el perfil de polisomas obtenido es el típico de una cepa silvestre. Sin embargo, después de **8 horas**, se observa en el perfil una acumulación de subunidades **40S** libres acompañada de una disminución de subunidades **60S**. Se observa también, una reducción notable de monosomas **80S** y aparecen numerosos *halfmers* asociados a monosomas, disomas y trisomas, es decir, PICs 43S unidos a los ARNm. Finalmente, tras **16 horas** en YEPD, se observa que ya no se sostiene la traducción, no se detectan subunidades **40S** y muy pocas **60S**, solamente quedan **monosomas** y desaparecen los **polisomas** del gradiente casi en su totalidad.

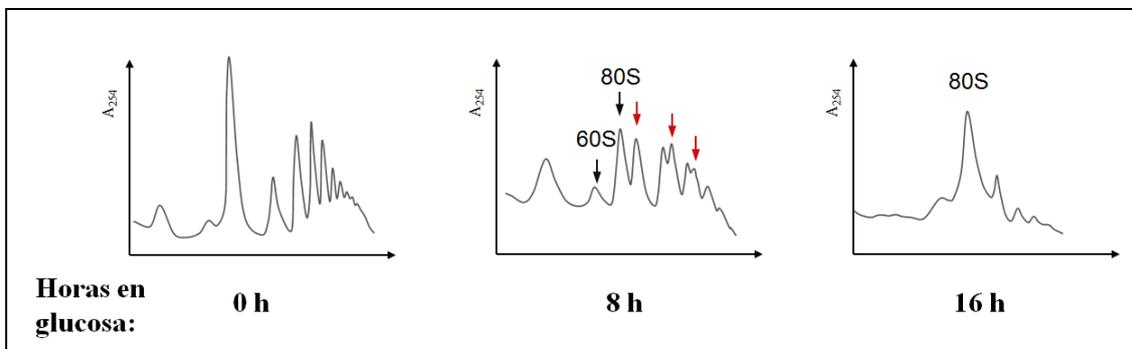


Figura 67. Perfiles de polisomas de la cepa que expresa un alelo condicional $pGAL::RPL19B_{\Delta i}$ en condiciones de inducción y de represión de la síntesis de L19e. Células de la cepa Hm670 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [$pGAL::RPL19B_{\Delta i}$, $CEN4 URA3$]) se cultivaron en YEPG y se transfirieron a YEPD a 28°C tomando muestras a las 8 y 16h. Se procedió como se indica en la Figura 64 para la obtención de los ECT y el fraccionamiento de los gradientes de sacarosa. Los *halfmers* se indican con flechas rojas.

2.2. Pseudo-haploinsuficiencia de L19e

Para investigar los efectos sobre la traducción debidos a la pseudo-haploinsuficiencia de L19e, se obtuvieron perfiles de polisomas de la cepa silvestre BY4741 (*RPL19A RPL19B*) y de los mutantes Y07156 ($\Delta rpl19a$) e Y03053 ($\Delta rpl19b$), tras cultivar células en YEPD a 28°C hasta fase exponencial, $DO_{260nm} \sim 0,8$.

La reducción parcial de la dosis de L19e causada por la delección de *RPL19A* o de *RPL19B*, conduce a una drástica reducción de la cantidad de subunidades **60S** y de **monosomas**, acompañadas por una ligera acumulación de subunidades **40S** libres y por la aparición de numerosos *halfmers* asociados a monosomas, disomas y trisomas. Además, se observa en los perfiles una disminución de la cantidad neta de **polisomas** en las cepas mutantes de delección sencilla $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ (del 35% en $\Delta rpl19a$ y del 40% en $\Delta rpl19b$), por lo que el cociente P/M (3,2 en $\Delta rpl19a$ y 3,0 en $\Delta rpl19b$) es menor que el de la cepa WT (3,7). También se observa en ambos mutantes una reducción del tamaño medio de los polisomas en relación al perfil obtenido para la cepa isogénica silvestre (**Figura 68**).

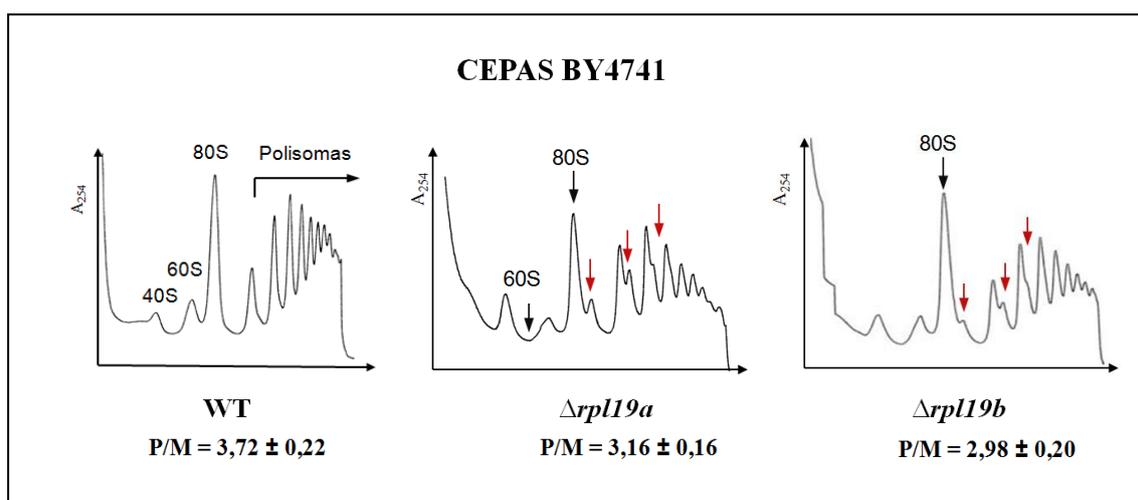


Figura 68. Perfiles de polisomas de cepas pseudo-haploinsuficientes de L19e. Se cultivaron las células en YEPD a 28°C y se obtuvieron los perfiles como ya se ha indicado anteriormente. Bajo cada perfil se indica el cociente polisomas/monosomas (P/M) y el error estándar de la media. Los resultados son consistentes en al menos 2-3 replicados biológicos independientes.

3. DEFECTOS CONCRETOS EN INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE MUTANTES *rpl19b*ΔCT

3.1. Unión de subunidades ribosómicas 60S a 40S

Los perfiles de polisomas de los mutantes *rpl19b*ΔCT sugieren que podrían tener defectos en la unión de la subunidad 60S al PIC 43S en la fase final de la iniciación de la traducción. En *S. cerevisiae*, *FUN12* codifica el factor de iniciación eIF5B, una GTPasa esencial para que se produzca la unión entre ambas subunidades ribosómicas en el evento final de la fase de iniciación (Pestova *et al.*, 2000). Además, se ha descrito que la proteína FUN12 (eIF5B) también promueve la actividad GTPasa de la endonucleasa NOB1, que produce en el corte en el sitio D del pre-ARNr 20S para su procesamiento al ARNr 18S maduro (Lebaron *et al.*, 2012). Como se observa en la **Figura 54**, en los mutantes *rpl19b*ΔCT se observa una importante acumulación de este precursor.

Puesto que defectos en el procesamiento del precursor 20S a ARNr 18S podrían contribuir al fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19b*ΔCT, investigamos si la sobreexpresión de *FUN12* sería capaz de corregir ese fenotipo, es decir, de favorecer la unión de subunidades 60S a 40S en los mutantes y/o bien el procesamiento del pre-ARNr 20S, facilitando así la formación de subunidades 40S maduras disponibles para su unión al ARNm. Se transformaron las cepas Δ*rpl19a* Δ*rpl19b* [*rpl19b*ΔCT, *CEN6 LEU2*] con el plásmido multicopia episómico pC477 (*hcFUN12*, *URA3*) (**Tabla II de los Anexos**). El fenotipo de crecimiento de los transformantes se analizó en relación al de las respectivas cepas WT portadoras de un alelo silvestre *RPL19B*_{Δi}, como control positivo, o del vector vacío pRS316, como control negativo. Se obtuvieron colonias aisladas de todas las cepas mediante estría en placas de SD que se incubaron a 28°C, 18°C y 37°C. Como se observa en la **Figura 69**, la sobreexpresión de *FUN12* corrige parcialmente el fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19b*ΔCT a todas las temperaturas ensayadas.

Por otra parte, los mutantes Δ*rpl19a* Δ*rpl19b* [*rpl19b*ΔCT, *CEN6 LEU2*] se transformaron también con el plásmido multicopia episómico pAS425 (*hcPAB1*, *URA3*). *PAB1* es un gen esencial que codifica la proteína de unión a las colas de poli (A) en los extremos 3' de los ARNm, participando en su estabilización (Jacobson and Peltz, 1996). PAB1 interacciona con el factor de iniciación eIF4G, el cual forma parte del complejo eIF4F que se une al extremo 5' cap de los ARNm, y facilita la aproximación de los extremos 3' y 5' de los mismos estimulando la iniciación de la traducción (Wells *et al.*, 1998; Marcotrigiano *et al.*, 2001; Sonenberg and Dever, 2003; Marintchev *et al.*, 2009; Rajagopal *et al.*, 2012). Además, también se había propuesto un modelo en el que PAB1 promueve la unión de las subunidades ribosómicas 60S y 40S inhibiendo la acción de las ARN-Helicinas SKI2 y SLH1, que a su vez inhibirían a los factores de iniciación eIF5 y eIF5B (Searfoss *et al.*, 2001). Sin embargo, la sobreexpresión de

PAB1 en los mutantes *rpl19bΔCT*, no sólo no corrige sus fenotipos *slg*, sino que los exagera (**Figura 69**). Por el contrario, la sobreexpresión de *PAB1* en mutantes *rpl33a-G76R* corrige parcialmente su fenotipo *slg*, y se ha demostrado que causa un incremento sustancial de las cantidades netas del pre-ARNr 35S y de los ARN maduros 25S y 18S (Martin-Marcos *et al.*, 2007).

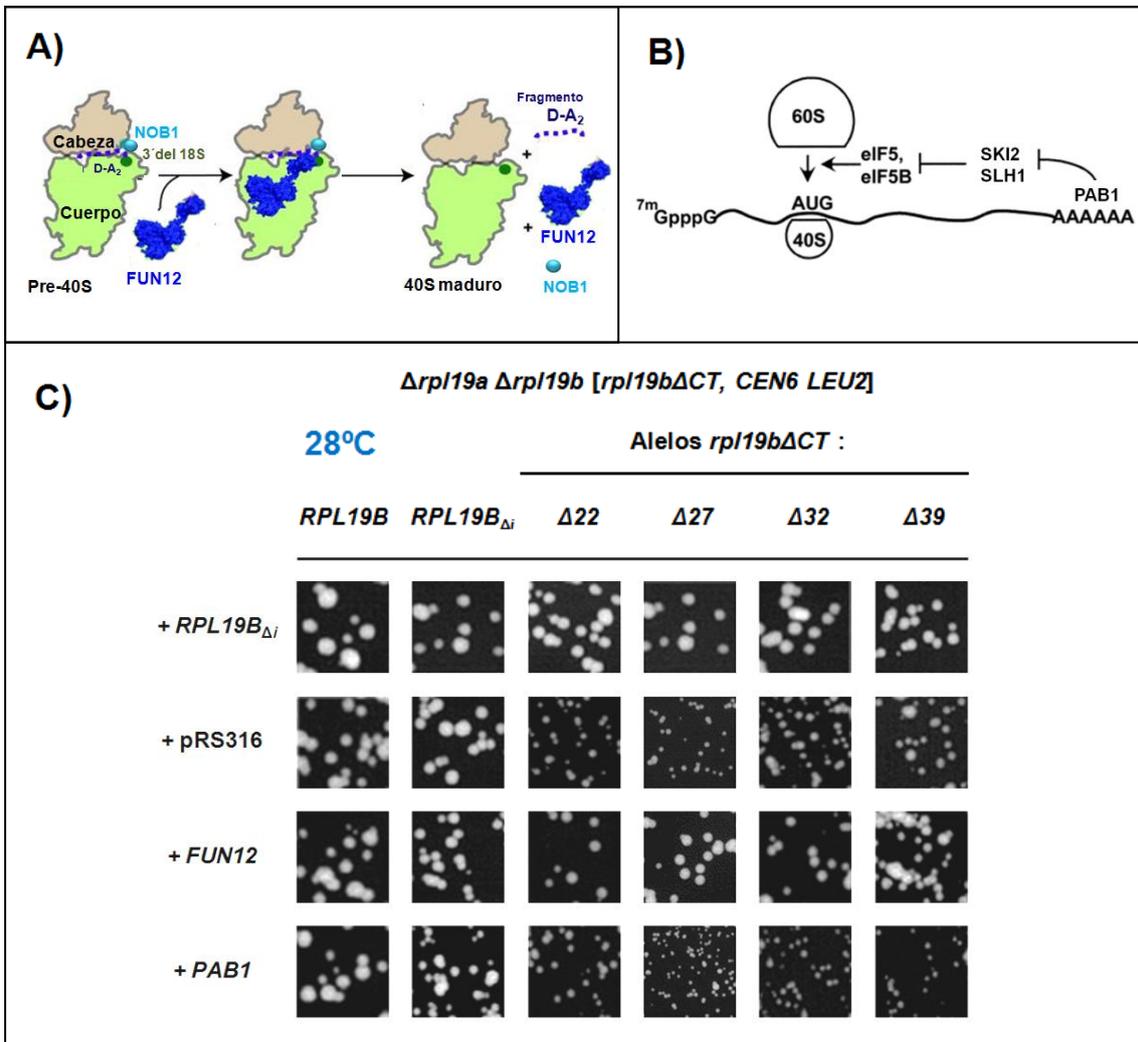
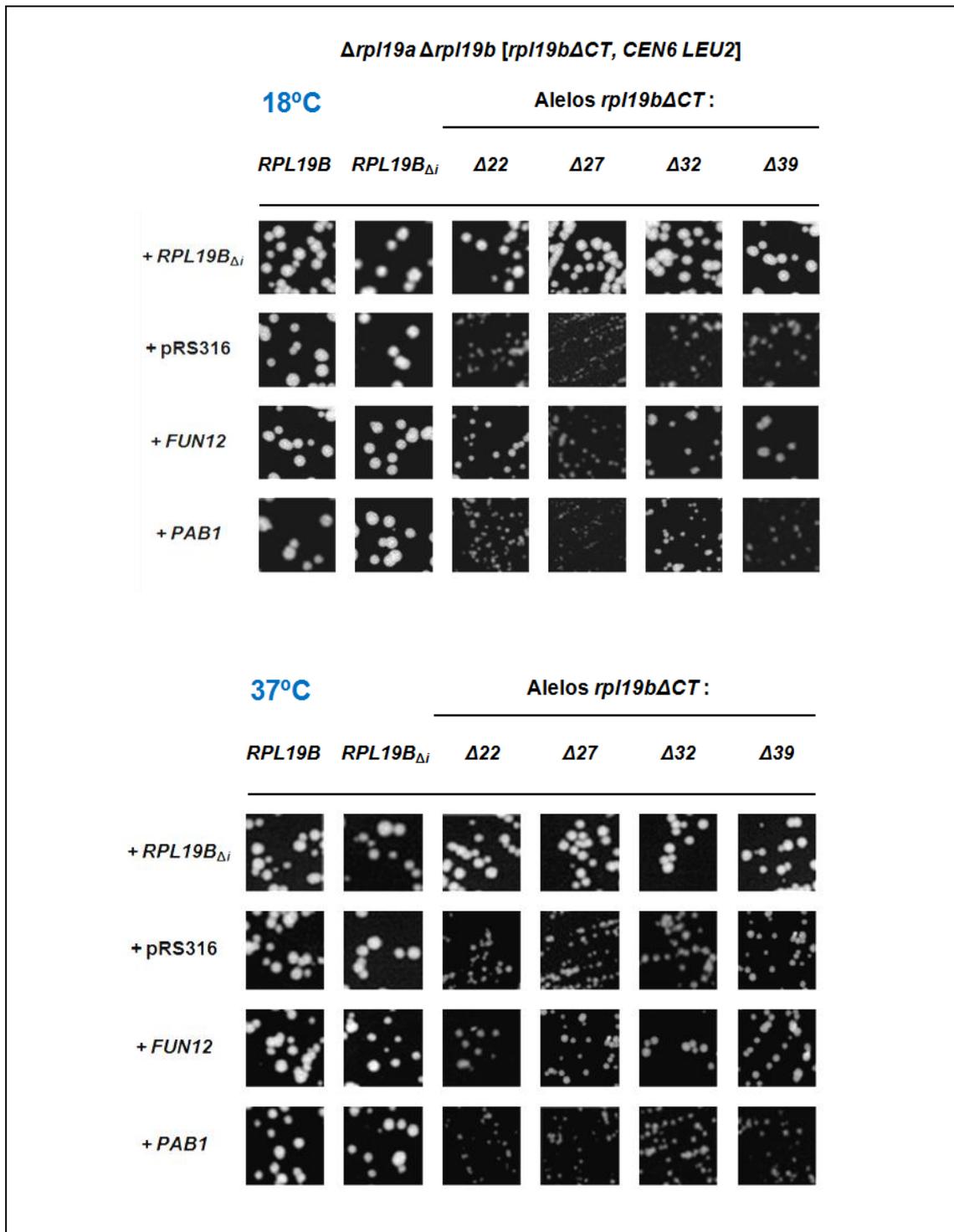


Figura 69. Supresión parcial del fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19bΔCT* por hcFUN12 (eIF5B) y no por hcPAB1. **A)** Modelo de procesamiento del precursor 20S del ARNr 18S promovido por FUN12 (Modificado de Lebaron *et al.*, 2012). **B)** Modelo de actuación de PAB1 y FUN12 (eIF5B) en el inicio de la traducción propuesto por (Searfoss *et al.*, 2001). **C)** Fenotipo de mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT*, *CEN6 LEU2*] transformados con vector vacío pRS316, o con plásmidos pAJ1 (L19B), pC477 (hcFUN12) y pAS425 (hcPAB1) en placas de SD incubadas a 28°C 2-3 días, 37°C 2 días o a 18°C durante 5 días (excepto el mutante *rpl19bΔ27* que se fotografió 1 día más tarde a todas las temperaturas). La imagen corresponde a secciones ampliadas de cada placa para poder observar y comparar mejor el tamaño de las colonias.



Continuación Figura 69 C) Supresión parcial del fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19b* Δ CT por hcFUN12 (eIF5B) y no por hcPAB1.

3.2. Defectos en la Fidelidad de la Traducción

a) Análisis de sensibilidad a antibióticos que afectan a la traducción:

Para investigar si alguno de los mutantes de *rpl19bΔCT* podría tener defectos en la eficiencia o en fidelidad de la traducción, se analizó su resistencia o sensibilidad a distintos **antibióticos** que inhiben la traducción en eucariotas afectando a sus ribosomas, tanto a la función descodificadora del ARNm, como a la actividad peptidil-transferasa (Véase Materiales y Métodos).

Las cepas del fondo genético BY4741 de la delección sistemática de genes individuales utilizadas en este trabajo tienen integrado un gen que produce en levaduras resistencia a Geneticina (G-418) ($\Delta rpl19b::KanMX4$). Para evitar posibles fenómenos de resistencia cruzada con los antibióticos a utilizar, se realizó la delección del gen *RPL19B* en un fondo genético diferente derivado de la cepa S288C (Mortimer and Johnston, 1986), la cepa H96, procedente del laboratorio del Dr. A. G. Hinnebusch (Harashima and Hinnebusch, 1986). Se obtuvo la cepa **Hm586** (cepa **H96** $\Delta rpl19b::HISG$) (Materiales y Métodos), que se transformó con los diferentes plásmidos [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*] para analizar la sensibilidad o resistencia de los mutantes *rpl19bΔCT* a estos antibióticos. En esta cepa está presente el alelo WT de *RPL19A*, por lo que las mutaciones *rpl19bΔCT* deberían ser semi-dominantes para poder detectar algún tipo de efecto cuando están clonadas en plásmidos.

Se realizaron ensayos de **goteo** sobre placas de medio SD⁺ suplementadas con diferentes concentraciones de cada uno de los antibióticos, para lo que se hicieron diluciones seriadas de células en cultivo crecidas a 28°C en medio líquido SD⁺ hasta fase exponencial. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 28°C. Como se observa en la **Figura 70**, las células de los transformantes de la cepa **Hm586** *gcn2-101 gcn3-101 Δrpl19b::HisG* con plásmidos que portan alelos mutantes [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*] presentan una ligera sensibilidad respecto a la cepa WT frente a **anisomicina**, un antibiótico que inhibe la **actividad peptidil-transferasa** de la subunidad 60S del ribosoma.

El mutante $\Delta rpl19b::HisG$ [*rpl19bΔ27*, *CEN6 URA3*] es algo más sensible que la cepa isogénica silvestre a antibióticos que afectan a la **función descodificadora** de la subunidad 40S del ribosoma, como son **higromicina B**, **neomicina**, y la **paromomicina**, lo que sugiere que en este mutante podría estar ligeramente afectada la fidelidad de la traducción (**Figura 70**).

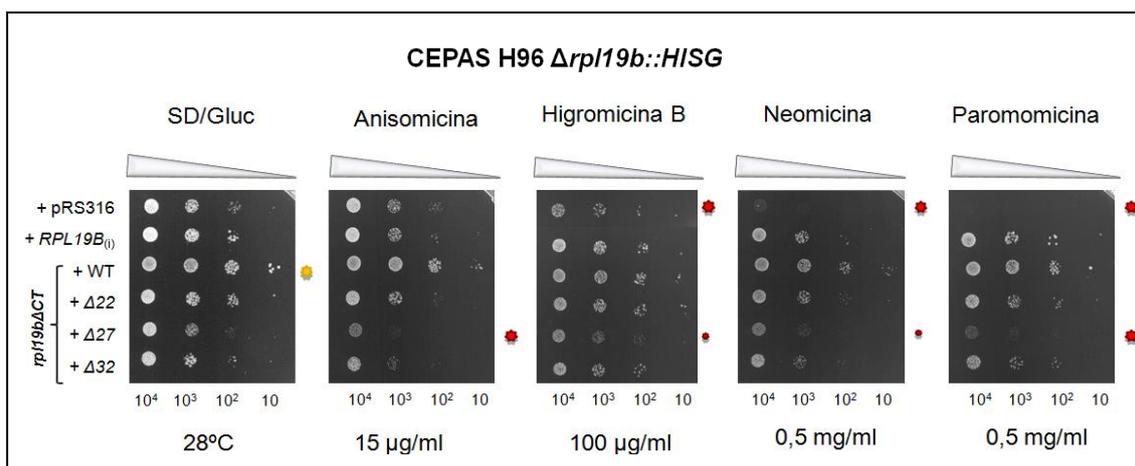


Figura 70. Sensibilidad de los mutantes *rpl19bΔCT* a antibióticos inhibidores de la traducción. Células de cepas mutantes **H96Δ*rpl19b::HisG* [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*]** se cultivaron en YEPD hasta fase exponencial, se diluyeron hasta una DO_{600} de 0,02 y se hicieron diluciones seriadas en placas de SD^+ suplementadas con distintas concentraciones de antibióticos: anisomicina (15 $\mu\text{g/ml}$), higromicina B (100 $\mu\text{g/ml}$), neomicina (0,5 mg/ml) y paromomicina (0,5 mg/ml). Las placas se incubaron a 28°C durante 2 ó 3 días. Con un asterisco rojo se indican las cepas que parecen presentar mayor sensibilidad a cada compuesto. Con un asterisco amarillo se marca un exceso de células por dilución de esa cepa.

b) Análisis del mantenimiento del virus *Killer*:

Defectos en la **fidelidad de la traducción** o en la **biogénesis de subunidades 60S** afectan a la capacidad de las levaduras para mantener el virus M1 del sistema *Killer*, lo que resulta en una reducción o pérdida de ese fenotipo *Killer* [$K1^-$] (*Killer*⁻) (Wickner, 1996; Rhodin and Dinman, 2010; Rhodin *et al.*, 2011). El fenotipo *Killer* requiere la presencia de los siguientes ARNs de doble cadena:

- *ds RNA L-A Helper Virus* → Codifica una proteína de la cápsida del virus (GAG) y una ARN-polimerasa (pol), que se sintetizan como la proteína de fusión GAG-pol producida por un cambio de fase programado (Dinman *et al.*, 1991), por lo que si existen defectos en la fidelidad de la traducción, estas proteínas GAG-pol no se sintetizan.
- *ds RNA M1 Satellite Virus* → Este virus está encapsidado en las partículas virales GAG codificadas por el virus L-A. El ARN M1 codifica la toxina *Killer K1*, que actúa directamente sobre KRE1, una proteína de ensamblaje de la pared celular unida a la membrana plasmática por su GPI de anclaje C-terminal. Esta toxina es letal para otras células de levadura al alterar la función de su membrana plasmática. La inhibición del crecimiento se observa como un “halo” cuando células [$K1^+$] (*Killer*⁺) se ubican y crecen sobre o cerca de células [$K1^-$] (*Killer*⁻) (Breinig *et al.*, 2002).

Defectos en la fidelidad de la traducción pueden alterar la síntesis de las proteínas híbridas GAG-pol, e inhibir la capacidad de las células de levadura para mantener el virus M1, perdiendo el fenotipo *Killer* (Dinman and Wickner, 1992). Se investigó por tanto si alguno de los mutantes *rpl19bΔCT* podría tener **defectos en el mantenimiento del virus M1**.

En primer lugar, se analizó si las cepas Hm568 ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT CEN6 URA3*]), H96 $\Delta rpl19b$ y Hm498 $\Delta rpl19b$, así como BY4741 (WT), Y07156 ($\Delta rpl19a$) e Y03053 ($\Delta rpl19b$); H96, H96 $\Delta rpl19a$; Hm498 y Hm498 $\Delta rpl19a$, tenían o no fenotipo *Killer*. Para ello, se aislaron colonias y con 10 clones de cada cepa se hizo una placa *máster* en SD⁺ que se incubó a 28°C. Por otra parte, se preparó un césped de células de la cepa diploide **5X47** [*K1*⁻] en varias placas de medio **MB 4.7** (Materiales y Métodos). Sobre la impresión en terciopelo de cada placa con el césped de la cepa *K1*⁻, se replicó una placa *máster* con los clones aislados que se incubaron durante 48 horas a 28°C. Como control negativo, se utilizó la cepa **37-4C** [*K1*⁻], y como control positivo la cepa **1101** con fenotipo *Killer* [*K1*⁺] (Materiales y Métodos). Después de 2 días, se observó qué clones creaban un halo de inhibición del crecimiento sobre la cepa [*K1*⁻], y se concluyó que únicamente las cepas **H96, Hm498 y Hm498 $\Delta rpl19b$** tienen fenotipo *Killer* [*K+*] (**Figura 71**). Por lo tanto, la única cepa del grupo que es *Killer* en ausencia de L19B es **Hm498 $\Delta rpl19b$** . A continuación, transformó esta cepa con los 4 plásmidos [*rpl19bΔCT, CEN6 URA3*] portadores de las distintas mutaciones de parada temprana de lectura que predicen proteínas L19e Δ CT y se realizó nuevamente el experimento. Se observó que todos los transformantes crean un halo de inhibición del crecimiento similar al de la cepa WT (*RPL19B_{Δi}*) sobre la cepa [*K1*⁻]. Este resultado indica que los mutantes *RPL19A rpl19bΔCT* mantienen el fenotipo *Killer*, por lo que las correspondientes mutaciones no causan su pérdida en presencia del parólogo *RPL19A* (**Figura 71**).

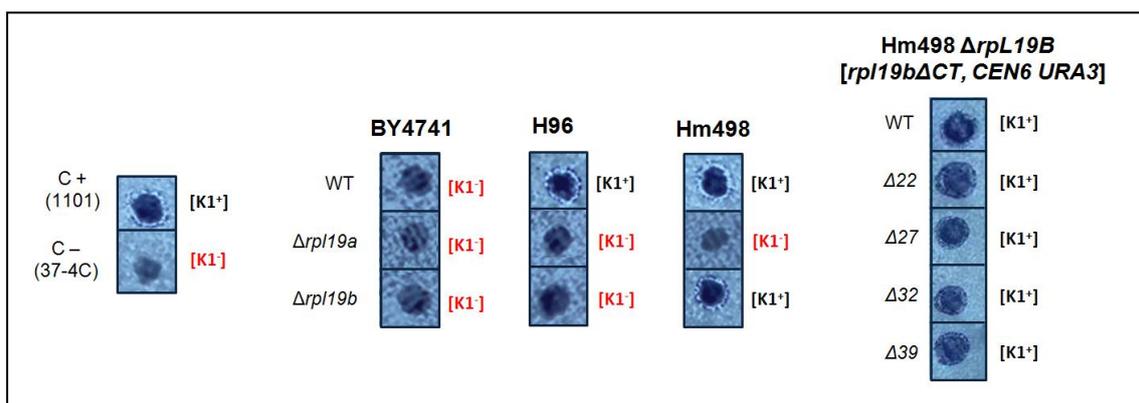


Figura 71. Ensayo de mantenimiento del fenotipo *Killer* en cepas con deleciones $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$ en diferentes fondos genéticos, y de las cepas mutantes Hm498 $\Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT, CEN6 URA3*]. Las cepas *Killer* [*K1*⁺], producen un halo de inhibición del crecimiento de la cepa [*K1*⁻], que no desarrollan las cepas no *Killer* [*K1*⁻].

c) **Reconocimiento del codón óptimo del inicio de la traducción:**

Utilizando herramientas de genética de levaduras se han identificado mutaciones que afectan a la fidelidad en la selección del codón de inicio de la traducción (Donahue and Cigan, 1988; Yoon and Donahue, 1992; Martin-Marcos *et al.*, 2011). Una cepa silvestre crece en un medio sin histidina (His^+), pero si se muta el codón AUG del gen *HIS4* (mutación *his4-301*), la cepa no es capaz de crecer en un medio sin histidina (His^-). Este fenotipo se puede suprimir por mutaciones *sui*, que disminuyen la fidelidad en la selección del codón de iniciación y pueden iniciar la traducción en codones UUG, causando fenotipo His^+ en mutantes que portan la mutación *his4-301*. Existe una segunda clase de mutaciones, denominadas *ssu* (supresores de *sui*) que suprimen la iniciación en UUG, por lo que no pueden traducir la ORF de *HIS4* mutante con este codón y no crecen en ausencia de histidina (His^-). Estos mutantes se pueden caracterizar además cuantitativamente valorando la expresión de transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con diferente codón de inicio (AUG o UUG). En mutantes *sui*, el cociente UUG/AUG aumenta (disminuye la fidelidad en el inicio de la traducción); en mutantes *ssu*, que se valora en presencia de mutaciones *sui*, el cociente UUG/AUG disminuye (aumenta la fidelidad en el inicio de la traducción) (Figura 72).

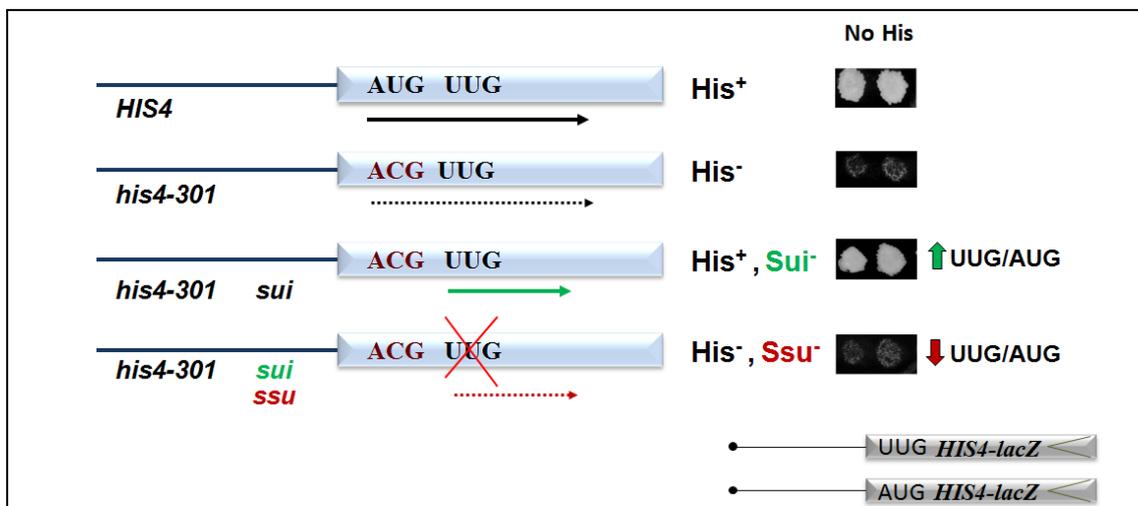


Figura 72. Reconocimiento del codón de inicio de la traducción en mutantes *sui* o *ssu*. Una mutación en el AUG del gen *HIS4* hace que la cepa no sea capaz de crecer en un medio sin histidina (His^-). Este fenotipo se puede suprimir por los mutantes *sui*, produciendo un fenotipo His^+ . Sin embargo, los mutantes *ssu* no crecen en ausencia de histidina. Además, midiendo la expresión de transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con diferente codón de inicio (AUG o UUG), si el ratio UUG/AUG aumenta, la fidelidad de la traducción sería menor, y a la inversa.

En *S. cerevisiae* existen mutaciones que afectan a factores de inicio de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 o eIF5, que provocan la estabilización de los PIC 43S en codones UUG, disminuyendo la fidelidad en la selección del codón de inicio de la traducción, por lo que presentan fenotipo **Sui⁻** (para revisión ver Hinnebusch, 2014). En el caso de la subunidad 40S, mutaciones en los genes *RPS5* y *RPS16*, que codifican las proteínas ribosómicas S5 y S16, también causan fenotipo **Sui⁻**. La proteína S5 interacciona con S16, y ésta a su vez contacta con el ARNt_i^{Met} en el sitio P, de modo que las proteínas alteradas impiden la correcta formación de los PIC 48S y reducen la fidelidad en el inicio de la traducción (Ghosh *et al.*, 2014). Del mismo modo, mutaciones en el ARNr 18S en zonas cercanas al sitio P producen fenotipo **Sui⁻** (Dong *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha descrito que el mal funcionamiento de subunidades 60S, debido a alteraciones de su conformación estructural causadas por mutaciones en el ARNr 25S, puede impedir la unión correcta de las mismas con los PIC 48S, causando (i) *leaky scanning* de codones canónicos AUG o (ii) disociación de los PIC del ARNm en ese punto; en ambos casos, disminuye la iniciación en codones AUG, pero también en codones UUG, causando fenotipo **Ssu⁻** (Hiraishi *et al.*, 2013).

En los mutantes *rpl19bΔCT* se acumula el pre-ARNr 20S, lo que sugiere que quizá contengan una alta proporción de subunidades pre-40S inmaduras que podrían tener alterada su función en el reconocimiento del codón de inicio de la traducción. Así, para investigar si las cepas mutantes *rpl19bΔCT* muestran defectos en la fidelidad de selección del codón de inicio de la traducción, se hicieron ensayos de actividad de **β-galactosidásica** para cuantificar la expresión *in vivo* de varios transcritos de fusión **HIS4::LacZ** que tienen (i) o bien un codón canónico **AUG** en contexto favorable para la iniciación (ii) o un codón **UUG** al que los PICs 43S no reconocen o lo hacen con baja eficiencia.

Para ello, se analizaron, en ensayos realizados por triplicado, 4 transformantes de cada uno de los mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT*, *CEN6 LEU2*] transformados con los plásmidos **p367** (**HIS4::LacZ** [**AUG**]) o **p391** (**HIS4::LacZ** [**UUG**]). Para realizar estos ensayos, las células se cultivaron en medio líquido SD⁺ a 28°C hasta fase exponencial. Como control se utilizó un mutante del gen *SUI1* (**sui1-1**), que codifica el factor eIF1 (cepa TD301-4D), en el que la iniciación de la traducción ocurre con mayor frecuencia de lo normal en codones UUG en relación a la de inicio en codones AUG (Yoon and Donahue, 1992). No se observó ningún aumento significativo de la expresión del ARNm *HIS4* con un codón de inicio UUG respecto al que lleva el AUG en ninguno de los mutantes *rpl19bΔCT* respecto a la cepa WT, como sí ocurre en mutantes *sui1-1*, en los que la expresión desde un UUG incrementa hasta ~35 veces respecto a los valores obtenidos para una cepa WT *RPL19B_{Δi}* (**Figura 73**).

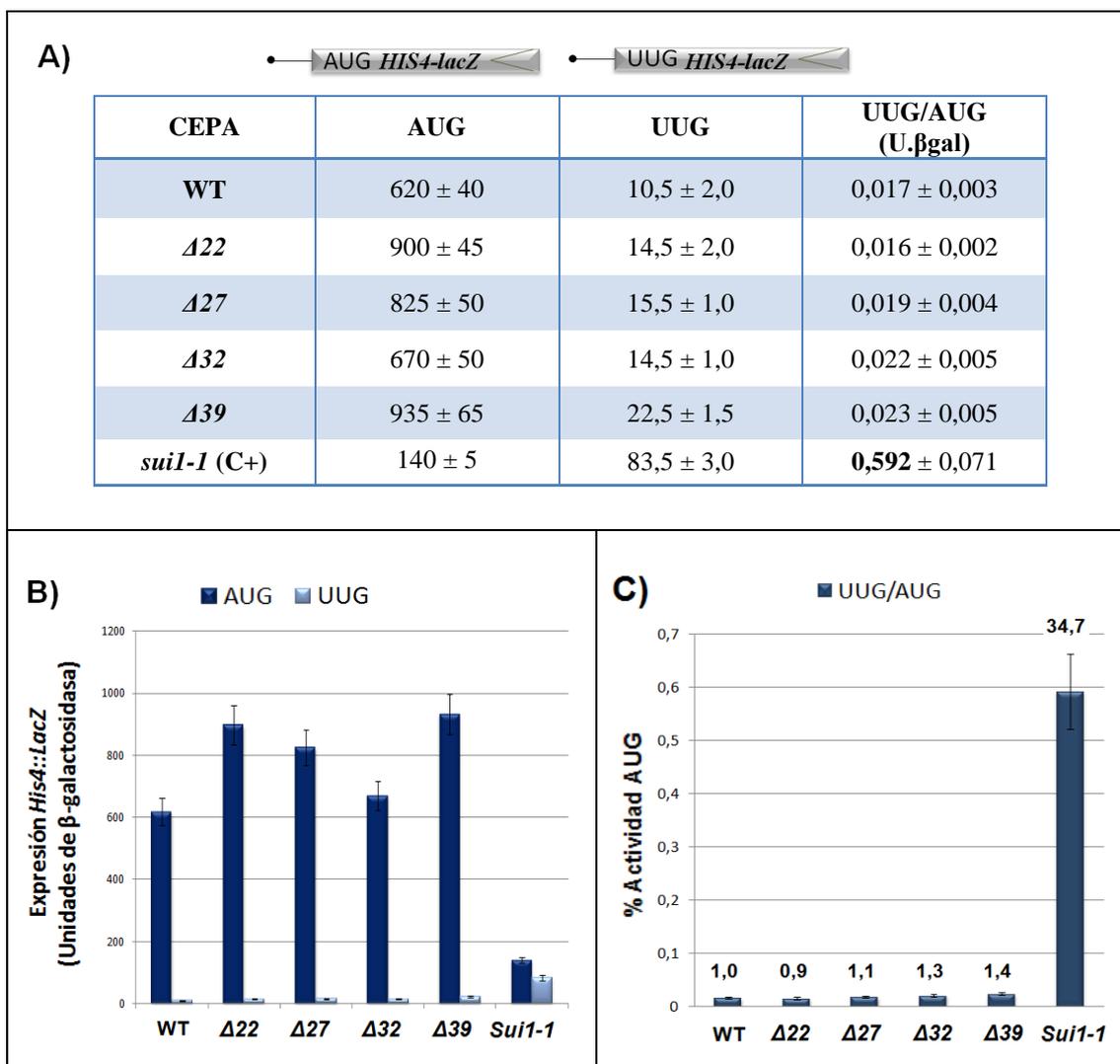


Figura 73. Expresión de transcritos de fusión *His4::LacZ* con codones de inicio AUG o UUG en mutantes $\Delta rpl19a$ $\Delta rpl19b$ [*rpl19bACT*, *CEN6 LEU2*]. Se cuantificó la actividad β -galactosidásica como se indica en Materiales y Métodos y las unidades se expresan como nanomoles de o-nitrofenol liberados del sustrato cromogénico artificial o-nitrofenil- β -1,6-D-galactopiranosido por minuto y por miligramo de proteína total. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos realizados con 4 clones diferentes de cada una de las cepas. Se muestran también los errores estándar. **A)** Cuantificaciones de la actividad b-galactosidásica de los transcritos *His4::LacZ*. **B)** Representación gráfica de la expresión de *His4::LacZ*. **C)** Representación del cociente de los valores de actividad que indican la expresión de *HIS4* cuando posee el codón de inicio UUG frente a la expresión cuando posee AUG. La proporción del incremento del cociente UUG/AUG en cada una de las cepas respecto al WT (1,0) se indica encima de la barra correspondiente.

4. TRADUCCIÓN DEL ARNm *GCN4* EN MUTANTES *rpl19*

Además de investigar cómo afectan las mutaciones *rpl19bΔCT* a la traducción global de los ARN mensajeros, se investigó cómo afectarían a la regulación traduccional del ARNm *GCN4* (Hinnebusch, 2005). En el laboratorio, la privación de aminoácidos se causa a la levadura de forma controlada, añadiendo al medio análogos que inhiben la biosíntesis de un aminoácido concreto. Uno de los más empleados por la falta de efectos secundarios es el **3-amino-1,2,4-triazol (3-AT)**, un análogo de la histidina que inhibe competitivamente la actividad de la enzima histidinol-deshidrogenasa, codificada por el gen *HIS3* (Lucchini *et al.*, 1984). Así, cuando se añade 3-AT e histidina conjuntamente, se contrarrestan completamente los efectos del compuesto sobre el crecimiento celular (Hinnebusch, 2005). Para células de levadura que son ya *per se* auxótrofas de histidina por alguna mutación, se suplementa el medio con histidina y se usa para causar desrepresión del CGBA el compuesto **5-metil-DL-triptófano (5-MT)**, un análogo de triptófano que inhibe por un mecanismo de feed-back la actividad de la enzima antranilato-sintasa, codificada por el gen *TRP2* (Miozzari *et al.*, 1977).

La traducción del ARNm de *GCN4* y el CGBA están reprimidos constitutivamente en mutantes *gcn*, por lo que cepas *gcn GCD* no pueden desreprimir la traducción de *GCN4* y no crecen en 3-AT (**3-AT^S**, fenotipo **Gcn⁻**). Mutaciones espontáneas *gcd* suprimen el efecto de las mutaciones *gcn* y causan la desrepresión constitutiva de la traducción de *GCN4*, de modo que los dobles mutantes *gcn gcd* tienen constitutivamente desreprimido el CGBA y sí crecen en 3-AT (**3-AT^R**, fenotipo **Gcd⁻**). Lo mismo ocurre en el caso del 5-MT.

Se investigó si las mutaciones $\Delta rpl19a$ o $\Delta rpl19b$ desreprimen la traducción del ARNm *GCN4*, como hacen las mutaciones $\Delta rpl11$ (Foiani *et al.*, 1991) o $\Delta rpl33a$ y *rpl33-G76R* (Martin-Marcos *et al.*, 2007). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la delección de cada uno de los genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B* en la **cepa **Gcn⁻**** H96 (*gcn2-101 gcn3-101*) (Harashima and Hinnebusch, 1986) con objeto de valorar su efecto en la expresión del gen *HIS4::LacZ* como medida indirecta de la desrepresión o represión traduccional del ARNm *GCN4* en cada mutante (Véase más adelante). Para ello, se transformaron células de dicha cepa H96 (MAT α *gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52 [HIS4::LacZ ura3-52]*) con un **alelo nulo *rpl19a::KanMX4*** construido *in vitro* para reemplazar al alelo WT por doble recombinación homóloga; también se construyó un alelo nulo ***rpl19b::KanMX4*** (Figura 74A y 74B). Se seleccionaron transformantes resistentes a Geneticina (G-418) y se obtuvieron dos cepas isogénicas, **Hm624 *Arpl19a::KanMX4*** y **Hm585 *Arpl19b::KanMX4*** (Materiales y Métodos). En segundo lugar, se analizó el fenotipo de crecimiento de esas dos cepas en relación al de H96 (*RPL19A*, *RPL19B*) en placas que se incubaron a diferentes temperaturas, y se comprobó que

dichos mutantes de delección exhiben fenotipos de crecimiento lento (*slg*) similares a los de las cepas Y07156 ($\Delta rpl19a$) e Y03053 ($\Delta rpl19b$) (Figura 75 A).

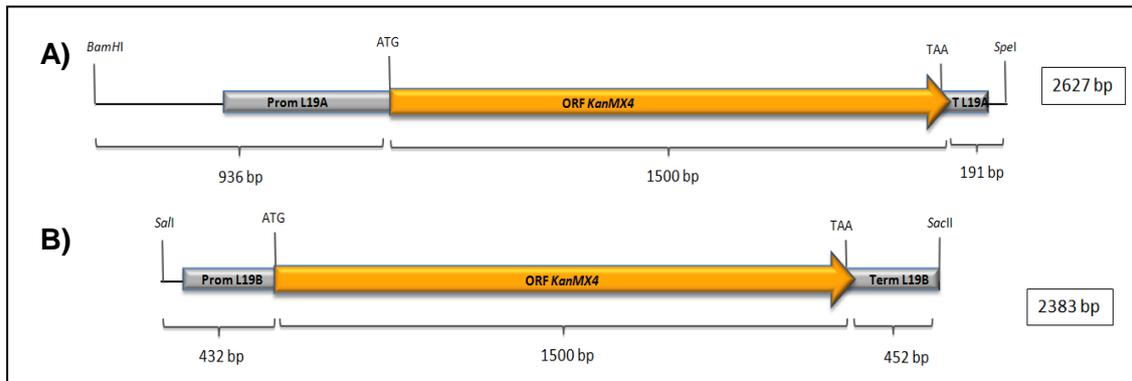


Figura 74. Construcción de alelos nulos de *RPL19A* y *RPL19B*.

También se hicieron delecciones independientes de *RPL19A* o de *RPL19B* en la cepa Hm498 (MATa *gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 leu2::HisG*). Se usaron los alelos nulos ya indicados, y se obtuvieron dos cepas isogénicas a Hm498, **Hm625 $\Delta rpl19a::KanMX4$** y **Hm583 $\Delta rpl19b::KanMX4$** (Materiales y Métodos), que exhiben fenotipo *slg*, mayor en el caso de Hm625 $\Delta rpl19a::KanMX4$ (Figura 75 B).

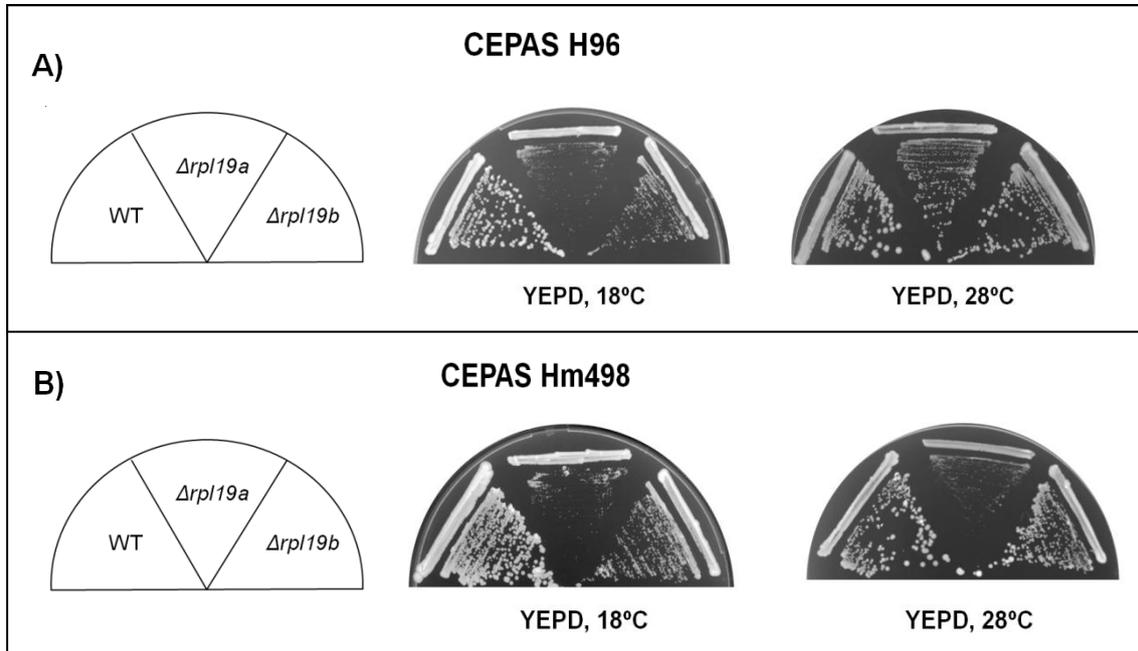


Figura 75. Fenotipo *slg* causado por las mutaciones $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ en mutantes *Gcn⁻*. A) En H96; B) En Hm498. Las placas de YEPD se incubaron durante 3 días a 28°C y 5 días a 18°C.

Para investigar si el fenotipo *slg* de las delecciones sencillas se debe únicamente a la delección de estos genes – comprobada por PCR – y no a alguna mutación espontánea adicional

de algún otro gen esencial, se transformaron las cepas mutantes con los plásmidos centroméricos **pAJ8** (*RPL19A*), **pAJ2** (*RPL19B*) o el vector vacío **pRS315** (*LEU2*). Se analizó el tamaño de las colonias de los distintos transformantes en placas de SD⁺, que se incubaron durante 2-3 días a 28°C. En todos los casos se observó que cada gen parálogo *RPL19A* y **RPL19B** complementaba totalmente el fenotipo *slg* causado por la delección respectiva de cada uno de ellos (dato no mostrado).

4.1. Análisis del carácter recesivo o dominante de las mutaciones *rpl19bΔCT*

En algunos casos se ha descrito que proteínas ribosómicas mutantes cuando están ensambladas en ribosomas maduros pueden causar fenotipos dominantes o semidominantes, al interferir o impedir las funciones en traducción – inicio, elongación o terminación – de los ribosomas silvestres (Martin-Marcos *et al.*, 2007). Se analizó, por ese motivo, si alguna de las mutaciones *rpl19bΔCT* causa fenotipo *slg* dominante, semidominante o recesivo cuando los alelos mutantes están clonados en plásmidos centroméricos y en las cepas están presentes también proteínas L19e WT. Para ello, se transformaron dos cepas Gcn⁻, **H96** (*gcn2-101 gcn3-101 RPL19A* y *RPL19B*) y **Hm 585** (*gcn2-101 gcn3-101 Δrpl19b RPL19A*), con los diferentes plásmidos centroméricos portadores de alelos mutantes [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*] que codifican proteínas truncadas **L19Δ22**, **L19Δ27**, **L19Δ32** y **L19Δ39** (Tabla I de los Anexos). Además, se transformaron las mismas cepas con el vector vacío pRS316 [*CEN6 URA3*], o con el plásmido que porta el gen WT pAJ1 [*RPL19B CEN6 URA3*]. Se analizó el tamaño de las colonias de los transformantes en placas de SD⁺ que se incubaron durante varios días a diferentes temperaturas (18°C, 28°C y 37°C) (Figura 76).

A 18°C, los transformantes con alelos mutantes *rpl19bΔCT* [*CEN6 URA3*] de la cepa “pseudo-haploide” Hm585 *Δrpl19b RPL19A* tienen **fenotipo *slg***, lo que sugiere que es “semidominante” o dominante en presencia del parálogo *RPL19A*. Una excepción es el caso de los transformantes con *rpl19bΔ32*, que exhiben un menor *slg* que el resto de mutantes (Figura 76 B). A 28°C, los transformantes de las dos cepas tienen un fenotipo *slg* menos severo que a 18°C, y el más exacerbado es el del mutante *rpl19bΔ27*. A 37°C, los transformantes de Hm585 con el alelo mutante *rpl19bΔ27* son los que exhiben un *slg* más marcado.

Transformantes con los mismos plásmidos [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*] de la cepa H96 – que es WT para los genes que codifican L19e (*gcn2-101 gcn3-101 RPL19A RPL19B*) – exhiben también fenotipo *slg* a 18°C, lo que indica claramente una dominancia de este carácter a esta temperatura (Figura 76 A). A 28°C, solamente se observa *slg* en transformantes de H96 con los genes mutantes *rpl19bΔ27* y *rpl19bΔ22*; Sin embargo, a 37°C, todos los transformantes con

genes mutantes crecen igual que aquellos que portan el plásmido con el gen *RPL19B* WT, por lo que el fenotipo *slg* es recesivo a esta temperatura.

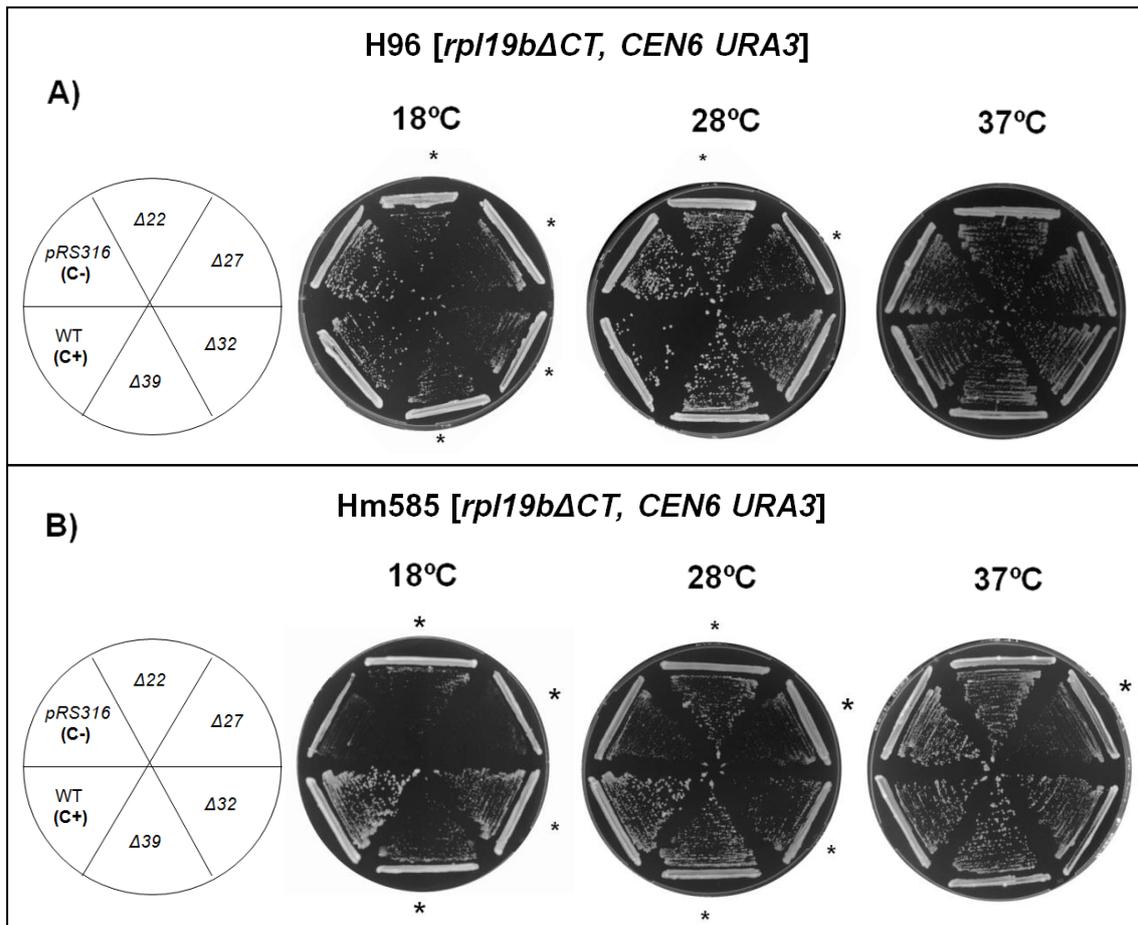


Figura 76. Fenotipo *slg* de mutantes *rpl19b*ΔCT. A) Alelos *rpl19b*ΔCT [CEN6 URA3] expresados en el fondo genético H96 (*RPL19A RPL19B*). B) Los mismos alelos expresados en el fondo genético Hm585 (*RPL19A rpl19b*ΔCT). Se muestran colonias crecidas en placas de SD⁺ incubadas a 18°C, 28°C y 37°C. En ambas figuras se indican con un asterisco las cepas mutantes con *slg* más acentuado.

4.2. Regulación traduccional del ARNm *GCN4* en mutantes *rpl19*

Para investigar cómo afectan las mutaciones *rpl19bΔCT* a la traducción específica del ARNm *GCN4*, se analizó si los mutantes descritos anteriormente tienen fenotipo Gcn^- o Gcd^- .

a) Análisis cualitativo del posible fenotipo Gcd^- de mutantes *rpl19*:

Se investigó si los diferentes alelos *rpl19* de los que disponemos confieren un fenotipo Gcd^- en cepas mutantes *gcn*, es decir, causan desrepresión constitutiva de la traducción del ARNm *GCN4*.

Para ello, se analizó el crecimiento en análogos de aminoácidos de cepas mutantes en dos genes *GCN* reguladores positivos de la traducción de *GCN4*, *gcn2-101*, *gcn3-101*, pero silvestres en los genes reguladores negativos *GCD*. A estas cepas *gcn GCD* se les eliminó además *RPL19B*, generando el triple mutante Hm585 (*gcn2-101 gcn3-101 Δrpl19b*). Esta cepa se transformó con plásmidos que portan los alelos mutantes *rpl19bΔCT* (*CEN6 URA3*), el gen WT *RPL19B* o el vector pRS316 para investigar un potencial fenotipo Gcd^- . Aún en la presencia del gen *RPL19A* en su estado WT en este fondo genético, al ser mutaciones semidominantes tanto a 28°C como a 18°C, en caso de que los mutantes confieran fenotipo Gcd^- , éste debería observarse, como se demostró en nuestro laboratorio con el mutante *rpl33a-G76R* (Martin-Marcos *et al.*, 2007).

Las cepas Gcd^- crecen en medios con análogos de aminoácidos igual que una cepa WT, pues tienen desreprimida la traducción de *GCN4* y el CGBA constitutivamente. Si las mutaciones de interés *rpl19* no confieren fenotipo Gcd^- en el fondo genético *gcn2-101 gcn3-101*, las cepas serán sensibles al 3-AT y 5-MT, ya que los mutantes Gcn^- no desreprimen el sistema *GCN4/CGBA* y mueren en ausencia de histidina (3-AT) o de triptófano (5-MT).

Se analizaron colonias aisladas de los transformantes obtenidos mediante réplica de placas maestras en SC a placas con 3-AT. Como controles de sensibilidad al 3-AT se usaron la cepa **H96** (*gcn2-101 gcn3-101 GCD*), de la que derivan los transformantes Hm585 (*gcn2-101 gcn3-101 Δrpl19b*), y la cepa **H117** (*gcn2-101 gcn3-101*) (Harashima and Hinnebusch, 1986), que es una cepa isogénica a la cepa Gcd^- **H275** (*gcn2-101 gcn3-101 gcd17-1/rpl33a-G76R*) que se utilizó como control de resistencia al 3-AT (Martin-Marcos *et al.*, 2007).

Como se observa en la **Figura 79**, los transformantes de la cepa Hm585 con plásmidos que portan los alelos mutantes *rpl19bΔCT* [*CEN6, URA3*] no crecen en las placas de 3-AT a ninguna de las concentraciones ensayadas (**3-AT^S**), lo que sugiere que **no** tienen fenotipo Gcd^- , al menos en presencia del gen parálogo WT *RPL19A*. Las cepas pseudo-haploinsuficientes para

L19e derivadas de H96, **Hm624** (*gcn2-101 gcn3-101Δrpl19a*) y **Hm585** (*gcn2-101 gcn3-101Δrpl19b*), tampoco exhiben fenotipo Gcd⁻ en placa (3-AT^S).

Para comprobar si la delección de *RPL19A* y/o *RPL19B* confiere fenotipo Gcd⁻, se transformaron las cepas de EUROSCARF BY4741 (WT), Y07156 (*Δrpl19a*) y Y03053 (*Δrpl19b*) con el alelo nulo [*gcn2::HIS3*] para generar la delección del gen *GCN2*, y se verificó la sustitución correcta del gen por PCR (Materiales y Métodos). Se obtuvieron así tres cepas *gcn::HIS3 GCD*, Hm696 (*Δgcn2::His3*), Hm697 (*Δrpl19a Δgcn2::His3*) y Hm698 (*Δrpl19b Δgcn2::His3*), en las que se complementa con el marcador *HIS3* del alelo de delección la auxotrofia de histidina debida a la mutación *his3ΔI*. Así, los posibles fenotipos Gcd⁻ de estas cepas se pueden analizar en placas de 3-AT además de 5-MT.

La cepa Hm697 (*Δrpl19a Δgcn2::His3*) sí crece en 3-AT (es **3-AT^R**), pero la isogénica Hm698 (*Δrpl19b Δgcn2::His3*) no lo hace (**3-AT^S**) (**Figura 80**). Se investigó entonces si estas deficiencias en el fenotipo se debían a las respectivas delecciones de cada gen parálogo *RPL19* o bien a alguna mutación *gcd* espontánea presente en la cepa *Δrpl19a* en otro gen *GCD*. Para ello, se transformó la cepa Hm697 (*Δrpl19a Δgcn2::His3*) con el plásmido vacío (pRS316) y con el plásmido pAJ9 (*RPL19A*). Los transformantes se ensayaron en placas de **3-AT** y se observó que la presencia de *RPL19A* no corrige la resistencia al 3-AT de Hm 697, por lo que su fenotipo Gcd⁻ se debería a otra mutación no identificada, pero no a la pseudo-haploinsuficiencia que causa *Δrpl19a* (**Figura 77**). Estos datos ilustran la importancia de manejar varios fondos genéticos de *S. cerevisiae* para estudiar y concluir el fenotipo de determinadas mutaciones de interés.

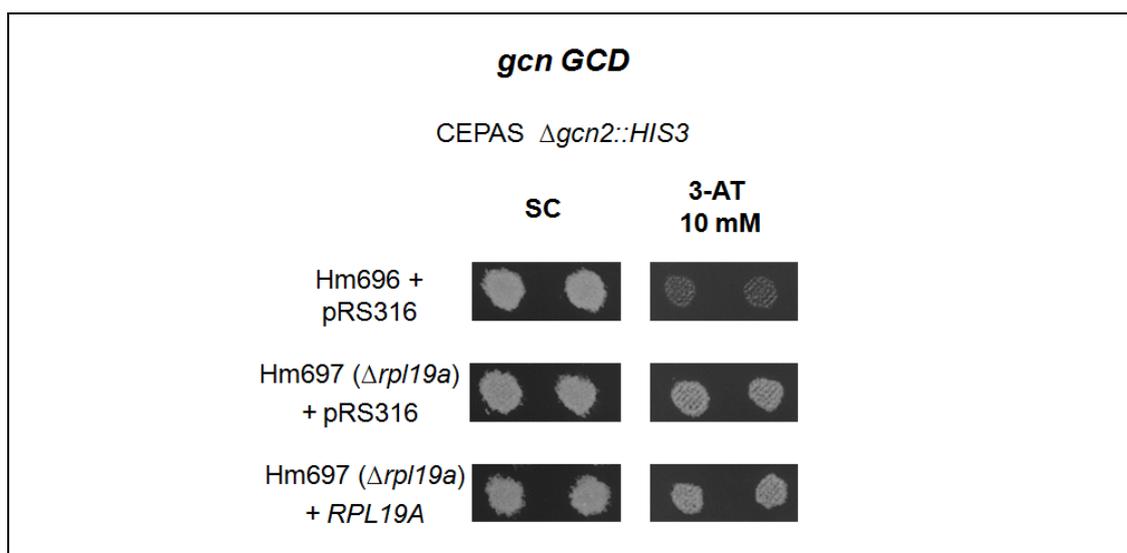


Figura 77. Análisis del fenotipo de sensibilidad a análogos de aminoácidos de las cepas Hm696 y Hm697. Se hicieron réplicas de placas maestras de clones transformantes cultivados en placas de SC a 28°C 2 días a placas de 3-AT 10 mM, que se incubaron durante 3 días a 28°C.

b) Análisis cualitativo del posible fenotipo Gcn⁻ de mutantes *rpl19*:

Para investigar si la expresión de *GCN4* está traduccionalmente reprimida en los mutantes *rpl19bΔCT* (fenotipo **Gcn⁻**), se analizó el crecimiento de las cuatro cepas mutantes $\Delta rpl19a$ $\Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT*, *CEN6 URA3*] – silvestres para los genes reguladores *GCN* – mediante ensayos de **goteo** directo en placas conteniendo el inhibidor **3-AT** a diferentes concentraciones (10 mM, 20 mM y 30 mM) (Materiales y Métodos). Todos los mutantes *rpl19bΔCT* crecen ligeramente peor en 3-AT que la cepa transformada con el gen WT *RPL19B*, siendo el mutante *rpl19bΔ22* el que peor crece (**Figura 78 A**). Estos datos sugieren que las cepas mutantes no pueden desreprimir eficazmente el CGBA (control general de la biosíntesis de aminoácidos), o lo que es lo mismo, la traducción del ARNm *GCN4* en ausencia de histidina impuesta por el 3-AT, por lo que podrían tener fenotipo **Gcn⁻**. Para corroborarlo, se hicieron ensayos cuantitativos (**Figura 81**).

Del mismo modo, se analizó el crecimiento de los mutantes pseudo-haploinsuficientes Y07156 ($\Delta rpl19a$) e Y03053 ($\Delta rpl19b$) en presencia del análogo del triptófano 5-metil-triptófano (**5-MT**), ya que estas cepas derivan de BY4741 (WT) y son auxótrofas de histidina (*his3Δ1*). Los ensayos de **réplica** en placas y de **goteo** se muestran, respectivamente, en las **Figuras 82 y 78 B**. La cepa Y03053 ($\Delta rpl19b$) crece de manera similar en **5-MT** y en SC, y la cepa Y07156 ($\Delta rpl19a$) crece mejor en 5-MT, lo que sugiere que no presentan fenotipo **Gcn⁻** (**Figura 78 B**). Además, se transformaron las cepas con el plásmido **p437** [*CEN6 URA3 HIS3*] para suplementar la auxotrofia de histidina, y se analizaron las colonias aisladas también mediante réplicas en placas de 3-AT 10 mM, observándose el mismo resultado que en 5-MT (**Figura 82**).

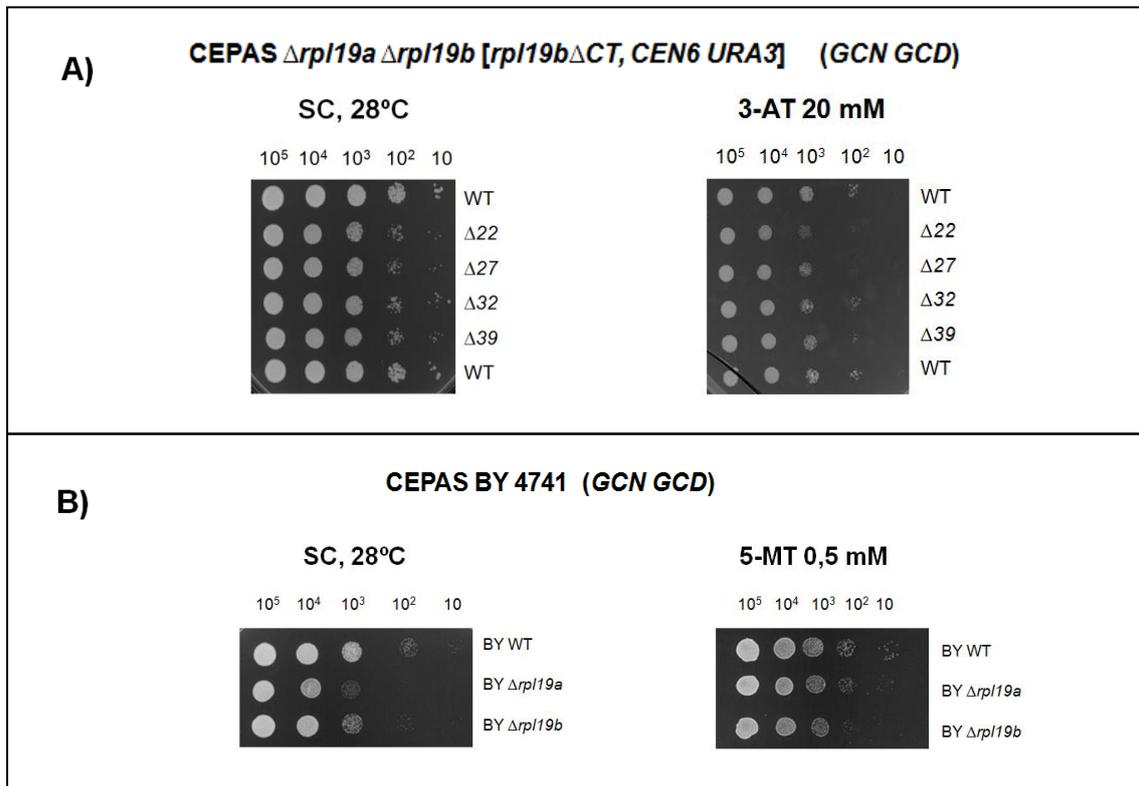


Figura 78. Análisis del fenotipo de sensibilidad a análogos de aminoácidos de mutantes $rpl19b\Delta CT$, $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$. Las células de los mutantes se cultivaron en todos los casos en SC a 28°C hasta fase exponencial y se hicieron diluciones seriadas. **A)** Crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [$rpl19b\Delta CT$, $CEN6 URA3$] en 3-AT (20 mM). **B)** Crecimiento de mutantes $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$ en 5-MT (0,5 mM). Las placas de 3-AT y de 5-MT se incubaron a 28°C durante 3 y 5 días, respectivamente.

c) Análisis cuantitativo de la represión o desrepresión traduccional de $GCN4$ en mutantes $rpl19$:

Se investigó en qué medida las mutaciones $rpl19$ afectan al proceso de traducción del ARNm $GCN4$.

• **Análisis cuantitativo del posible fenotipo Gcd⁻ de mutantes $rpl19$:**

Se analizó la traducción del ARNm $GCN4$ en triples mutantes $rpl19b gcn2-101 gcn3-101$ (silvestres para los genes GCD) con el fin de determinar si en estas cepas, constitutivamente reprimidas para el CGBA, las mutaciones que alteran la proteína ribosómica L19e o las que reducen su dosis podrían causar algo de desrepresión traduccional de $GCN4$. Como ya se ha mencionado, la existencia de subunidades 60S mutantes o una reducción de las mismas, pueden provocar una desrepresión más o menos leve del sistema, que sería observable solamente cuando está totalmente reprimido (mutaciones gcn presentes) (Foiani *et al.*, 1991).

Para ello, se valoró la actividad β -galactosidásica, en este caso, procedente del transcrito de fusión *His4::LacZ* que está integrado en el locus *URA3* en H96 y en todas las cepas que derivan de ella (véase genotipo de H96 en la **Tabla I de los Anexos**). Se trata de una medida indirecta y proporcional de la traducción del ARNm *GCN4*, pues el factor GCN4 activa la transcripción de *His4::LacZ* y la ruta de la histidina no está sometida a regulación por producto final o *feed back* (Lucchini *et al.*, 1984).

Ninguno de los mutantes *rpl19b* Δ *CT* desreprime la traducción de *GCN4* a los niveles del mutante Gcd⁻ H275 (*gcn gcd*), por lo **no** presentan fenotipo **Gcd⁻** (**Figura 79**).

Se observa también que, en el caso del mutante Hm698 Δ *gcn2* Δ *rpl19b*, se obtienen unos valores similares a los de la cepa WT Hm696 Δ *gcn2* (**Figura 80**), por lo que tampoco son Gcd⁻, a diferencia de lo que ocurre con la cepa Hm697 Δ *gcn2* Δ *rpl19a*, que tiene fenotipo Gcd⁻ debido a alguna mutación no identificada, como acabamos de describir (**Figura 77**).

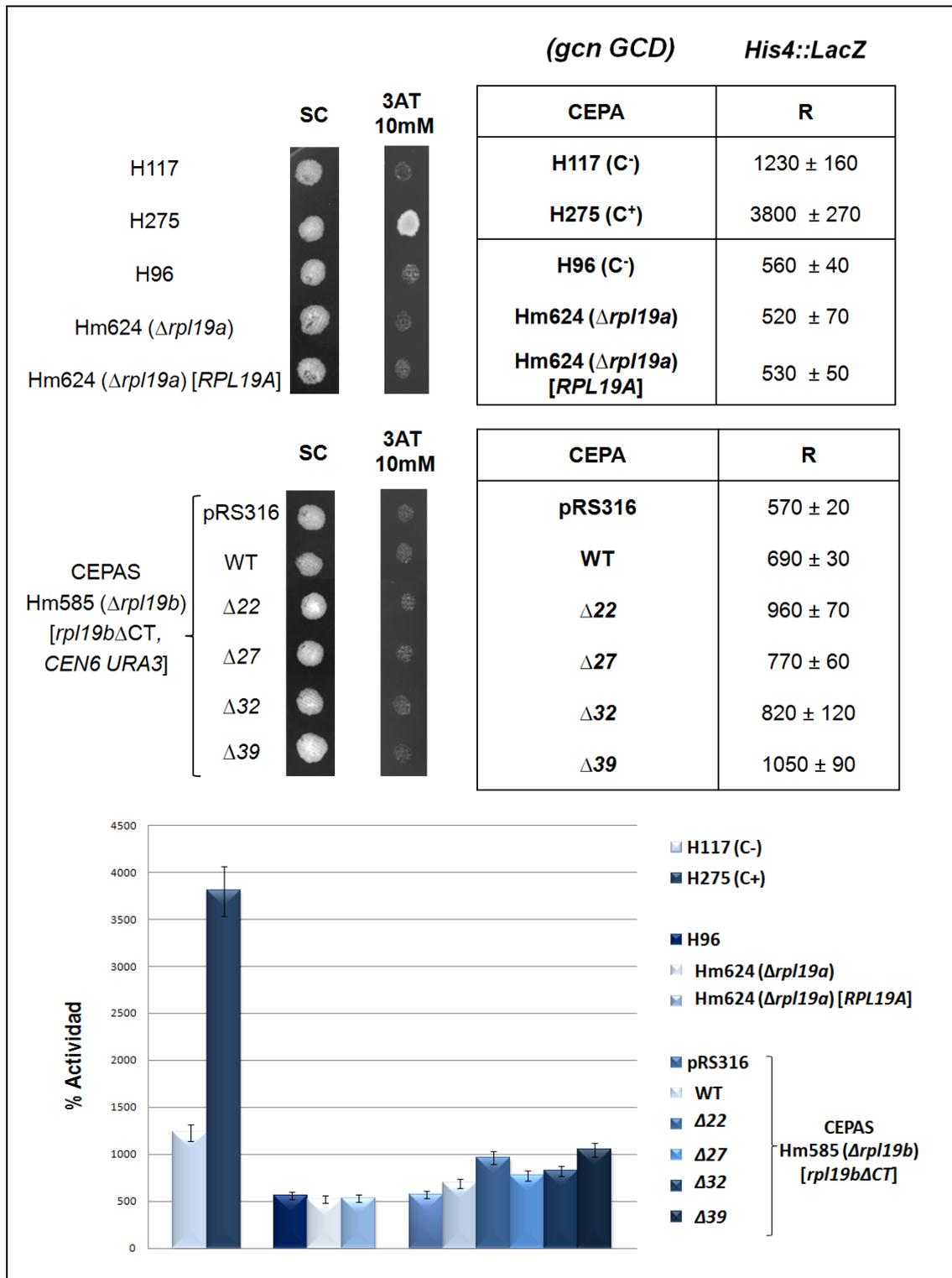


Figura 79. Traducción de transcritos de fusión *His4::LacZ* en cepas *gcn GCD* H96, Hm624 y Hm585 $\Delta rpl19b$ [*rpl19b* Δ CT, *CEN6 URA3*]. Las células se cultivaron en medio sólido (parte superior de la figura) o en medio líquido SC (R) (parte inferior). Las unidades de actividad β -galactosidásica se expresan en nanomoles de *o*-nitrofenol liberados de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido por minuto y por miligramo de proteína. Se muestran las medias de 3 replicados biológicos y los errores estándar de la media se recogen en la tabla y se representan en el gráfico inferior.

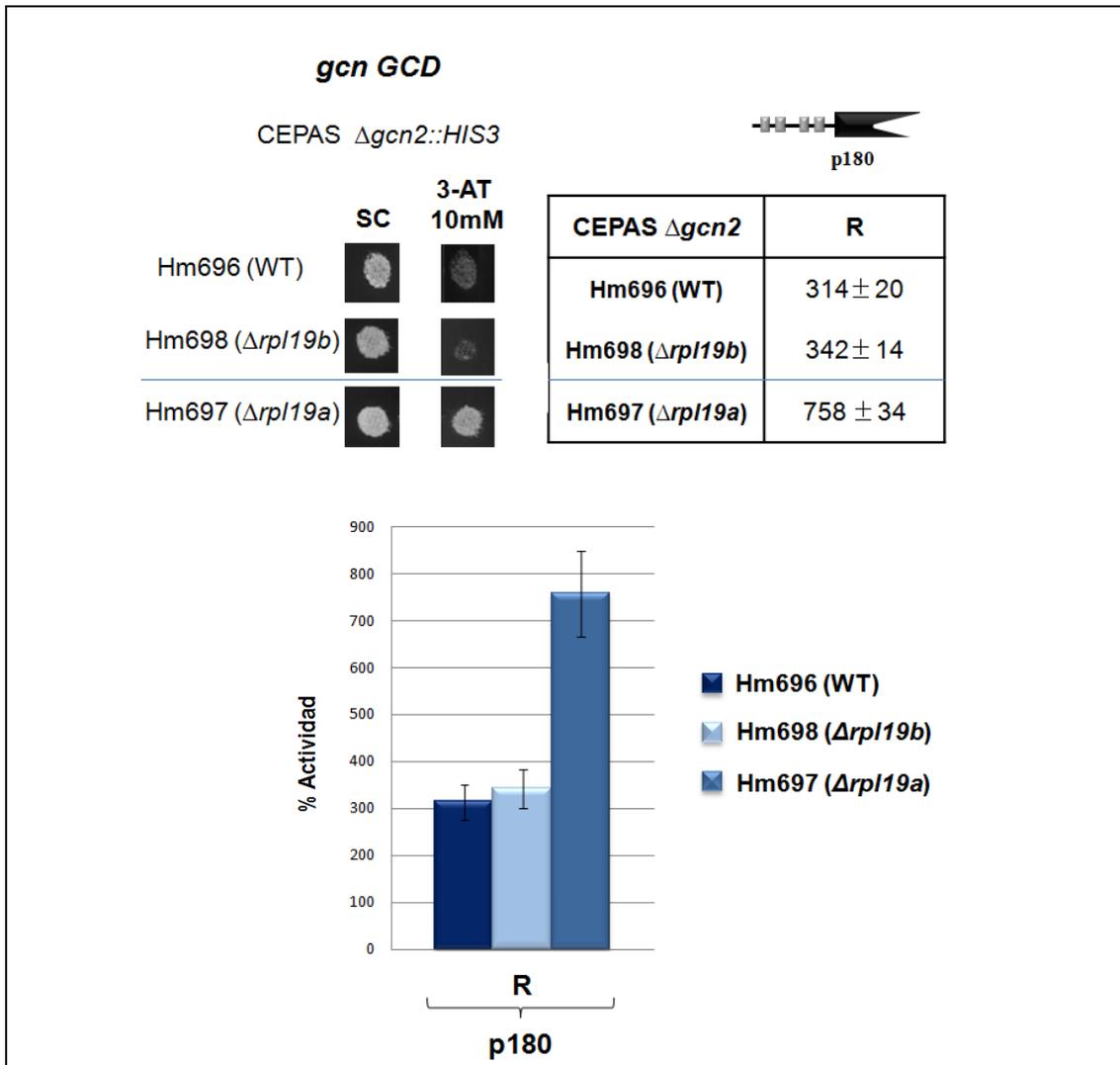


Figura 80. Traducción de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* con diferentes uORFs en la secuencia líder en cepas Hm696 $\Delta gcn2$ WT y Hm698 $\Delta gcn2 \Delta rpl19b$. Se valoró la actividad β -galactosidásica sintetizada en dichas cepas transformadas con el plásmido p180. En la figura de este plásmido, los rectángulos representan uORFs del ARNm de *GCN4*. Las células se cultivaron en medio sólido (en la parte superior de la figura) o en medio líquido SC (R). Las medidas de la actividad β -galactosidásica se realizaron como se indica en la Figura 79.

- **Análisis cuantitativo del posible fenotipo Gcn⁻ de mutantes *rpl19*:**

Se investigó si las mutaciones *rpl19* causan represión traduccional de *GCN4*. Para ello, se emplearon los cuatro mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bACT*, *CEN6 URA3*]. Estas cepas tienen alelos silvestres de los genes reguladores positivos (*GCN*) y negativos (*GCD*), por lo que en situaciones de carencia de aminoácidos desreprimirían la traducción del ARNm de *GCN4* y el CGBA, excepto si los alelos mutantes indicados les confieren un fenotipo Gcn⁻.

Se cuantificó la **actividad β -galactosidásica** procedente de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* clonados en plásmidos centroméricos. Los plásmidos empleados portan alelos de *GCN4* que codifican mensajeros con diferentes secuencias líder: **p180**, *GCN4::LacZ* WT con las 4 uORFs que regulan la expresión de *GCN4*; **p227**, *GCN4::LacZ* sin ninguna uORFs (equivale a fenotipo Gcd^+), con el que se obtendrán niveles de expresión de *GCN4* sin que exista regulación por ninguna de las uORFs; **p226**, *GCN4::LacZ* con la uORF 4, que tiene efectos negativos sobre la expresión de *GCN4* (equivale a fenotipo Gcn^-), por lo que a penas llegan ribosomas hasta la ORF de *GCN4* y su expresión se encuentra disminuída; y **pM226**, *GCN4::LacZ* con una uORF 1 que tiene mutado el codón de terminación por la inserción de un residuo de T entre las dos A, de TAA a TATA, por lo que la uORF 1 se alarga y se solapa con la ORF de *GCN4* 130 nt. Se valoró la actividad β -galactosidásica de varios transformantes de cada cepa con los diferentes plásmidos, y se obtuvo la media y el error estándar. Las cepas se cultivaron a 28°C en condiciones de represión (**R**) en medio SC; y de desrepresión (**DR**), en medio SC hasta una $DO_{600nm} \sim 0,4$, y tras transferirlas **6 horas a 3-AT 10 mM**.

En los mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19b Δ CT*, *CEN6 URA3*], en condiciones de represión (**R**), la expresión de los transcritos *GCN4::LacZ* en los plásmidos **p180**, **p227** y **p226** es similar en los mutantes y en la cepa WT. Sin embargo, en condiciones de desrepresión en 3-AT 10 mM (**DR**) con el plásmido **p180**, la expresión de *GCN4::LacZ* es significativamente más baja en las cepas mutantes que en la cepa WT (*RPL19B Δ i*). Estos resultados corroboran los resultados del análisis de resistencia a análogos en placas, ya que todos los mutantes *rpl19b Δ CT* tienen **fenotipo Gcn^-** , más acusado en el caso del mutante *rpl19b Δ 22* (**Figura 81**).

Una reducción en la actividad o de la cantidad de subunidades ribosómicas 60S en los mutantes permitiría que algunos PICs 43S no se uniesen a 60S en el AUG del uORF1 y continuasen el rastreo en dirección 3' del ARNm (*leaky scan* del uORF1), llegando a traducir la uORF4, por lo que la mayoría de ribosomas se disociarían del ARNm, no alcanzando la ORF de *GCN4*. Este hecho podría explicar el fenotipo Gcn^- observado. Por ello, se analizó la construcción **pM226** que porta el transcrito *GCN4::LacZ* con un uORF1 extendida donde, si los ribosomas no traducen el AUG de la uORF1, aumentarían las posibilidades de que se formasen los monosomas (60/40S) y se iniciase la traducción en el AUG de *GCN4*, aumentando su expresión. Al analizar la actividad β -galactosidásica en estos transformantes, se observa un pequeño aumento en los mutantes *rpl19b Δ CT* respecto a la cepa WT, lo que sugiere que en los mutantes se está produciendo *leaky scan* del uORF1 (**Figura 81**).

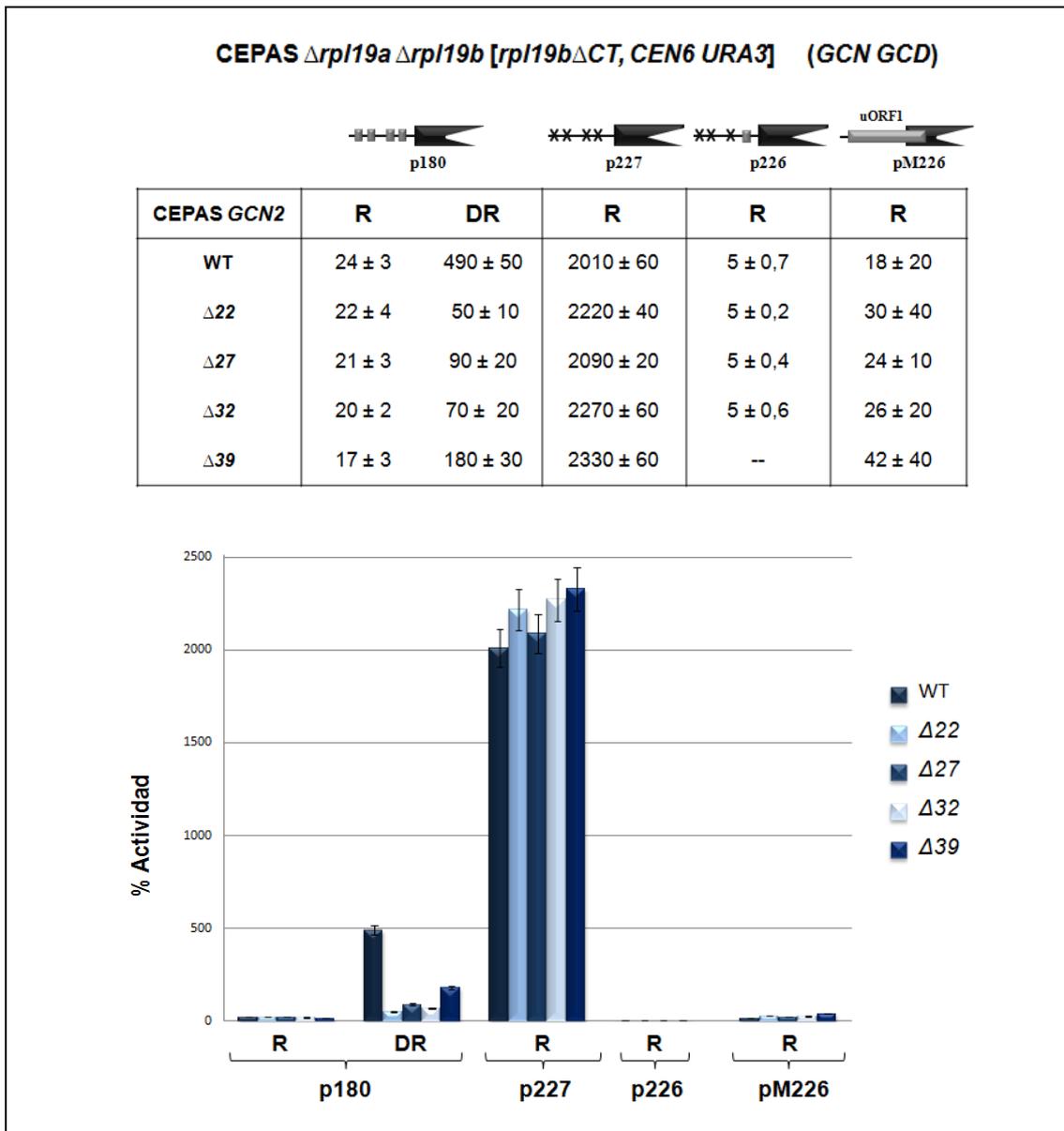


Figura 81. Traducción de transcritos de fusión $GCN4::LacZ$ con diferentes uORFs en la secuencia líder en mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [rpl19b\Delta CT, CEN6 URA3]$. Se valoró la actividad β -galactosidásica sintetizada en dichas cepas transformadas con los plásmidos p180, p227, p226 y pM226. En la figura de estos plásmidos, los rectángulos representan uORFs y las “X” indican mutaciones que eliminan los codones de iniciación de las mismas. Las células se cultivaron en medio sólido (en la parte superior de la figura) o en medio líquido SC (R**) o en el mismo medio conteniendo 3-AT (**DR**). Las medidas de la actividad β -galactosidásica se realizaron como se indica en la Figura 79.**

En el caso de los mutantes pseudo-haploinsuficientes, la expresión del transcrito de fusión *GCN4::LacZ* en los mutantes Y07156 ($\Delta rpl19a$) e Y03053 ($\Delta rpl19b$) en relación a la cepa BY4741 (WT) es similar, tanto en condiciones de represión (R) como de desrepresión (DR), indicando que **no tienen fenotipo Gcn⁻** (Figura 82).

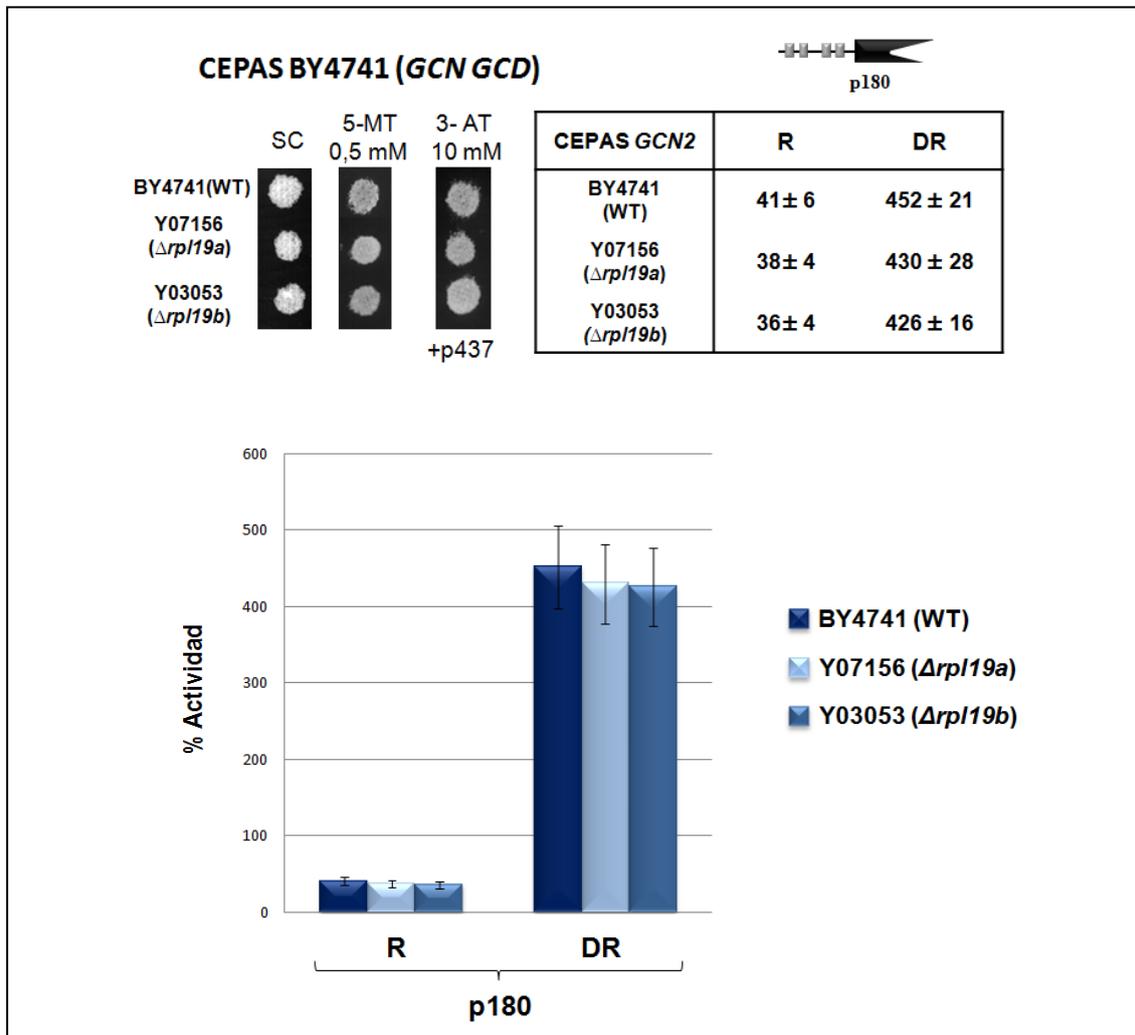


Figura 82. Traducción de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* con diferentes uORFs en cepas isogénicas WT, $\Delta rpl19a$ y $\Delta rpl19b$. La actividad β -galactosidásica se valoró en transformantes de las cepas BY4741 (WT), Y07156 ($\Delta rpl19a$) y Y03053 ($\Delta rpl19b$) con el plásmido p180. En la figura del plásmido se representan con rectángulos las uORFs del ARNm de *GCN4*. Las células se cultivaron en medio sólido (parte superior) o líquido, SC (**R**) o en el mismo medio conteniendo 5-MT (**DR**). Las medidas de la actividad β -galactosidásica se realizaron como se indica en la Figura 79.

4.3. Regulación traduccional del ARNm *GCN4* cuando se sobreexpresa L19e

Se ha descrito que, en células humanas de cáncer de mama de la línea celular MCF7, L19e se encuentra sobreexpresada como consecuencia del estrés en el retículo endoplasmático, e induce la fosforilación del factor de iniciación eIF2 α , por lo que disminuye la cantidad de CT, y por ello, aumentaría la expresión de *ATF4* (factor de transcripción equivalente a *GCN4* en humanos). Para investigar si ocurre este mismo efecto en células de levadura, se sobreexpresó L19B en la cepa de *S. cerevisiae* **Hm498** (MATa *gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 leu2::HisG*). Para ello, se transformó dicha cepa con el plásmido **pAJ46** (*pS28::FLAG::RPL19B Δ i*, 2 μ M *LEU2*), y con los plásmidos pRS315, pAJ4 (*RPL19B Δ i*, *CEN6 LEU2*) y pAJ56 (*pS28::FLAG::RPL19B Δ i*, *CEN4 LEU2*) como controles negativos. Se analizaron colonias aisladas de los transformantes obtenidos mediante réplica de placas *máster* de SC a placas con los análogos de aminoácidos 3-AT y 5-MT. Como controles de sensibilidad se usó la cepa **H96** (*gcn2-101 gcn3-101*) (Harashima and Hinnebusch, 1986) y como control de resistencia se utilizó la cepa Gcd⁻ **H275** (*gcn2-101 gcn3-101 gcd17-1/rpl33a-G76R*) (Martin-Marcos *et al.*, 2007).

Como se observa en la **Figura 83**, ninguno de los transformantes de la cepa Hm498 es capaz de crecer en las placas de 3-AT ni de 5-MT (**3-AT^S o 5-MT^S**), lo que sugiere que en *S. cerevisiae* la sobreexpresión de L19e **no** produce fenotipo Gcd⁻.

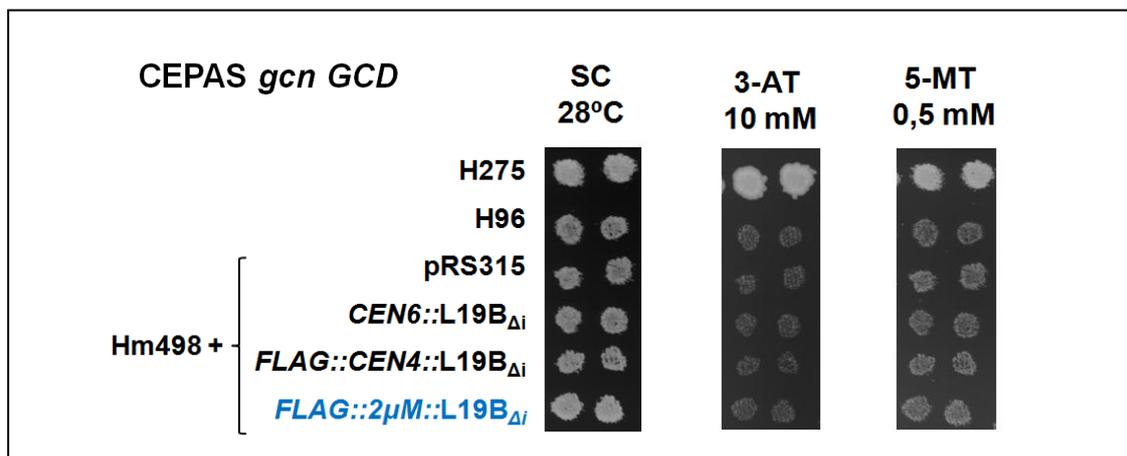


Figura 83. Análisis del fenotipo de sensibilidad a análogos de aminoácidos de mutantes Hm498 *CEN6::RPL19B Δ i*, *CEN4::RPL19B Δ i* y *2 μ M::RPL19B Δ i*. Se hicieron réplicas de placas maestras de clones transformantes cultivados en placas de SC a 28°C 2 días a placas de 3-AT 10 mM y 5-MT 0,5 mM, que se incubaron durante 3 y 5 días, respectivamente, a 28°C.

DISCUSIÓN



1. FUNCIÓN DE L19e EN EL RIBOSOMA EUCARIÓTICO

1.1. Estado del conocimiento

En este trabajo se han investigado las funciones primarias de la proteína ribosómica esencial L19e en la biogénesis de las subunidades ribosómicas y en la traducción por el ribosoma maduro. El interés científico del grupo en el que se ha realizado se centra en desvelar algunos de los factores proteicos y de los mecanismos moleculares que regulan la iniciación de la traducción en eucariotas, usando como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las razones que determinaron el inicio de este trabajo de investigación fueron:

(i) No existía ningún dato en la literatura científica sobre las funciones de L19e, una proteína ribosómica que aparece en el ribosoma de arqueobacterias, adquiere una extensión C-terminal de diferente tamaño en los diversos organismos eucariotas y facilita el contacto entre las subunidades ribosómicas en ambos grupos de organismos. (ii) Ni los ribosomas de eucariotas ni sus subunidades se habían cristalizado todavía con calidad suficiente para obtener sus estructuras con alta resolución atómica mediante difracción de rayos X, lo que constituía el objetivo de prestigiosos laboratorios tras la resolución de la estructura del ribosoma bacteriano a ~3,0 Å (Ban *et al.*, 2000; Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Sin embargo, ya se habían publicado algunos trabajos en los que, usando técnicas de rayos X, criomicroscopía electrónica (*cryo-EM*) y modelado sobre la estructura del ribosoma bacteriano, se predecía la posición de L19e en el ribosoma eucariota; además, los datos obtenidos permitían predecir algunas de las interacciones moleculares en las que participa, así como especular acerca de una posible función reguladora de L19e en traducción (Klein *et al.*, 2004; Chandramouli *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009; Ben-Shem *et al.*, 2010). La estructura del ribosoma 80S proporcionaría el marco molecular imprescindible para comenzar a entender el significado funcional de sus nuevos elementos estructurales, ausentes del ribosoma bacteriano y/o del de arqueobacterias, las nuevas que establecen entre ellos y con factores de traducción y el papel que desempeña el ribosoma 80S en la regulación de la traducción. (iii) Existían numerosas evidencias sobre la composición heterogénea y la existencia en las células eucariotas de diferentes poblaciones de ribosomas (Mauro and Edelman, 2002; Mauro and Edelman, 2007; Gilbert, 2011; Xue and Barna, 2012; Bauer *et al.*, 2013). Resultados de un estudio sistemático en *S. cerevisiae* sugerían que podría existir un “Código Ribosómico” para la traducción específica, o preferente, de determinados ARNm y/o en diferentes situaciones fisiológicas o de estrés (Komili *et al.*, 2007). (iv) Acababan de publicarse algunos datos relevantes sobre la sobreexpresión de L19e en algunos tumores humanos concretos, y L19e se perfilaba como una

proteína de interés para su diagnóstico y pronóstico (Dressman *et al.*, 2003; Bee *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Bee *et al.*, 2011; Gazda *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2014). (v) La levadura *S. cerevisiae*, constituía el mejor de los organismos modelo para abordar el estudio genético-molecular de las funciones primarias de L19e y el grupo disponía de conocimientos científicos y metodológicos para caracterizar defectos traduccionales y analizar la regulación traduccional de *GCN4* en *S. cerevisiae* (García-Barrio *et al.*, 1995; Cuesta *et al.*, 1998; Calvo *et al.*, 1999; Martín-Marcos *et al.*, 2007; Iglesias-Gato *et al.*, 2011; Martín-Marcos *et al.*, 2011).

Por todo lo expuesto, nos decidimos realizar un análisis genético-molecular en *S. cerevisiae* que nos permitiese correlacionar los rasgos fenotípicos de mutantes de pérdida parcial de función de L19e con las alteraciones que provocan las mutaciones correspondientes en la secuencia o en la estructura de la proteína, así como con las interacciones que podrían modificar o romper en la subunidad 60S y en el ribosoma 80S (ARNr o proteínas ribosómicas). Se disponía de datos de *cryo-EM* y de las estructuras de baja resolución de subunidades y ribosomas 80S (Spahn *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2004; Chandramouli *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009). Finalmente, las estructuras de alta resolución atómica del ribosoma de *S. cerevisiae* y de otros organismos, se publicaron durante el desarrollo de esta investigación (Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011; Rabl *et al.*, 2011; Anger *et al.*, 2013; Lomakin and Steitz, 2013; Weisser *et al.*, 2013; Voorhees *et al.*, 2014).

1.2. Interpretación de las consecuencias de las mutaciones *rpl19*

Se ha postulado que algunas extensiones N- o C- terminales añadidas durante la evolución a algunas RP pre-existentes en ribosomas 70S de bacterias y/o arqueobacterias podrían contribuir al ensamblaje de otras RP y/o la regulación de la traducción en eucariotas (Melnikov *et al.*, 2012; Gamalinda and Woolford, 2014). Resultados recientes revelan que un nuevo dominio N-terminal en S5 de 55 aminoácidos se requiere para el inicio de la traducción y para la viabilidad celular en *S. cerevisiae* (Ghosh *et al.*, 2014). La nueva extensión C-terminal de S14 es necesaria para el procesamiento del pre-ARNr 20S que da lugar al ARNr 18S maduro (Jakovljevic *et al.*, 2004). Además, también se ha descrito que nuevos elementos estructurales de L4 contribuyen diferencialmente al procesamiento del pre-ARNm y al crecimiento celular. Así, mientras que una reducción de dosis de L4 afecta a pasos tempranos del procesamiento del pre-ARNr, la eliminación de un bucle interno de ~70 aminoácidos, de los que ~10 son nuevos en eucariotas, afecta a los pasos finales del procesamiento, ya que se acumulan los precursores 27SB, 7S y 6S, afectando al ensamblaje en las últimas etapas y quizá a la funcionalidad de las subunidades ribosómicas maduras. Por el contrario, la eliminación de la extensión C-terminal de

~100 aminoácidos de L4 no afecta al procesamiento de los ARNr (Gamalinda and Woolford, 2014).

Los mutantes *rpl19b* Δ CT fueron seleccionados y caracterizados en este trabajo por ser los que exhiben un fenotipo *slg* más exacerbado entre todos los mutantes *rpl19b* obtenidos (**Figura 35**). Por lo tanto, serían los que tienen una mayor pérdida de función de una proteína esencial. Los ARNm *rpl19b* Δ CT tienen codones de terminación de la traducción prematuros (PTCs) y codifican proteínas L19B truncadas en su dominio C-terminal (**Figura 44**), constituida por una α -hélice de 64 aminoácidos que es exclusivamente eucariota (**L19B Δ 22**, **L19B Δ 27**, **L19B Δ 32**, **L19B Δ 39**) (**Figura 84**). La longitud del dominio α -helicoidal varía entre los diferentes organismos eucariotas y parece ser específica de especie (**Figura 11**). Destaca especialmente en plantas, como *A. thaliana*, que tiene 20 aminoácidos más que en *S. cerevisiae*, o en *D. melanogaster*, con 14 aminoácidos más, pero se desconoce su funcionalidad en la traducción en todos los organismos. Sin embargo, L19e ya está ensamblada en la subunidad 60S con su extremo N-terminal orientado hacia la zona del túnel de salida del polipéptido (una región de estructura conservada en el ribosoma a lo largo de la evolución, probablemente por su funcionalidad), y con el dominio C-terminal hacia la zona de contacto entre subunidades, tanto en la estructura de 60S de *T. thermophila* como en la de *S. cerevisiae* (Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011). Por lo tanto, no parece probable (i) que la conformación de esta parte de L19e varíe entre la subunidad 60S aislada y formando parte del ribosoma maduro, ni (ii) que las mutaciones *rpl19b* Δ CT alteren la conformación natural de la subunidad 60S, sino más bien que afecten a su interacción o unión a los PIC 43S en todo caso. Las predicciones realizadas usando las coordenadas de la estructura del ribosoma de *S. cerevisiae* propuesta por Ben-Shem *et al.*, en 2011 (con la ayuda de un experto en cristalografía de complejos macromoleculares) permiten proponer que la eliminación progresiva hacia el extremo N-terminal de la α -hélice de L19e alteraría sus interacciones con residuos de la hélice E del segmento de expansión eES6 del ARNr 18S. Además, se alteraría la orientación del eES6 en la subunidad 40S, ya que dependería de la red de interacciones que establecen con su hélice E las argininas R162, R163, R167, R170, R172, R173 y R176 en el extremo C-terminal de L19e. A pesar de que la proteína mutante **L19 Δ 27** no es la que tiene truncada la mayor parte de la α -hélice C-terminal (que es L19 Δ 39), los mutantes *rpl19b* Δ 27 son, entre todos los de delección parcial seleccionados, los que presentan un fenotipo *slg* más acusado (**Figura 30**). Una posibilidad sería que la proteína L19 Δ 27 se pliegue incorrectamente y no de forma igual que el resto de las truncadas, pues la eliminación de los últimos 27 aminoácidos, igual que en el caso de L19 Δ 32 y L19 Δ 39, causa la pérdida de 3 argininas (R162, R163 y R167) implicadas en la formación del puente eucariótico eB12 (AEARRLKNRA). Sin embargo, en el caso de L19 Δ 27 quedan expuestos en el extremo C-terminal 2 residuos de ácido glutámico (E157 y E158) con cargas negativas (**Figura 32**). Un

extremo de estas características provocaría una repulsión electrostática con cargas negativas del ARNr 18S, creando cambios en la conformación estructural del ribosoma 80S y, quizá, provocando impedimentos estéricos para la unión de 60S con 40S. En el resto de proteínas mutantes L19e Δ CT, estas cargas negativas bien se habrían eliminado (en L19 Δ 32 o L19 Δ 39), o bien se contrarrestarían con las argininas del extremo C-terminal aún presentes en la proteína (en L19 Δ 22).

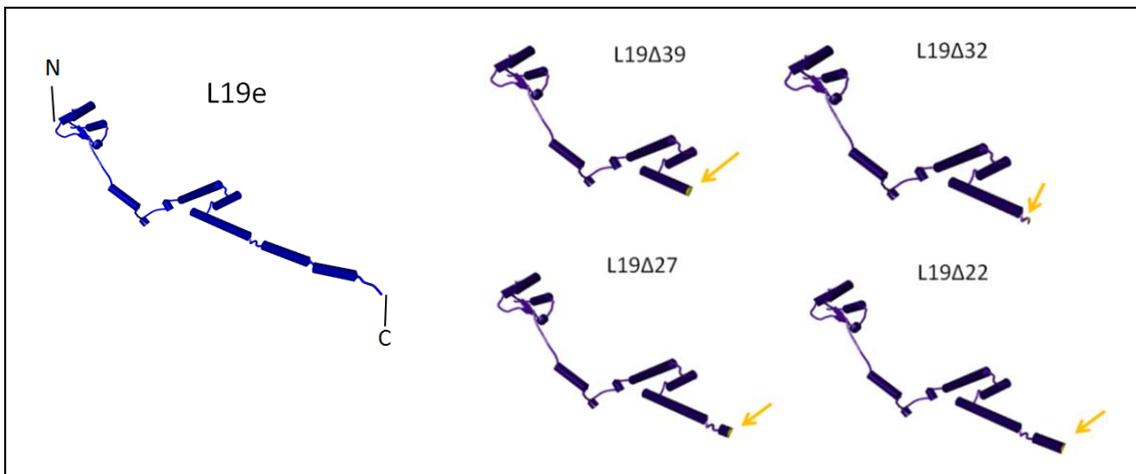


Figura 84. Representación esquemática de la estructura tridimensional de las proteínas L19e silvestre y las truncadas en su extremo C-terminal (predicciones realizadas con el Programa *Discovery Studio*).

Por otra parte, la inestabilidad de los ARNm codificados por algunos alelos mutantes de expresión condicional cuando se sobreexpresan en medio YEPG (*pGAL::rpl19b Δ CT*) como se muestran en la **Figura 43** podrían contribuir al fenotipo de crecimiento lento de los mismos. Así, se ha descrito que la presencia de **codones de terminación tempranos** en los ARNm de *S. cerevisiae* determina que sean reconocidos y eliminados por la ruta denominada **NMD** (*nonsense-mediated RNAm decay*) (Peltz *et al.*, 1994). Se trata de un mecanismo de vigilancia muy conservado evolutivamente en eucariotas en el que intervienen 3 factores UPF (*upstream frameshift*) denominados en *S. cerevisiae* UPF1, con actividad ATPasa y Helicasa (Czaplinski *et al.*, 1995), UPF2 y UPF3, que actúan como plataforma para UFP1 (Chamieh *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2008; Chakrabarti *et al.*, 2011). El NMD degrada los ARNm con PTCs para evitar que se generen proteínas truncadas perjudiciales para la célula (Baker and Parker, 2004; Behm-Ansmant *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Nicholson and Muhlemann, 2010). Se ha propuesto un modelo que postula que UPF1 interactúa directamente con el extremo 3'-UTR, favoreciéndose el anclaje al mismo al ser más largo que cuando existe un codón de terminación canónico (Hogg and Goff, 2010), promoviendo la degradación de los ARNm (**Figura 85 A**). Esta degradación será llevada a cabo, al igual que cuando existe una secuencia canónica, por la

exonucleasa XRN1 en dirección 5'→3' (Hsu and Stevens, 1993), y por el exosoma y el complejo SKI en dirección 3'→5' (Anderson and Parker, 1998) (**Figura 85 B**); Sin embargo, el NMD acelera la degradación en ambas direcciones (Muhlrad and Parker, 1994; Mitchell and Tollervey, 2003). Por otra parte, al existir un extremo 3'-UTR más largo, la distancia desde el codón de parada hasta la cola de poli (A) es mayor, por lo que además se interrumpe la interacción entre PAB1 y eRF3 (Shoemaker and Green, 2012). El factor eRF3 reconoce los codones de parada canónicos junto a eRF1, y cuando existen PTCs, interactúa con UPF1 (Czaplinski *et al.*, 1998). Cuando los ARNm son normales, PAB1 compete con UPF1 por la interacción con eRF3 (Singh *et al.*, 2008; Kervestin *et al.*, 2012; Muhlemann and Jensen, 2012), y junto a eIF4G en el ARNm circular, PAB1 inhibe al NMD (Fatscher *et al.*, 2014; Joncourt *et al.*, 2014). Además, PAB1 participa en la estabilización de los transcritos (Jacobson and Peltz, 1996), por lo que los ARNm portadores de PTCs serían más inestables al establecerse una unión menos eficaz entre PAB1 y eRF3 (**Figura 85 A**).

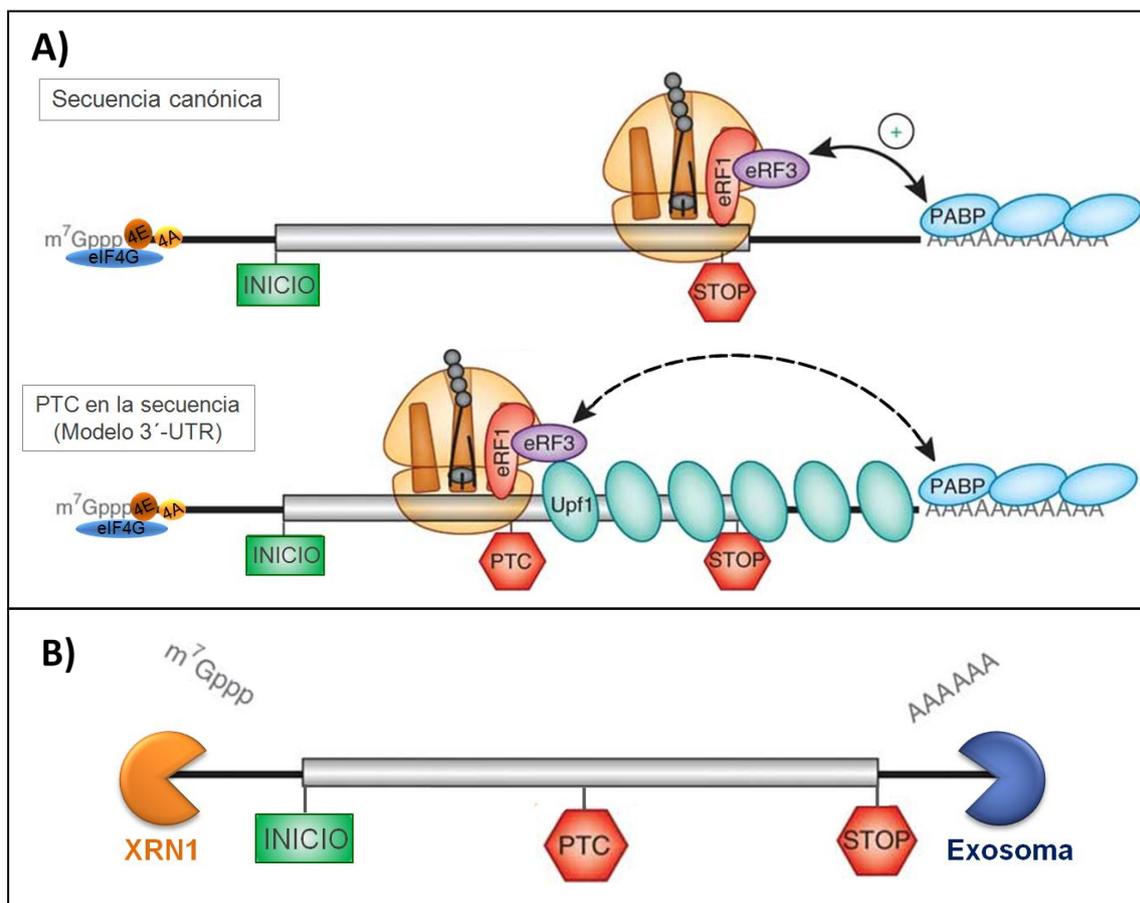


Figura 85. A) Terminación de la traducción canónica y cuando existe un PTC en la secuencia del ARNm. En el segundo caso, la terminación se modifica por la presencia de factores del NMD y se interrumpe la interacción entre eRF3 y PAB1. **B) Degradación del ARNm con PTCs en su secuencia.** Tras la eliminación de la secuencia CAP y de la cola de poliA, se produce una rápida degradación del ARNm promovida por el NMD por XRN1 en dirección 5'→3' y por el Exosoma en dirección 3'→5'.

Tanto en las cepas mutantes *rpl19bΔCT* (**Figura 38**) como en las cepas de delección de uno de los dos genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B* (**Figura 48 A**), además del fenotipo *slg*, aparecen grupos de **3 o más células vegetativas**, lo que sugiere que las dos células hijas no han conseguido separarse de la célula madre haploide y que podría estar retrasada la citocinesis. Se ha descrito que la limitación de nucleótidos de guanina en *S. cerevisiae* ralentiza la progresión del ciclo celular, especialmente en telofase. A nivel celular, esta limitación provoca la aparición de células con dos células hijas que no se han separado. Tanto por ensayos de fluorescencia como de microscopía electrónica, se ha demostrado que este fenotipo se debe a defectos en la separación de la pared celular entre las células hija y la célula madre, pero no a alteraciones de la citocinesis. Estos defectos en la separación de la pared también se han observado en una población de células WT cuando éstas entran en quiescencia, lo que corrobora la hipótesis de que los nucleótidos de guanina contribuyen a la señal de regulación de la proliferación celular (Sagot *et al.*, 2005). En el caso de los mutantes *Δrpl19a* o *Δrpl19b*, se ha detectado con calcoflúor que no se produce eficazmente la formación del septo primario para la separación de la yema, por lo que los defectos observados se deberían a defectos en la separación de la pared que divide las células madre e hija. La tinción de núcleos con DAPI indica que la división nuclear y transmisión a las células hijas no estaría impedida en los mutantes *rpl19bΔCT*.

Todos los mutantes obtenidos en este trabajo se generaron *in vitro* usando como sustrato de la mutagénesis un alelo *RPL19B_{Δi}* carente de intrón. Los **intrones** de los genes de las proteínas ribosómicas tienen un importante papel en la regulación transcripcional de dichos genes, especialmente los de algunas de ellas y en ciertas condiciones de estrés (Pleiss *et al.*, 2007; Meyer and Vilardell, 2009; Hu *et al.*, 2010; Bergkessel *et al.*, 2011; Parenteau *et al.*, 2011; Plocik and Guthrie, 2012; Garre *et al.*, 2013). Los distintos intrones en tamaño y secuencia de los RPG parálogos de *S. cerevisiae* regulan a veces la expresión del propio gen y/o la del otro parálogo. En concreto, para el intrón de *RPL19B*, se ha descrito que ejerce una regulación positiva tanto intragénica como intergénica, ya que su eliminación reduce la expresión de *RPL19A* y de *RPL19B* (Parenteau *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros datos indican lo contrario en el caso de la eliminación del intrón de *RPL19B*, ya que el transcrito de *RPL19B_{Δi}* es un 25% más abundante que el del ARNm de *RPL19B* (**Figura 26**). Estas diferencias podrían ser debidas al distinto fondo genético de las cepas utilizadas en nuestro laboratorio y/o a que el alelo *RPL19B_{Δi}* se expresa desde un plásmido centromérico y no integrado en el genoma, como en el trabajo de Parenteau *et al.*, 2011. Sin embargo, en este trabajo se comparan los datos de los mutantes *rpl19b_{Δi}* con los obtenidos para la cepa WT de referencia *RPL19B_{Δi}*, que es isogénica, estando los genes clonados en un vector idéntico y flanqueados por secuencias también idénticas en ambos extremos de las ORF. Por tanto, la ausencia del intrón no contribuye en

modo alguno a las diferencias fenotípicas observadas entre cepas mutantes *rpl19b Δ CT* y silvestres *RPL19B_{Δi}*.

Las cantidades netas (*steady state*) de los transcritos de *RPL19A* o de *RPL19B* son mayores cuando sólo se expresa desde plásmidos centroméricos uno de los dos genes parálogos, como en las cepas Hm573 (*RPL19A*) y Hm566 (*RPL19B*), que cuando se expresan ambos parálogos en la cepa Hm570 (*RPL19A RPL19B*) (**Figura 26**). Esto también ocurre en las cepas BY4741 (WT), Y07156 ($\Delta rpl19a$) y Y03053 ($\Delta rpl19b$) (**Figura 49**), donde se encuentran en el genoma el parólogo A y/o B. Este resultado sugiere que, al existir una sola molécula de cada RP en cada ribosoma (Pearson *et al.*, 1982) – a excepción de RP dispensables que pueden no estar presentes en todos los ribosomas, como L24, L39 y L41 (Dresios *et al.*, 2003) – cuando falta uno de los parálogos, la expresión del otro parólogo puede aumentar para compensar su carencia. No obstante, y en todo caso, la expresión desde un plásmido centromérico de bajo número de copias de cualquiera de los genes parálogos *RPL19A* o *RPL19B*, como del gen *RPL19B_{Δi}*, complementa aparentemente igual el fenotipo de letalidad de la doble delección $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ y tienen un crecimiento similar todas las cepas analizadas (**Figura 24**). Este resultado está de acuerdo con estudios previos que indican que la levadura regula la cantidad de las proteínas ribosómicas a nivel de su síntesis y/o de su degradación, o de la regulación de la cantidad y estabilidad de su ARNm, como en el caso de L2, L7, L9, L30, L32, S13 y S14 (Dabeva and Warner, 1993; Malygin *et al.*, 2007; Gudipati *et al.*, 2012; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013), para ajustar las cantidades de todas ellas, ya que el exceso de una proteína ribosómica podría ser deletéreo para la célula (Pearson *et al.*, 1982; Warner, 1999). La degradación del exceso del ARNm podría contribuir también a la inestabilidad o reducción de la cantidad de los transcritos mutantes *pGAL::rpl19b Δ CT* que poseen una región promotora 5' heteróloga. Es decir, la sobreexpresión, la naturaleza y secuencia del promotor y, por tanto, de la secuencia líder 5' del ARNm junto con la presencia de PTCs, contribuirían quizá de forma sinérgica a la inestabilidad de los transcritos mutantes en relación a los del alelo silvestre *RPL19B_{Δi}*.

2. L19e Y LA BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

El estudio del procesamiento de los ARNr mediante análisis de northern blot, revela que existen diferencias significativas entre la falta de la proteína L19e y la presencia de proteínas L19e Δ CT en las células de *S. cerevisiae* (**Figura 86**). Cuando se sintetizan únicamente proteínas L19e truncadas en su extremo C-terminal – mutantes *rpl19b Δ CT* ($\Delta 22$, $\Delta 27$, $\Delta 32$) – se acumulan, tanto a 28°C como a 18°C, los precursores 35S, 20S y 7S.

A **28°C** se observa que en todos los mutantes *rpl19bΔCT* se acumulan, además del precursor primario 35S, el precursor 27SA₂ y los demás precursores 27S del ARNr 25S. Como demuestra el análisis de PE que se muestra en la **Figura 60**, L19e se requiere para el procesamiento específico del precursor 27SB y se incorpora de manera estable en los pre-ribosomas 66SB. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ohmayer *et al.*, 2013 y Gamalinda *et al.*, 2014. Por lo tanto, la acumulación de “todos los precursores 27S” que se observa en el análisis de northern por hibridación con la sonda 4 (**Figura 54**), se debería fundamentalmente a la acumulación de este precursor concreto 27SB en los mutantes *rpl19bΔCT*. También se observa que se acumula más ligeramente el precursor minoritario 24S en dichos mutantes, así como el precursor 23S que se puede procesar a ARNr 18S (Granneman and Baserga, 2004). También parece existir un defecto en los últimos pasos del procesamiento del ARNr maduro 5,8S, ya que se acumula ligeramente el precursor 7S en todos los mutantes *rpl19bΔCT* (**Figura 55**). Sin embargo, las cantidades relativas de los ARNr maduros **25S** y **18S** no disminuyen en los mutantes *rpl19bΔCT* respecto a la cepa WT a 28°C. Este resultado concuerda con que el cociente 60S/40S tampoco se reduzca significativamente a 28°C en los mutantes *rpl19bΔCT* respecto a la cepa WT. Por lo tanto, más que un impedimento, se podría tratar de retrasos o anomalías leves en la ruta de procesamiento de los ARNr en los mutantes. Aunque no se puede determinar con exactitud si las cantidades totales de subunidades ribosómicas y de ribosomas maduros son menores en los mutantes *rpl19bΔCT* que en la cepa silvestre isogénica, los perfiles de polisomas sugieren que no es el caso (véase más adelante).

A **18°C** se observa una notable disminución del pre-ARNr **27SA₂**. Esto podría ser debido a que a 18°C el procesamiento ocurriría más lentamente o con mayor dificultad en los mutantes, pues la biogénesis de ribosomas requiere un gran gasto energético (Warner, 1999), por lo que los defectos se agravarían a bajas temperaturas. La también mayor acumulación a 18°C del precursor 35S conduciría a una reducción de la cantidad neta de los precursores **27S**. Además, en todos los mutantes se observa a 18°C la aparición de un precursor minoritario y anómalo identificado como **21S**, que se produciría como consecuencia de un procesamiento alternativo en A₀ y A₁ pero no en A₂ y sí en A₃ (**Figura 53**). Como se indicó en los resultados de esta Memoria, la inhibición del procesamiento endonucleolítico temprano del precursor 35S en A₀ y A₁ impide el procesamiento subsiguiente en A₂, y conduce en determinadas cepas o mutantes a que se produzca el procesamiento en A₃, en lugar de en A₂ (Venema and Tollervey, 1999; Granneman and Baserga, 2004; Garcia-Gomez *et al.*, 2011a). Este transcrito 21S se ha detectado también en cepas mutantes en las que se ha reducido la expresión de las proteínas L3, S0, S2, S3, S18, S19 y S20 (Venema and Tollervey, 1999; Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Rosado *et al.*, 2007b). Además, el procesamiento en A₃ produciría el precursor 23S, pero la hibridación diferencial con varios oligonucleótidos permitió identificar al precursor como 21S (**Figura 54**).

Se ha descrito que los transcritos aberrantes de los ARNr pueden ser degradados a través del complejo TRAMP (LaCava *et al.*, 2005; Houseley and Tollervey, 2006). Sin embargo, aunque 21S es un transcrito minoritario, es característico de los mutantes *rpl19bΔCT*, ya que no aparece al reducir progresivamente la síntesis de L19e ni tampoco en los mutantes de delección sencilla de un parálogo, o pseudo-haploinsuficientes (**Figuras 56 y 57**).

Por otra parte, también se observa a 18°C en los mutantes *rpl19bΔCT* una disminución de hasta un 10-20% de las cantidades de los ARNr maduros **25S** y **18S**. A esta temperatura se encuentran afectadas las tanto la ruta de procesamiento de la subunidad mayor como de la subunidad menor, por lo que el cociente 25S/18S no varía significativamente respecto a la cepa WT. Además, se observa una notable disminución de las cantidades del ARNr maduro **5S**, un transcrito independiente que sintetiza la ARN-polimerasa III (**Figura 55**). El ARNr 5S se requiere para el procesamiento en C₂ del precursor 27SB junto con las proteínas eucarióticas **L19**, L9, L17, L23, L27, L31, L34, L35 y L37 (Dechampesme *et al.*, 1999; Gamalinda *et al.*, 2014). En las cepas mutantes *rpl19bΔCT*, que sintetizan proteínas truncadas L19eΔCT, podría estar alterado el reclutamiento del ARNr 5S en los pre-ribosomas 66S y, dado que tiene una vida media corta (excepto si se encuentra en complejo con L5) (Deshmukh *et al.*, 1993), podría no ensamblarse eficazmente y una fracción del mismo se degradaría. El complejo formado por el ARNr 5S y las proteínas L5 y L11 se requiere para el procesamiento efectivo del precursor 7S al ARNr maduro **5,8S** (Zhang *et al.*, 2007; Poll *et al.*, 2009). Por lo tanto, es posible que de esta forma se ajusten fisiológicamente las cantidades de ambos ARNr de pequeño tamaño, 5,8S y 5S, en las cepas mutantes. Por otra parte, se ha descrito que en varios mutantes de la ARN-polimerasa III disminuyen, además de las cantidades del ARNr 5S, las cantidades de los ARNr maduros 18S, 25S y 5,8S, sintetizados por la ARN-polimerasa I (Briand *et al.*, 2001). Se ha propuesto a partir de esa observación que existiría en *S. cerevisiae* un fenómeno de “cross-talk” o acoplamiento fisiológico entre la síntesis de todos los ARNr y/o degradación del exceso de alguno de ellos. Además, en los mutantes *rpl19bΔCT* las cantidades netas del ARNr maduro **5,8S** se reducen en la misma proporción que las del ARNr 5S, por lo que también se podría atribuir este resultado a ese tipo de acoplamiento fisiológico.

Finalmente, el precursor **20S** del 18S ARNr se acumula también en los mutantes *rpl19bΔCT*, el cual se procesa en el sitio D del ITS1 para dar lugar en el citoplasma al transcrito maduro de la subunidad 40S (**Figura 14**). El factor de traducción FUN12 (eIF5B) promueve la actividad GTPasa de la endonucleasa NOB1, que es la enzima que produce el corte endonucleolítico en el sitio D para el procesamiento del pre-ARNr 20S (Lebaron *et al.*, 2012). Como se observa en la **Figura 69**, la sobreexpresión de *FUN12* usando un plásmido de alto número de copias, suprime parcialmente el fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19bΔCT* a todas las temperaturas ensayadas. Este resultado sugiere que el ensamblaje de FUN12 en las pre-

partículas ribosómicas o su función podrían encontrarse comprometidas en estos mutantes, como se ha descrito que ocurre en el mutante *rpl3*[W255C] de *S. cerevisiae*, que acumula subunidades pre-40S inmaduras con el pre-ARNr 20S (Garcia-Gomez *et al.*, 2014). Sin embargo, falta por demostrar si el supresor de dosis FUN12 promueve en los mutantes *rpl19b* Δ CT el procesamiento del pre-ARNr 20S a ARNr 18S y, con ello, un aumento de las cantidades de subunidades 40S maduras. Por otra parte, FUN12 promueve la unión de subunidades ribosómicas 60S a 40S (véase más adelante).

Por tanto, los pasos del procesamiento más afectados en los mutantes *rpl19b* Δ CT, que podrían estar más retrasados o parcialmente impedidos, son los cortes A₀, A₂, C₂ y D, y también estarían ligeramente retrasados A₁ y A₃ (Figuras 54 y 55, y Tablas 12, 13 y 14). Al encontrarse afectadas las 2 rutas del procesamiento, la cantidad final de subunidades 60S y 40S estaría compensada, por lo que el cociente 60S/40S no disminuye significativamente.

En mutantes que portan alelos *pGAL::rpl19b* Δ CT de sobreexpresión, la mayoría de los defectos de procesamiento de precursores de los ARNr son similares a los que presentan los mutantes portadores de alelos *rpl19b* Δ CT clonados con su promotor natural. Los defectos son en general menos acusados en los mutantes *pGAL::rpl19b* Δ CT, lo que sugiere que podría haber cierta haploinsuficiencia añadida al efecto de las mutaciones Δ CT cuando los alelos correspondientes están clonados en plásmidos centroméricos de bajo número de copias y se expresan en un fondo genético de doble deleción, Δ *rpl19a* Δ *rpl19b*. En los mutantes *pGAL::rpl19b* Δ CT los precursores 20S y 7S no se acumulan a 18°C. Este resultado de defectos menos acusado no concordaría con la inestabilidad de los transcritos mutantes con un promotor heterólogo (Figura 43); Sin embargo, la cantidad del transcrito de fusión *pGAL::RPL19B Δ _i* es ~5 veces mayor que la del transcrito natural del gen *RPL19B* (Figura 26 A), por lo que, aunque en los mutantes *pGAL::rpl19b* Δ CT los ARNm sean más inestables, habría cantidad suficiente en la célula para compensar la posible haploinsuficiencia de los mutantes *rpl19b* Δ CT

La carencia de L19e causada al reprimir progresivamente la expresión del alelo condicional *pGAL::RPL19B Δ _i* en glucosa, causa una importante acumulación de los precursores 35S y 23S, mucho mayor que la debida a proteínas truncadas L19e, y no se observa acumulación del precursor 21S. La cantidad de los precursores 27SA₂ y de los demás 27S en conjunto aumenta, pero tanto la cantidad de los ARNr maduros 25S y 18S, como la de los precursores 24S, 20S y 7S disminuye. En este caso, el procesamiento en los sitios que estarían parcialmente impedidos son A₀, A₁, A₂ y C₂. La acumulación del pre-ARNr 35S y del precursor 23S cuando se reduce la cantidad de proteína L19e indica que se requiere para el procesamiento temprano en A₀, A₁ y A₂. La inhibición de los primeros cortes endonucleolíticos podría deberse a un efecto secundario causado por el defecto en el procesamiento en pasos tardíos, que podrían provocar una señal de

bloqueo de la ruta (Venema and Tollervey, 1999), quizá por una liberación más lenta de los factores de ensamblaje, provocando un retraso en su reciclaje y con ello, una menor disponibilidad para ensamblarse de nuevo al inicio de la ruta de procesamiento. El precursor **23S** procedente del corte del pre-ARNr 35S en A₃ sin que se hayan producido los cortes tempranos A₀, A₁ y A₂, se ha detectado en frecuentes ocasiones en análisis de northern de cepas silvestres de *S. cerevisiae* (Dunbar et al., 1997; Lee and Baserga, 1997; Granneman and Baserga, 2004; Garcia-Gomez et al., 2011a), y se ha descrito que puede procesarse normalmente dando lugar al ARNr 18S (Granneman and Baserga, 2004), por lo que podría tratarse de un precursor alternativo más que de una molécula anómala. Sin embargo, otros autores indican que en la mayoría de los casos podría ser degradado rápidamente por el exosoma (Venema and Tollervey, 1999; Allmang et al., 2000). La molécula 24S, por el contrario, no se ha detectado en cepas silvestres, por lo que cuando este precursor se sintetiza estaría indicando una anomalía en el procesamiento de los ARNr.

Cuando falta la proteína L19e, se observa también una acumulación de los precursores **27S** en conjunto y una disminución del ARNr **7S**, sugiriendo un retraso en el corte en C₂. Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos en el laboratorio del Dr. Philipp Milkereit y del Dr. John Woolford, donde realizan un análisis comparativo del procesamiento del pre-ARNr en la misma cepa $\Delta rpl19a \Delta rpl19b [pGAL::RPL19B_{\Delta i}]$. Estos autores demostraron que para el procesamiento del pre-ARNr 27SB, junto a L19, se requieren además las RPL de ensamblaje intermedio L9, L17, L23, L25, L26, L27, L31, L34, L35 y L37, estando la mayor parte de ellas interaccionando con el Dominio III del ARNr 25S, al igual que L19, por lo que además podrían ser necesarias para el correcto plegamiento de este Dominio (Poll et al., 2009; Ohmayer et al., 2013; Gamalinda et al., 2014). Por otro lado, la cantidad de los precursores **24S** y **20S** disminuye cuando se reduce la cantidad de proteína L19e, lo que sugiere que la ruta más afectada en este caso es la que va a procesar los ARNr maduros de la subunidad 60S del ribosoma. Además, las cantidades totales de los ARNr maduros **18S** y más especialmente de **25S**, también disminuyen con la carencia de L19e. Estos defectos posiblemente sean consecuencia además del impedimento que ocurre en los cortes tempranos del procesamiento.

También se han observado algunas diferencias específicas en los **mutantes de delección sencilla**. En el mutante $\Delta rpl19a$, los mayores defectos se observan en las cantidades totales de los ARNr maduros 25S y 18S, que en ambos casos disminuyen tanto a 28°C como a 37°C. En este mutante no se observa acumulación de ninguno de los precursores, y tan sólo una pequeña disminución del precursor 7S. En el mutante $\Delta rpl19b$, se observan defectos en procesamiento de precursores de los ARNr similares a los obtenidos cuando se reprime la síntesis de la proteína L19e (**Figura 56**), especialmente en la acumulación de los precursores 35S y 23S; no obstante, se observa una mayor acumulación en este mutante de los precursores 27SA₂ y de 24S que

cuando disminuye la dosis de L19e, por lo que el procesamiento en A₃, además de en A₀, A₁, A₂ y C₂, también estaría parcialmente impedido.

Todos los datos indican que las truncaciones C-terminales de L19e no causarían una disminución apreciable de subunidades 60S ni de 40S maduras, aunque afectarían principalmente a la funcionalidad de la 60S. Por lo tanto, aunque no haya un impedimento grave en la biogénesis ni en la acumulación de subunidades, existiría un retraso en su formación, pues se observa acumulación de precursores a lo largo de la ruta de las dos ramas del procesamiento para dar lugar a los ARNr maduros, lo que concuerda con que los mutantes *rpl19bΔCT* ($\Delta rpl19a \Delta rpl19b [rpl19b\Delta CT, CEN6 URA3]$) sean viables y tengan un *slg* muy acusado a baja temperatura (18°C).

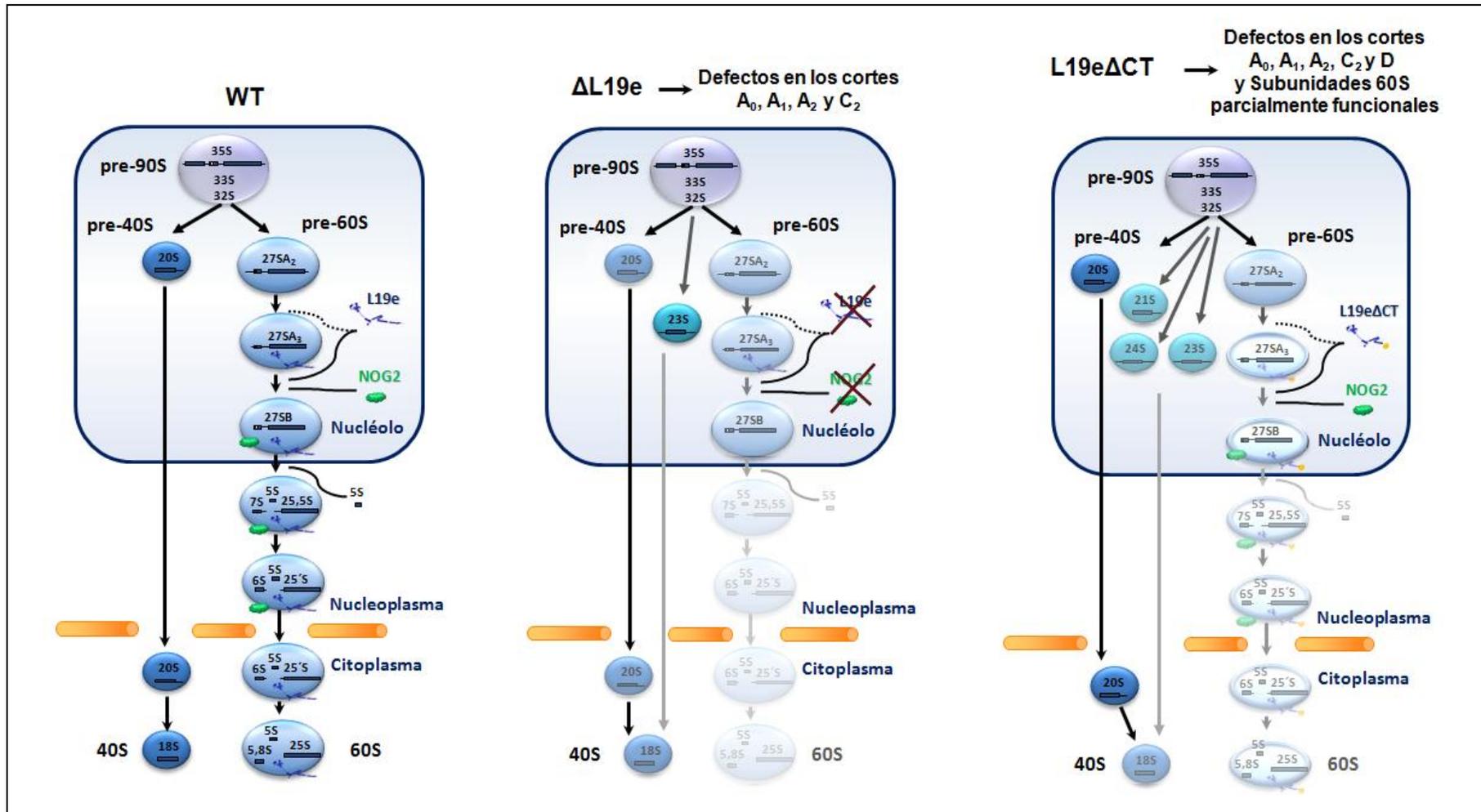


Figura 86. Modelo del procesamiento del pre-ARNr en cepas WT, en cepas en las que falta L19e y en cepas con L19e truncada en su zona C-terminal.

2.1. L19e en el ensamblaje y transporte de los pre-ribosomas 66SB

La unión de las proteínas ribosómicas componentes de la subunidad mayor 60S, RPL o L, a las subunidades pre-ribosómicas está estrechamente conectada con el plegamiento de los ARNr para el ensamblaje de subunidades maduras estructuralmente estables. El resultado de nuestros análisis indica que L19e es una proteína de **ensamblaje intermedio** que empezaría a asociarse a pre-ribosomas 66SA₂, pero que se encuentra ya asociada establemente o mayoritariamente con pre-ribosomas 66SB que contienen el precursor 27SB. Este resultado concuerda con los defectos detectados en el procesamiento de los ARNr en todos los mutantes *rpl19* analizados en este trabajo, incluidos los *rpl19bΔCT*, especialmente con el defecto en el corte endonucleolítico en C₂, para el que se requiere L19e (**Figura 87**). Nuestros datos también concuerdan con los obtenidos utilizando una técnica de espectrometría de masas semi-cuantitativa para analizar los componentes de las diferentes partículas pre-ribosómicas (iTRAQ) (Jakob *et al.*, 2012) en los que se demuestra la asociación de L19e con el precursor 27SB de los ARNr 25S y 18S en *S. cerevisiae* (Ohmayer *et al.*, 2013; Gamalinda *et al.*, 2014).

La mayoría de las proteínas ribosómicas eucarióticas que se ensamblan en pre-partículas 66SB (L17, L25, L26, L31, L35 y L37), se localizan alrededor del túnel de salida del polipéptido, al igual que L19 (Ben-Shem *et al.*, 2011; Gamalinda *et al.*, 2014). Cuando se priva a *S. cerevisiae* de L25, se afecta la asociación de las RPL L2, **L19**, L31, L39 y L43 a los pre-ribosomas. Todas ellas interactúan con el Dominio III del ARNr 25S, por lo que podrían ser necesarias para su plegamiento (Ohmayer *et al.*, 2013). En las cepas mutantes *rpl19bΔCT*, no se observaron diferencias significativas en el ensamblaje de las proteínas L3, L5 y L17 ni demás factores de ensamblaje analizados en relación a la cepa WT (**Figura 61**). Sin embargo, la incorporación a los pre-ribosomas 66SB del factor **NOG2** se reduce al reprimir la síntesis de L19e, indicando que esta proteína se requiere para la asociación estable de la GTPasa y la eliminación del ITS2 del pre-ARNr 27SB (Talkish *et al.*, 2012). También se ha observado un defecto en la incorporación de NOG2 al reprimir la síntesis de L17, L35 y L37, que forman parte del túnel de salida del polipéptido en la subunidad 60S (Gamalinda *et al.*, 2013). Los factores denominados “B” que se asocian temporalmente con los pre-ribosomas 66S, que contienen el precursor 27SB y el complejo 5S-L5-L11, son necesarios para reclutar a NOG2 (Zhang *et al.*, 2007; Talkish *et al.*, 2012).

En los mutantes *rpl19bΔCT* la incorporación de algunos factores de ensamblaje como NOP7, HAS1, TIF6, RLP24, NSA2, NIP7 o NOG1 (**Figura 61**) no está impedida, pues su cantidad no disminuye sensiblemente en pre-ribosomas purificados por afinidad de mutantes *rpl19bΔCT NOP7::TAP* en relación a una cepa isogénica *RPL19BΔ_i NOP7::TAP*. Este resultado indica que el dominio C-terminal de L19e es dispensable para la incorporación de L19e a los

pre-ribosomas 66SB y que la incorporación de proteínas truncadas L19e Δ ACT no afecta gravemente al ensamblaje de pre-ribosomas y de las subunidades 60S. Finalmente, en un estudio realizado con la técnica de iTRAQ se observó que, en ausencia de **NOG2** o de **NOP53**, la cantidad de L19e que se incorpora en pre-ribosomas 66SB se reduce. NOP53 es un factor necesario para el transporte núcleo-citoplasmático de la subunidad pre-60S y para los últimos pasos del procesamiento de los ARNr 25S y 5,8S (Thomson and Tollervey, 2005; Granato *et al.*, 2008). Todos estos datos apoyan la idea de un papel esencial de L19e en el ensamblaje de las partículas pre-ribosómicas intermedias 66SB en el núcleo de *S. cerevisiae*.

La biogénesis de ribosomas comienza en el nucléolo, continúa en el nucleoplasma, y finaliza con el transporte de las partículas pre-40S y pre-60S al citoplasma, donde ocurren los últimos pasos del procesamiento de los ARNr. Las partículas pre-40S, a diferencia de las pre-60S, carecen de GTPasas y ATPasas, por lo que es posible que requieran un menor número de reordenamientos estructurales durante su formación en relación con las partículas pre-60S, lo que permite que puedan ser transportadas con mayor rapidez al citoplasma. Sin embargo, en el caso de las partículas pre-60S, estas deben sufrir numerosos reordenamientos estructurales. Estos procesos podrían constituir puntos de control estructural para garantizar que sólo salen al citoplasma partículas pre-60S que se asemejen en gran medida en su composición y estructura a subunidades 60S maduras (Tschochner and Hurt, 2003; Kressler *et al.*, 2010; Panse and Johnson, 2010). Cuando en la célula existen proteínas L19e truncadas (mutantes *rpl19b Δ ACT*) y, en mayor grado, cuando se reduce progresivamente la cantidad de L19e, **el transporte** desde el núcleo/nuécleo al citoplasma de las partículas pre-60S está impedido en distinto grado (**Figura 87**). Así, el defecto leve en transporte núcleo-citoplasmático de partículas pre-60S de los mutantes *rpl19b Δ ACT* (observable en un 10-15% de las células, **Figura 62**) podría ser debido a un retraso en el procesamiento de los pre-ARNr 27S. Sin embargo, la carencia progresiva de L19e generará pre-ribosomas 66SB defectuosos, sin todos los componentes necesarios y quizá con estructura atípica, que no salen del núcleo y podrían ser degradados por el exosoma y proteasoma. L19e podría servir como soporte para la maquinaria de transporte, ya que se ha descrito que el factor ARX1, un receptor nuclear con un papel regulador en la translocación núcleo-citoplasma de los pre-ribosomas 60S, interacciona directamente con L19e, además de con las RPL L25, L26 y L35, en el túnel de salida del polipéptido (Nissan *et al.*, 2002; Hung and Johnson, 2006; Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008; Bradatsch *et al.*, 2012; Greber *et al.*, 2012). Defectos en el transporte de las partículas pre-60S se han observado también en mutantes que afectan a la biogénesis de la subunidad 60S, incluyendo mutantes de proteínas ribosómicas, como L3, L7, L8, L10, L17, L35, L37, L40 y P0 (Gadal *et al.*, 2001; Rosado *et al.*, 2007; Rodríguez-Mateos *et al.*, 2009; Babiano and de la Cruz, 2010; Fernandez-Pevida *et al.*, 2012; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013).

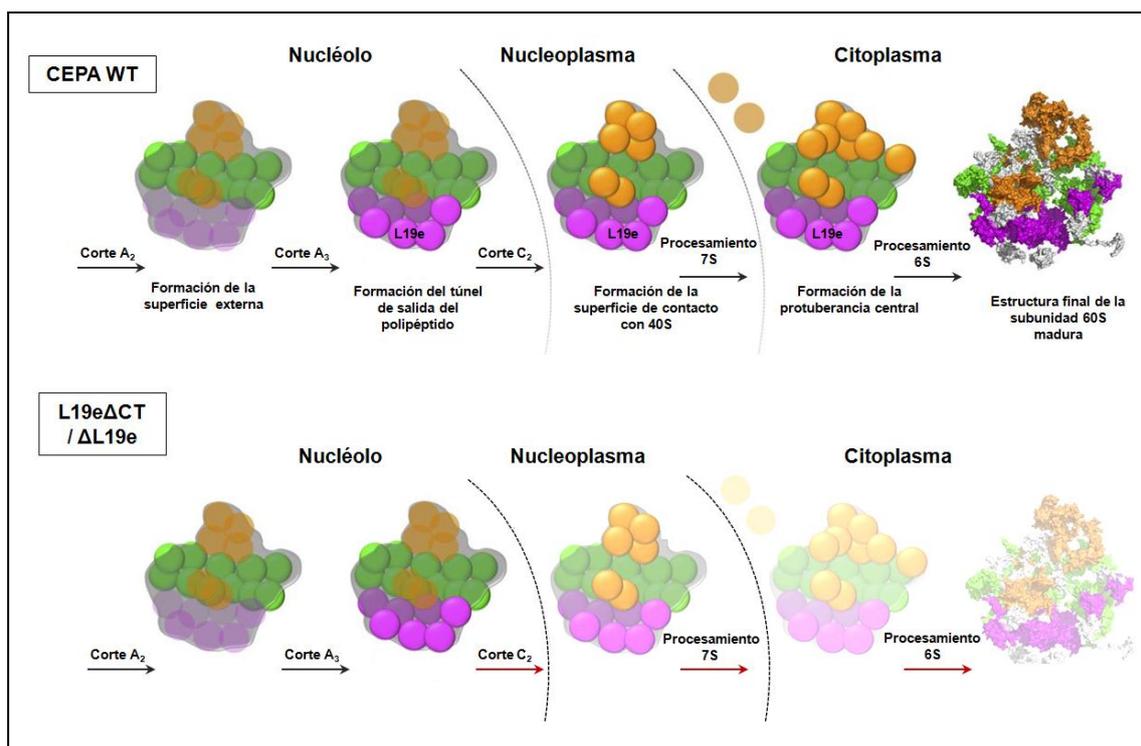


Figura 87. Modelo para el ensamblaje y transporte de la subunidad 60S en ausencia de L19e. En la parte superior se representa el transporte en una cepa WT de *S. cerevisiae*. En la parte inferior, el impedimento del transporte por la reducción progresiva de dosis de L19e y, más leve, en mutantes *rpl19bACT*. En verde se representan las RPL de ensamblaje temprano, en morado las de ensamblaje intermedio, entre las que se encuentra L19e, en naranja las de ensamblaje tardío, y en gris el ARNr. (Modificado de Gamalinda *et al.*, 2014).

3. L19e EN EL INICIO GLOBAL DE LA TRADUCCIÓN

Los modelos estructurales del ribosoma 80S (Ben-Shem *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012) sugieren que L19e, por su localización en el ribosoma, podría desempeñar funciones importantes en el inicio y final de la traducción o su regulación. El análisis de los perfiles de polisomas de cepas que portan alelos **mutantes** *rpl19bACT* revela defectos en el inicio general de la traducción, tanto a 28°C como a 18°C. Se observa en los perfiles de polisomas que se acumulan subunidades **60S**, más acusado a 18°C, lo que sugiere que las subunidades 60S mutantes tendrían dificultades para asociarse al PIC 43S e iniciar la traducción con la misma eficacia que subunidades ensambladas con una L19e WT. Sin embargo, la proporción de subunidades 60S libres representa sólo un 10-15% del total de los polisomas, a pesar de lo aparentemente grande que es el pico de 60S observable en el perfil (**Figura 64**). Es posible que en los mutantes *rpl19bACT* exista también una cierta reducción de subunidades **40S** maduras – o que su formación esté retrasada – ya que acumulan el precursor 20S del ARNr 18S (**Figura**

54), y esto es indicativo de una acumulación de **pre-ribosomas 40S** en el citoplasma (Kressler *et al.*, 1997; Garcia-Gomez *et al.*, 2014). En menor medida, un retraso en la producción del ARNr 18S y de subunidades 40S puede verse acentuado por la formación del transcrito inusual 21S que ocurre a 18°C. Estos datos concuerdan además con que no se observen *halfmers* en los perfiles de ninguno de los mutantes *rpl19bΔCT*, es decir, PICs 43S unidos al ARNm sin que se hayan unido a ellos subunidades 60S para comenzar la traducción (**Figura 64**).

Cuando se **reduce la dosis de L19e** se sintetizan menos subunidades **60S**, lo que conlleva a que las cantidades de monosomas (**80S**) y de **polisomas** también disminuyan y que aparezcan *halfmers*. Estos perfiles se han obtenido también cuando faltan otras proteínas ribosómicas de la subunidad 60S, como son L3, L7, L8, L11, L17, L26, L29, L33, L35, L37 y L40 (DeLabre *et al.*, 2002; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2007; Babiano and de la Cruz, 2010; Rhodin and Dinman, 2010; Fernandez-Pevida *et al.*, 2012; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013).

En el procesamiento del 20S pre-ARNr interviene **FUN12/eIF5B**, una GTPasa que promueve la maduración final de las subunidades pre-40S en el citoplasma (Soudet *et al.*, 2010; Lebaron *et al.*, 2012). Se ha demostrado que cuando el pre-ARNr 20S no se procesa adecuadamente en un mutante *rpl3[W255C]* de *S. cerevisiae*, las subunidades pre-40S presentes en el citoplasma pueden iniciar la traducción y entrar en elongación (Soudet *et al.*, 2010; Lebaron *et al.*, 2012), como se ha descrito que ocurre (Garcia-Gomez *et al.*, 2014). FUN12/eIF5B es un factor de traducción que contacta con dominio IV del ARNr 25S e interacciona con el loop A, que forma parte del centro peptidil-transferasa, contribuyendo a la fidelidad de la traducción (Asano *et al.*, 2000; Lebaron *et al.*, 2012; Strunk *et al.*, 2012; Hiraishi *et al.*, 2013); también se ha descrito que puede promover la unión 60S/40S (Pestova *et al.*, 2000). Durante la elaboración de esta Memoria, se encontró que FUN12/eIF5B es un supresor de dosis que suprime parcialmente el fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19bΔCT* a todas las temperaturas ensayadas (Figura 69). En general, los factores de inicio de la traducción (eIFs) se sintetizan en bajas cantidades y los ARNm competirían por ellos para su traducción, de hecho, la sobredosis o hiperactividad de algunos de ellos, como eIF4E, es oncogénica en mamíferos (Bitterman and Polunovsky, 2014; Pettersson *et al.*, 2014), y la hiperactividad de eIF2 reduce drásticamente la traducción y desreprime constitutivamente la del ARNm *GCN4* en *S. cerevisiae* (Vazquez de Aldana *et al.*, 1993). Un exceso de FUN12/eIF5B podría pues favorecer la iniciación de la traducción en mutantes *rpl19bΔCT* y/o promover la unión de subunidades 60S anómalas a los PIC 43S. No se ha investigado aún si la sobreexpresión de FUN12/eIF5B (i) promueve la maduración del precursor 20S al ARNr 18S en los mutantes *rpl19bΔCT*, (ii) ni si se detecta 20S en las subunidades 40S que forman ribosomas 80S o en la fracción de polisomas de los mutantes, (iii) ni si se reduce la fracción de subunidades 60S en favor de un aumento de

la de los polisomas, lo que demostraría que la sobredosis de FUN12/eIF5B promueve la unión de las dos subunidades ribosómicas 60S/40S. Cualquiera de estos mecanismos de acción de FUN12/eIF5B podría explicar la supresión parcial del fenotipo *slg* de los mutantes *rpl19bΔCT*.

Los perfiles de polisomas en los mutantes *rpl19bΔCT* indican que tienen defectos en la etapa final del inicio de la traducción en la unión de subunidades 60S/40S, que marca el inicio de la elongación; se reduce ligeramente el contenido total de **polisomas**, y los cocientes P/M también se reducen a las dos temperaturas. En el caso de los mutantes *rpl19bΔ27* y *rpl19bΔ39*, se observa además una disminución del contenido de **monosomas** (80S). En las estructuras de los ribosomas de eucariotas, los dominios C-terminales de L19e y L24e están involucrados en la formación de dos de los puentes de unión más aparentes entre las subunidades 60S y 40S (*eukaryotic bridges*, **eEB**), el eB12 y eB13, respectivamente (**Figura 8**) (Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012), facilitando los contactos entre las dos subunidades ribosómicas. Los mutantes *rpl19bΔCT* tienen defectos en el inicio de la traducción, que contribuyen a sus defectos de crecimiento.

Es posible que una vez que las subunidades 60S L19eΔCT se unen a 40S, formen monosomas 80S defectivos o más lentos en elongación. Sin embargo, como se observa en los perfiles de polisomas tras privar a las células de glucosa para inhibir la iniciación, no se observa un *run-off* de polisomas más lento que en el WT en los mutantes *rpl19bΔCT*, por lo que no parece ser más lenta **la elongación** de la traducción (**Figura 66**). Este resultado concuerda con las predicciones de que el puente eB12 sea importante en la fase de iniciación, pero “desaparezca” de la fase de elongación en la estructura de baja resolución en los ribosomas 80S en complejo con eEF2 y en presencia de sordarina, que inhibe a eEF2, deteniendo el ribosoma en elongación (Spahn *et al.*, 2004). Por tanto, el dominio C-terminal de L19e – o una parte de él, al menos 39 aminoácidos – sería dispensable para la elongación de la traducción, pero necesario para que la iniciación proceda normalmente en *S. cerevisiae*. No se ha investigado cual es la máxima truncación del dominio C-terminal de L19e permisible para la viabilidad en *S. cerevisiae*, pero mutaciones que eliminan 63 aminoácidos aparecen en algunos alelos mutantes letales identificados en este trabajo. Tampoco si proteínas quiméricas, con una α -hélice C-terminal de otro organismo, serían funcionales en esta levadura.

Los mutantes *rpl19bΔCT* son algo más sensibles que una cepa WT a antibióticos que afectan a la **actividad descodificadora** o a la **actividad peptidil-transferasa** del ribosoma. Mutantes de *S. cerevisiae* con defectos en la biogénesis de ribosomas, tanto en el procesamiento de los ARNr como en el ensamblaje de subunidades, presentan cierta sensibilidad a antibióticos aminoglucósidos, como la higromicina B, neomicina y paromomicina (Kressler *et al.*, 1997; Ho and Johnson, 1999; Zabetakis, 2000; Loar *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2004; Martin-Marcos *et al.*,

2007; Rhodin *et al.*, 2011), lo que sugiere que el fenotipo de sensibilidad frente a estos antibióticos es común en cepas mutantes con un déficit en subunidades ribosómicas.

En los mutantes *rpl19bΔCT* no hemos detectado defectos de **fidelidad** en el inicio de la traducción (Capítulo IV). Mutantes de pseudo-heterozigosis *RPL19A rpl19bΔCT* son capaces de mantener el fenotipo *Killer* ($[K1^+]$), aunque no se ha investigado si éste sería el caso en mutantes dobles de delección $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ que sólo sintetizan proteínas truncadas L19e Δ CT. Por otra parte, al cuantificar en los mutantes $\Delta rpl19a \Delta rpl19b$ [*rpl19bΔCT*] la expresión *in vivo* de varios transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con distintos codones de inicio (AUG o UUG), no se observa un aumento significativo en la expresión del ARNm *HIS4* con un codón de inicio UUG respecto al que lleva el AUG respecto a la cepa WT. Esto indica que los mutantes analizados no tienen problemas en discriminar los codones no canónicos (UUG) de los que sí lo son (AUG) y por ello no tienen fenotipo *Sui⁻*. Sin embargo, se ha descrito recientemente que mutaciones en el ARNr 25S que cambian bases en la superficie de contacto de las subunidades en el ribosoma – como G1735A, que se localiza cerca del nuevo puente eucariótico eB12, en el que participa L19e – alteran la fidelidad de la traducción en *S. cerevisiae*, ya que, en presencia de una mutación *sui*, los ribosomas mutantes “pasan de largo” o se saltan con cierta frecuencia tanto codones AUG como de los no canónicos UUG (Hiraishi *et al.*, 2013). En este caso, los mutantes del 25S tienen el fenotipo contrario, *Ssu⁻*, o supresores del *Sui⁻*. Por ello, se prevé construir cepas mutantes *rpl19bΔCT* adecuadas portadoras de una mutación *sui* dominante, como *sui3-2* o *sui5*, para investigar si las mutaciones *rpl19bΔCT* son capaces de suprimirlo y tienen fenotipo *Ssu⁻*.

3.1. L19e en la regulación traduccional del ARNm *GCN4*

La traducción del ARNm *GCN4* está **reprimida** en los mutantes *rpl19bΔCT* (*GCN2*). Puesto que no se desreprime eficazmente el CGBA en ausencia de algún aminoácido, como la histidina, tienen un fenotipo **Gcn⁻**, más acusado en el caso de los mutantes *rpl19bΔ22* y *rpl19bΔ27*. Además, en ausencia de reguladores negativos como *GCN2*, o en cepas triples mutantes *rpl19bΔCT gcn2-101 gcn3-101* (silvestres para los genes *GCD*), los mutantes *rpl19bΔCT* no son capaces de desreprimir la traducción del ARNm *GCN4*, por lo que no tienen fenotipo *Gcd⁻*.

El fenotipo **Gcn⁻** de los mutantes podría interpretarse de esta forma (Figura 88):

1) **Defectos en la unión de subunidades 60S a las 40S en la fase de iniciación:** la reducción o disfuncionalidad de las 60S provocarían un *leaky scanning* o rastreo sin lectura del **uORF1** por el PIC 43S sin que se una 60S. La traducción del uORF1 genera con alta frecuencia

ribosomas 40S reiniciadores y es un requisito imprescindible para la desrepresión traduccional del ARNm *GCN4* (Hinnebusch, 2005). Si la iniciación ya está gravemente afectada en el uORF1, como en los AUG únicos de otros mensajeros celulares, la falta de subunidades 60S lo perjudicaría en la misma medida que a los demás y el sistema del CGBA no se desreprime. El complejo 43S, liberado tras traducirse el uORF1 por algunos ribosomas 80S, sin embargo, continuaría el rastreo hacia los demás AUGs de los otros uORFs 2, 3 o 4, pudiendo unirse una subunidad 60S a tiempo cuando alcanza la uORF4. Tras este evento, ~50% de los ribosomas que allí lleguen se disocian del ARNm y muy pocos 40S llegan a la meta final para poder unir otra 60S y traducir la ORF de *GCN4* (Hinnebusch, 2005; Hinnebusch, 2014).

2) Defectos en la reiniciación de la traducción: Otra posibilidad es que las mutaciones *rpl19b Δ CT* produzcan defectos en la reiniciación de la traducción en cualquier uORF. En ese caso, las subunidades 40S que se liberen tras traducir la uORF1 tendrían problemas para reiniciar en otros uORFs con otras características estructurales o secuencias contexto del AUG, incluida la de *GCN4*, por lo que también disminuye su traducción. L24e y L19e establecen contactos entre las subunidades 60S/40S (Melnikov *et al.*, 2012). Se ha descrito un papel de L24e en la reiniciación de la traducción en el caso del virus del mosaico de la coliflor (Nishimura *et al.*, 2004; Thiebeauld *et al.*, 2009). Varios factores de inicio de la traducción (eIFs) influyen en la eficiencia de reiniciación de la traducción: eIF3, eIF4F y eIF4A (Kim *et al.*, 2004; Poyry *et al.*, 2004; Hinnebusch, 2006; Szamecz *et al.*, 2008). En *S. cerevisiae*, eIF3 proporciona un vínculo entre el ARNm y la subunidad 40S para que ésta se mantenga unida al ARNm de *GCN4* tras traducir la uORF1 (Szamecz *et al.*, 2008). En plantas, para llevar a cabo la traducción de ARNm policistrónicos del virus de la coliflor, el factor de transcripción viral TAV interactúa con eIF3 y con la subunidad 60S a través de L24e (Park *et al.*, 2001), por lo que se ha propuesto un modelo que establece que el factor TAV impediría la disociación de eIF3 del ribosoma tras traducir las uORFs de los ARNm policistrónicos, y a través de la interacción de L24 con TAV favorecer el reclutamiento de las subunidades 60S para reiniciar la traducción (Park *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Thiebeauld *et al.*, 2009). Un mecanismo similar podría ocurrir en el caso de L19e, por lo que podría tener un importante papel en la reiniciación de la traducción.

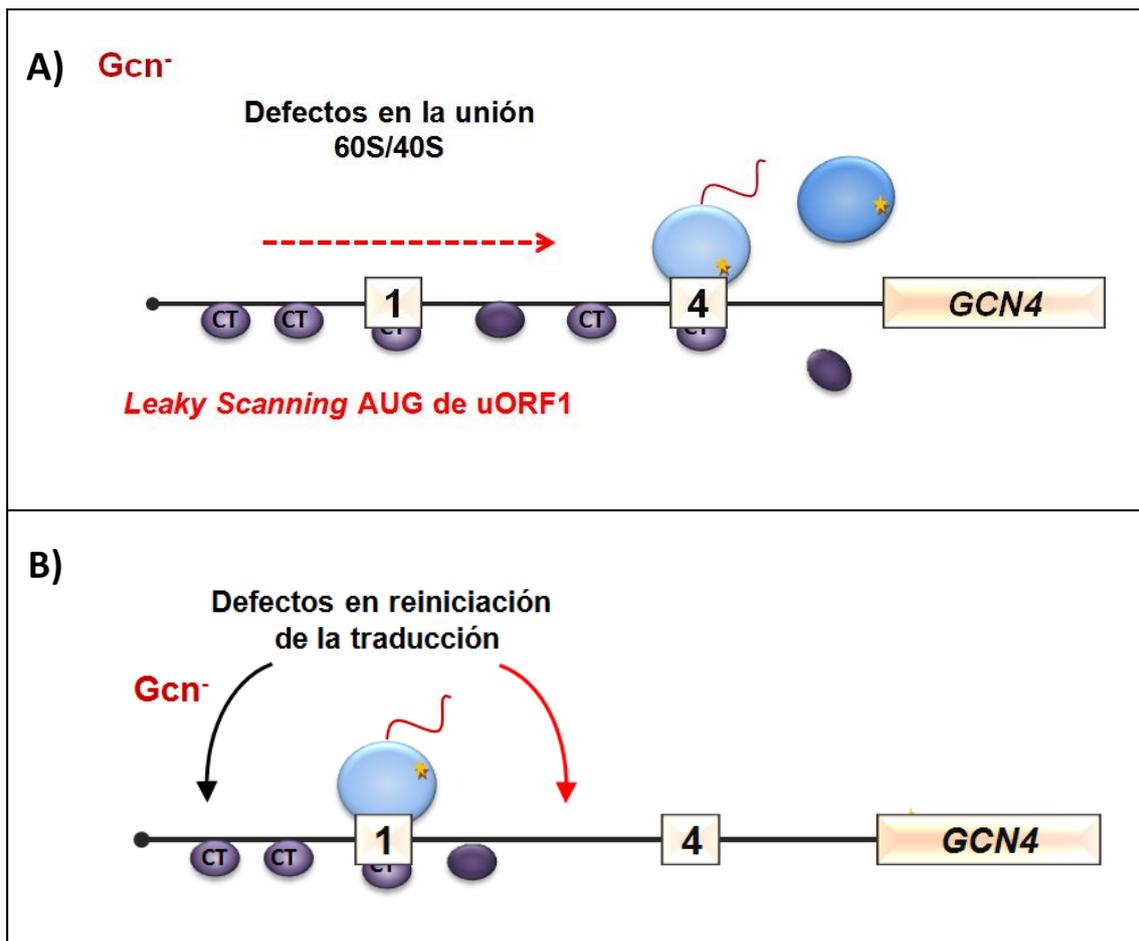


Figura 88. Modelo de regulación traduccional de *GCN4* y fenotipo Gcn^- en mutantes *rpl19bΔCT*.

A) Fenotipo Gcn^- debido al defecto en la unión de subunidades 60S mutadas con 40S que producen *leaky scanning* de la uORF1, llegando a traducir la uORF4 y provocando la separación de la mayoría de los ribosomas de la hebra del ARNm, no alcanzando la ORF de *GCN4*. **B)** Fenotipo Gcn^- debido a que las mutaciones *rpl19b* reducen la capacidad para reanudar la traducción, y se produciría una liberación de subunidades 40S tras traducir las primeras uORFs, con lo que la mayoría no alcanzarían la ORF de *GCN4*.

CONCLUSIONES

- 1) Las mutaciones L19e Δ CT alterarían – según las predicciones de la estructura cristalina – interacciones con el eES6 del 18S ARNr y /o con las proteínas S7 y S17 de la subunidad 40S.
- 2) L19e se ensambla en los pre-ribosomas en pasos intermedios de la maduración de 66SB y se requiere para el procesamiento de los precursores de los ARN ribosómicos.
- 3) Las truncaciones C-terminales de L19e afectan al procesamiento de los pre-ARNr (en los sitios A₀, A₁, A₂, C₂ y D), apareciendo además un transcrito aberrante 21S, sin alterar apreciablemente la proporción de subunidades maduras 60S/40S.
- 4) Las mutaciones *rpl19b* Δ CT no parecen afectar a la incorporación de otras rpL en los pre-ribosomas 66S, ni la de factores de ensamblaje. Sin embargo, L19e se requiere para el ensamblaje de la GTPasa NOG2 en los pre-ribosomas.
- 5) Las subunidades 60S en las que se ensamblan proteínas L19B truncadas (Δ 22, Δ 27, Δ 32 y Δ 39) son defectivas para la iniciación de la traducción, e impiden la desrepresión traduccional de *GCN4* (fenotipo Gcn-).
- 6) Alteraciones que afectan al dominio N-terminal (N27D, S37A, G48R) o mutaciones puntuales en el dominio C-terminal de L19e (A168T, L185A, D188R) no causan fenotipo observable ni afectan a la traducción.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. Levaduras

Las cepas de levadura utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y en la **Tabla I de los Anexos** se indican los genotipos relevantes y su procedencia. A continuación, se detalla cómo se han obtenido algunos mutantes de delección y los alelos nulos empleados:

a) **Obtención de cepas derivadas de H96 y Hm498 carentes de RPL19A o RPL19B:**

- **Construcción de un alelo nulo *rpl19a::KanMX4*:** Utilizando como molde ADN genómico de la cepa Y07156 *Δrpl19a::KanMX4*, se amplificó por PCR con una ADN-polimerasa de alta fidelidad y con los oligonucleótidos *F2L19A(BamHI)* y *R1L19A(SpeI)* (**Tabla III de los Anexos**) un fragmento lineal de ~2100 bp [*PromRPL19A::KanMX4::TermRPL19A*] (**Figura 49 A**). Se utilizó esta construcción en transformación y se seleccionaron transformantes de las cepas indicadas resistentes a Geneticina en placas de YEPD (200 µg/ml G-418). Se seleccionaron unos 15-20 transformantes de cada cepa y se realizaron PCR diagnósticas para verificar el reemplazamiento del gen diana con la construcción por doble recombinación homóloga, usando los oligonucleótidos complementarios al extremo 5' de la ORF de *RPL19A* y a secuencias internas del marcador *KanMX4* (*R6L19A* y *F1KanMX4*). Se seleccionaron 4 clones para los que se corroboró que el cassette con el alelo nulo se había integrado correctamente en el locus *RPL19A*, y dichas cepas se denominaron **Hm624** (H96 *Δrpl19a::KanMX4*) y **Hm625** (Hm498 *Δrpl19a::KanMX4*).

- **Construcción de un alelo nulo *rpl19b::KanMX4*:** Sobre el plásmido pAJ2 [*RPL19B, CEN6 LEU2*] se realizaron cortes con las enzimas de restricción *BglIII* y *SnaBI*, eliminando toda la ORF de *RPL19B* y parte de sus regiones flanqueantes. Por otra parte, a partir del plásmido pFA6a::*KanMX4*, se obtuvo el cassette [*KanMX4*] mediante cortes con las enzimas de restricción *BglIII* y *EcoRV*, que se clonó en los mismos sitios de restricción en el plásmido anterior, obteniendo el plásmido **pAJ6**. Este plásmido contiene la construcción integrativa [*PromRPL19B::KanMX4::TermRPL19B*] de ~2380 bp (**Figura 49 B**). Mediante el uso de las enzimas *SaII* y *SacII* – presentes en el MCS del plásmido – se recupera el alelo nulo completo con el que se transformaron las cepas H96 y Hm498. Al igual que en el caso anterior, se utilizó esta construcción en transformación y se seleccionaron transformantes resistentes a Geneticina en placas de YEPD (200 µg/ml G-418). Se seleccionaron unos 10-15 transformantes de cada cepa y se realizaron PCR diagnósticas para verificar el reemplazamiento del gen diana con la

construcción por doble recombinación homóloga, usando los oligonucleótidos complementarios al extremo 5' y 3' de la ORF de *RPL19B* (*F6L19B* y *R6L19B*) y a secuencias internas del marcador *KanMX4* (*F1KanMX4* y *R1KanMX4*). Se seleccionaron 3 clones para los que se corroboró que el cassette con el alelo nulo se había integrado correctamente en el locus *RPL19B*, y estas cepas se denominaron **Hm585** (H96 $\Delta rpl19b::KanMX4$) y **Hm583** (Hm498 $\Delta rpl19b::KanMX4$).

- **Construcción de un alelo nulo *rpl19b::HISG::URA3::HISG***: En los vectores pAJ1 [*RPL19B*, *CEN6 URA3*] y pAJ2 [*RPL19B*, *CEN6 LEU2*] se realizaron cortes con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Sna*BI obteniéndose los vectores pRS316/pRS315 que contienen secuencias flanqueantes de la ORF de *RPL19B* de 432 bp y 452 bp. A partir del plásmido pD0 [*pRS315::HISG::URA3::HISG*], se obtuvo la construcción lineal de 3864 bp mediante cortes con las enzimas de restricción *Sal*I y *Bam*HI, que se subclonó en cada uno de los dos vectores indicados, obteniéndose los plásmidos **pAJ20** [*pRPL19B::HISG::URA3::HISG::tRPL19B*, *CEN6 URA3*] y **pAJ21** [*pRPL19B::HISG::URA3::HISG::tRPL19B*, *CEN6 LEU2*], de los que se recupera mediante cortes con las enzimas *Sal*I y *Sac*II el alelo nulo [*pRPL19B::HISG::URA3::HISG::tRPL19B*] de ~4,8 Kbp. En este caso, se utilizó esta construcción en transformación de la cepa H96, se seleccionaron transformantes protótrofos para Uracilo en placas de SD his ino y se analizaron por PCR diagnósticas unas 20-25 colonias para verificar el reemplazamiento del gen diana con la construcción por doble recombinación homóloga, usando como cebadores los oligonucleótidos complementarios al extremo 5' y 3' de la ORF de *RPL19B* en el genoma (*F6L19B* y *R6L19B*), así como con oligonucleótidos complementarios a secuencias del gen bacteriano *HISG* (*LHISG* y *RHISG*). En 6 clones se comprobó el reemplazamiento de *RPL19B* por el alelo nulo. Para obtener auxótrofos de Uracilo, se crecieron células de cada cepa en medio rico (YEED), se plaquearon en medio 5-FOA y se seleccionaron clones en los que se produce la evicción del marcador *URA3* por recombinación entre las secuencias repetidas directas de *HISG* con alta frecuencia (Alani *et al.*, 1987), como se comprobó por PCR utilizando los oligonucleótidos *F6L19B* y *R6L19B*. Se seleccionó uno de ellos y se denominó a la cepa **Hm586** (H96 $\Delta rpl19b::HISG$).

- **Construcción de un alelo nulo de *GCN2***: El plásmido p436 (pBR322::*GCN2::HIS3::GCN2*) se digirió con *Bam*HI para recuperar el alelo nulo *GCN2::HIS3::GCN2* con el que se transformaron las cepas BY4741, Y07156 y Y03053. Se seleccionaron transformantes protótrofos para Histidina en placas de SD leu met ile val ura. Se seleccionaron unos 15-20 transformantes de cada cepa y se realizaron PCR diagnósticas para verificar el reemplazamiento de los genes diana con la construcción por doble recombinación homóloga, usando los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' de la ORF de *GCN2* en el genoma (*IFGCN2* y *IRGCN2*), así como con oligonucleótidos internos a la ORF de

HIS3 (*HIS3iF* y *HIS3iR*). Se seleccionaron 3 clones para los que se corroboró que el cassette con el alelo nulo se había integrado correctamente en el locus *GCN2*, obteniendo las cepas **Hm696** *Agcn2::HIS3*, **Hm697** *Arpl19a Agcn2::HIS3* y **Hm698** *Arpl19b Agcn2::HIS3*.

1.2. Bacterias

Para amplificar los plásmidos se empleó rutinariamente la cepa de *Escherichia coli* **DH5 α** (F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-arg F), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* ($r_K^- m_K^+$), *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

Para amplificar las plasmotecas generadas tras la mutagénesis *in vitro* dirigida o al azar, se utilizaron las cepas de *E. coli* de alta eficiencia de transformación proporcionadas por Agilent®: **XL10-GOLD** (*endA1*, *supE44*, *recA1*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lacHte* Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, [F' *proAB lacZ* Δ M15 Tn10 (Tet^R Amy Cam^R)]), y **XL1-BLUE** (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, [F' *proAB lacZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]).

Para la mutagénesis al azar *in vivo* se usó además la cepa de *E. coli* de Agilent® **XL1- RED** (F⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *mutS*, *mutT*, *mutD5*, Tn10), ya que esta cepa tiene las rutas de reparación del ADN dañadas, por lo que se cometen errores en la replicación del ADN con alta frecuencia.

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS EMPELADOS

2.1. Para *Saccharomyces cerevisiae*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas y para la selección de transformantes o el análisis de algún fenotipo de interés, y la composición de los mismos, se describe a continuación:

a) Medios ricos:

- **YEPD:** Extracto de levadura (BD Bacto)1%, bactopectona (Difco) 2%, glucosa 2%.
- **YEP:** Igual pero sin glucosa, para causar privación de glucosa por breves períodos de tiempo.
- **YEPG:** Igual al YEP con galactosa 2% y rafinosa 2% como fuentes de carbono.

- **YPG:** Igual al YEP con glicerol al 3% como fuente de carbono.
- **MB 4.7 (Análisis del fenotipo *Killer*):** YEPD conteniendo 50 ml/L de una solución stock de Na Citrato 2M pH= 4,7 y azul de metileno al 0,6%.

b) Medios mínimos definidos:

- **SD (*Standard Dextrose*):** Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico (YNB-AA-AS) (DB Difco) 0,145%, sulfato de amonio al 0,5%, glucosa al 2%.
- **SG (*Standard Galactose*):** Igual al anterior, excepto que lleva galactosa al 2% y rafinosa al 2% como fuentes de carbono en lugar de glucosa. La galactosa se emplea como inductor de la expresión de genes con promotores *GALI* o *GALI0* y la rafinosa como fuente de carbono adicional, en ausencia de glucosa, para evitar el agotamiento del inductor durante el crecimiento de las levaduras.
- **SC (*Standard Complete*):** Su composición es la del SD y lleva, además, una mezcla de suplementos nutricionales al 0,2%, como los L-aminoácidos proteinógenos y algunas bases nitrogenadas, en su caso. Algunas mezclas se preparan sin ciertos suplementos para garantizar el mantenimiento de plásmidos con diferentes marcadores y seleccionar los correspondientes transformantes protótrofos o para seleccionar algunos diploides con auxotrofías complementarias (**Tabla 18**).

En la Memoria, cuando se añade el símbolo (+) a los medios (ej: **SD**⁺) significa que lleva todos los suplementos nutricionales necesarios para el crecimiento de una cepas con varias auxotrofías y carece de aquel cuya auxotrofia complementa el correspondiente marcador de selección presente en un plásmido o construcción integrativa.

Adenina	0,5 g	Leucina	10,0 g
Alanina	2,0 g	Lisina	2,0 g
Arginina	2,0 g	Metionina	2,0 g
Asparragina	2,0 g	Ácido <i>para</i> -aminobenzoico	0,2 g
Ácido aspártico	2,0 g	Fenilalanina	2,0 g
Cisteína	2,0 g	Prolina	2,0 g
Glutamina	2,0 g	Serina	2,0 g
Ácido glutámico	2,0 g	Treonina	2,0 g
Glicina	2,0 g	Triptófano	2,0 g
Histidina	2,0 g	Tirosina	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracilo	2,0 g
Isoleucina	2,0 g	Valina	2,0 g

Tabla 18. Suplementos nutricionales empleados para medios definidos y sus concentraciones por litro de medio.

Los medios que contienen componentes adicionales para el análisis fenotípico de levaduras fueron:

- **3-AT (3-amino-triazol):** YNB-AA-AS (BD Difco) 0,145%, sulfato de amonio 0,5%, mezcla de suplementos (-Histidina) 0,2%, leucina 0,525%, 3-amino-1,2,4-triazole (Sigma-Aldrich) 0,252%, glucosa 2%.
- **5-MT (5-metil-triptófano):** YNB-AA-AS (BD Difco) 0,145%, prolina 0,1%, glucosa 2%, 5-methyl-DL-tryptophan (Sigma-Aldrich) 0,0109%.
- **5-FOA:** YNB-AA-AS (BD Difco) 0,145%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 2%, 10 ml/L uracilo de una solución stock 20mM, suplementado con 0,1% de 5-fluoroorotic acid monohydrate (Apollo scientific).
- **X-GAL:** YNB-AA-AS (BD Difco) 0,145%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 0,1%, M63 al 1% (compuesto por KH_2PO_4 0,1M, sulfato de amonio 1,5 μM , sulfato de hierro heptahidratado 1,7 μM , sulfato de magnesio heptahidratado 0,1M) y suplementado con 5ml/L de una solución stock de X-GAL 4 mg / ml (disuelto en N-N-dimetil formamida).

Todos estos medios se preparan con Agua milliRO, se autoclavan y se conservan a temperatura ambiente.

c) **Medios sólidos:**

La composición de los medios sólidos es idéntica a la descrita más arriba, pero se les añade agar-agar (DIFCO) al 2% antes de ser autoclavados. Las placas se conservaron siempre a 4°C.

d) **Suplementos y aditivos:**

Los más habituales y sus concentraciones son:

- **Histidina 100 mM:** 3 ml / L ó 0,1 ml / placa.
- **Isoleucina/Valina 50 mM:** 10 ml / L ó 0,2 ml / placa.
- **Leucina 100 mM:** 20 ml / L ó 0,2 ml / placa.
- **Metionina 100 mM:** 10 ml / L ó 0,15 ml / placa.
- **Uracilo 20 mM:** 10 ml / L ó 0,25 ml / placa.
- **Inositol 200mM:** 1 ml / L ó 0,1 ml / placa.
- **Geneticina:** 100 mg/ml (**G-418 sulphate**).

Antibióticos que afectan a la **actividad peptidil-transferasa** de la subunidad 60S del ribosoma:

- **Anisomicina:** 15 µg /ml (disuelta en Agua MiliQ). Se une al ARNr 25S y compite con el extremo 3'aceptor del aa-ARNt, por lo que disminuye su afinidad para unirse al **sitio A** del ribosoma, inhibiendo la **actividad peptidil-transferasa** (Grollman, 1967; Hansen *et al.*, 2003; Rhodin *et al.*, 2011).

Antibióticos que afectan a la **función descodificadora en el sitio A** de la subunidad 40S del ribosoma y causan defectos en la **fidelidad** de la traducción:

- **Higromicina B:** 100 µg /ml (disuelta en Agua MiliQ). Es un aminoglicósido que induce a errores de lectura del mensaje genético al distorsionar el **centro descodificador** de la 40S. Además, inhibe la **translocación** del aminoacil-ARNt (aa-ARNt) en el sitio A durante la elongación (Cabañas *et al.*, 1978; González *et al.*, 1978; Hausner *et al.*, 1988).
- **Neomicina:** 500 µg /ml (disuelta en Agua MiliQ). Antibiótico aminoglicósido que produce errores de lectura en el **centro de descodificación** y modifica los puentes entre subunidades que permiten el movimiento de rotación durante la elongación, por

lo que también impide la translocación. Por tanto, inhibe tanto la **iniciación** como la **elongación** de la traducción (Zhao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012).

- **Paromomicina**: 500 µg /ml (disuelta en Agua MiliQ). Aminoglicósido que estabiliza la unión de ARNt erróneos en el **centro descodificador**, produciendo defectos tanto en **iniciación** como en **elongación** de la traducción (Carter *et al.*, 2000; Ogle *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2003; Rhodin *et al.*, 2011).

Todos estos compuestos se esterilizaron por filtración utilizando filtros de fibra de vidrio combinados con filtros de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro. Se conservaron a 4°C los aminoácidos y a -20°C los antibióticos.

e) Condiciones de crecimiento:

Para realizar los diferentes experimentos, tanto en medio líquido como en medio sólido, se incubaron las cepas a diferentes temperaturas, concretamente a 16°C, 18°C, 25°C, 28°C, 32°C y 37°C. Además, los cultivos en medio líquido, se incubaron con agitación orbital constante de 250 rpm. Para valorar el crecimiento de las cepas, se midió la turbidez de alícuotas de los cultivos a 600 nm con un espectrofotómetro monocromador. Se trabajó siempre con células de cultivos en fase exponencial temprana (DO 600nm ~ 0,6-0,8), salvo que se especifique lo contrario.

2.2. Para *Escherichia coli*

Los medios utilizados en el caso de *E. coli* fueron:

- **2XYT**: Bactopeptona (Difco) 1,6%, extracto de levadura (BD Bacto) 1%, NaCl 1%, pH 7.2- 7.4 (se ajusta con NaOH).
- **LB (*Luria-Bertani*)**: Bactotripton (Difco) 2%, extracto de levadura 1%, NaCl 1%.
- **SOC**: Tripton (Difco) 2%, extracto de levadura (BD Bacto) 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, Mg₂Cl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20mM.

Todos estos medios se prepararon con agua MilliRO. Se autoclavan y se conservan a temperatura ambiente.

Para seleccionar clones bacterianos transformados con plásmidos con el marcador de resistencia a ampicilina (Amp^R) se empleó **ampicilina sódica** a una concentración de entre 50-100 µg/ml.

Para la clonación de fragmentos de ADN en vectores cuyo sitio múltiple de clonación (MCS) está dentro de la secuencia de la β-galactosidasa de *E.coli* (en fase), para diferenciar plásmidos con inserto que rompen la fase de lectura, se añadió a las placas de LB/Amp 20 µl de **IPTG** (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) al 20% disuelto en agua y 100 µl de una solución de **X-GAL** al 2% (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactopiranosido) disuelto en N-N-dimetilformamida (Sambrook and Russell, 2001).

a) Condiciones de crecimiento:

Los cultivos de *E.coli* se incubaron siempre a 37°C y los cultivos en medio líquido se incubaron en un agitador orbital a 250 rpm.

3. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Vectores empleados

Para la clonación de secuencias específicas de ADN se emplearon vectores bacterianos (origen de replicación relajada colE1) y vectores *shuttle* con capacidad de replicación en *E.coli* y en *S. cerevisiae* (contienen secuencias de replicación autónoma, ARS).

a) Vectores bacterianos:

- **pBR322**: vector bacteriano de 4,3 Kbp con marcadores de resistencia a ampicilina (Amp^R) y a tetraciclina (Tet^R), y el origen de replicación relajada colE1 (Balbas *et al.*, 1986).
- **pUC19**: vector bacteriano de 2,7 Kbp con los marcadores anteriores y un fragmento del operón *LacZ* de *E.coli* que codifica la enzima β-galactosidasa (Norrander *et al.*, 1983).
- **Bluescript SK+**: vector bacteriano de 3,0 Kbp con las características del anterior (comercializado por Stratagene®).

- **pGEM-T**: ADN plasmídico preparado por digestión con EcoRV y con timidinas añadidas en los extremos 3' terminales utilizado para clonar productos obtenidos de reacciones de PCR con una Taq-ADN-polimerasa (comercializado por Promega).

b) Vectores bifuncionales en bacteria y levadura o shuttle vectors:

- **YCp50**: deriva de pBR322 y contiene el marcador selectivo URA3, el origen de replicación *ARS1* y el centrómero del cromosoma IV (*CEN4*) de *S. cerevisiae*, lo que le confiere capacidad de replicación autónoma y estabilidad mitótica y meiótica en bajo número de copias (Johnston and Davis, 1984).
- **YCplac**: es una serie de vectores que derivan de pUC19 y contienen el origen de replicación *ARS1* y el centrómero del cromosoma IV (*CEN4*) de *S. cerevisiae* (Gietz and Sugino, 1988). En este trabajo se han utilizado **YCplac33** e **YCplac111** con *URA3* y *LEU2* como marcadores de selección en levaduras, respectivamente.
- **YEplac195**: vector autorreplicativo multicopia que no porta secuencias centroméricas (Gietz and Sugino, 1988). Deriva de pUC19. Contiene el marcador de selección *URA3* y una secuencia de replicación procedente del plásmido de 2 micras (2 μ m) de *S. cerevisiae*.
- **Serie pRS**: son vectores que derivan del Bluescript SK⁺ y contienen el centrómero del cromosoma VI (*CEN6*) de *S. cerevisiae* (Sikorski and Hieter, 1989). En este trabajo se han utilizado **pRS316** (*CEN6 URA3*) y **pRS315** (*CEN6 LEU2*).

3.2. Plásmidos

En la **Tabla II de los Anexos** se detallan los plásmidos construidos en este trabajo y a continuación se describe la estrategia seguida en cada caso:

a) Clonación de alelos de *RPL19* en plásmidos centroméricos:

1) Amplificación y clonación de un alelo WT funcional de *RPL19B*: Este gen se amplificó por PCR usando como molde ADN genómico de la cepa Y07156 (*Arpl19a::KanMX4*), una ADN-polimerasa de alta fidelidad y como cebadores los oligonucleótidos *F1L19B-Sall* y *R1L19B-SacII* (**Tabla III de los Anexos**). La construcción lineal de 1929 bp [*PromRPL19B::RPL19B::TermRPL19B*], amplificada de esta forma, contiene la ORF completa de *RPL19B* junto a secuencias adyacentes en 5' suficientes para la promoción de la transcripción (*Prom*, desde la posición -430 en 5' hasta el ATG de *RPL19B*) así como a secuencias en 3' que contienen la secuencia de poli-adenilación del ARNm (TATATA) y que promueven o facilitan la terminación de la transcripción (*Term*, desde el codón de

terminación TAA de *RPL19B* hasta la posición +450 desde el mismo). La construcción contiene secuencias en sus extremos para las endonucleasas de restricción *SalI* y *SacII* para su clonación en los mismos sitios de los vectores pRS315 (*CEN6 LEU2*) y pRS316 (*CEN6 URA3*), obteniendo los plásmidos **pAJ1** (*RPL19B, CEN6 URA3*) y **pAJ2** (*RPL19B, CEN6 LEU2*) (**Figura 21 A**).

2) Amplificación y clonación de un alelo WT funcional de *RPL19B* sin intrón (*RPL19B_{Δi}*): Se amplificó por PCR una secuencia lineal de 670 bp [*PromRPL19B::RPL19B_{Δi}::TermRPL19B*] con los oligonucleótidos *FIL19B(Clón-Int)* y *RIL19B(Clón-Int)* que contienen en sus extremos secuencias diana para las enzimas de restricción *BglIII* y *SnaBI*. Esta construcción contiene: (i) la secuencia codificante de *RPL19B* u ORF, (ii) parte del promotor en 5' (desde la posición -39 hasta el ATG, +1), (iii) parte de la secuencia de terminación (hasta +52 desde el codón de terminación TAA). Para la reacción de PCR se usó una ADN-polimerasa de alta fidelidad, como molde la secuencia de *RPL19B* clonada en el plásmido pAJ1 [*RPL19B, CEN6 URA3*] y como cebadores los oligonucleótidos *FIL19B(Clón-Int)* y *RIL19B(Clón-Int)*. El oligonucleótido *FIL19B(Clón-Int)* posee la secuencia diana de la enzima *BglIII* en su extremo 5', seguida de 47 nt (que van desde *BglIII* hasta el ATG) + el Exón 1 (AT) y + 30 nt del extremo 5' del Exón 2 (**Tabla III de los Anexos**). Este oligonucleótido permite el inicio de la síntesis del ADN desde el Exón 2 sin que se amplifique el intrón (ya que en *RPL19B* el exón 1 tan sólo posee 2 nt y el intrón se encuentra a partir del nt 3). Por otra parte, el oligonucleótido *RIL19B(Clón-Int)* posee en 5' las secuencias diana para la enzima *SnaBI* (esto permite clonar la secuencia amplificada sin ningún nucleótido adicional para regenerar *Prom* y *Term* completos, véase más adelante). Los plásmidos centroméricos pAJ1 (*URA3*) y pAJ2 (*LEU2*) se digirieron con las enzimas de restricción *BglIII* y *SnaBI* (eliminándose así la ORF de *RPL19B* y las secuencias adyacentes de 39 nt, desde el ATG hasta *BglIII*, y de 52 nt desde el TAA hasta *SnaBI*). El alelo *RPL19B_{Δi}* se clonó en estas posiciones, obteniéndose los plásmidos centroméricos **pAJ3** (*RPL19B_{Δi}, CEN6 URA3*) y **pAJ4** (*RPL19B_{Δi}, CEN6 LEU2*) (**Figura 21 B**).

3) Amplificación y clonación de un alelo WT funcional de *RPL19A*: Se amplificó por PCR un alelo funcional de *RPL19A* usando una ADN-polimerasa de alta fidelidad, como molde ADN genómico de la cepa Y03053 (*Δrpl19b::KanMX4*) y como cebadores los oligonucleótidos *FIL19A-BamHI* y *RIL19A-SpeI*. Se amplificó así un fragmento de ADN de 2200 bp [*PromRPL19A::RPL19A::TermRPL19A*] que contiene la ORF completa de *RPL19A* además de secuencias adyacentes en 5' suficientes para la promoción de la transcripción (*Prom*, desde la posición -936 en 5' hasta el ATG de *RPL19A*) así como a secuencias en 3' que contienen la secuencia de poli-adenilación del ARNm (TATATA) y que promueven o facilitan la terminación de la transcripción (*Term*, desde el codón de terminación TAA de *RPL19B* hasta la

posición +191 desde el mismo). La construcción contiene secuencias en sus extremos para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Spe*I para su clonación en los mismos sitios de los vectores centroméricos pRS315 y pRS316, obteniéndose respectivamente los plásmidos **pAJ8** (*RPL19A*, *CEN6 LEU2*) y **pAJ9** (*RPL19A*, *CEN6 URA3*) (**Figura 22**).

4) Amplificación y clonación de alelos mutantes de expresión condicional *pGAL::rpl19bΔCT*: Se amplificaron por PCR alelos funcionales de *rpl19bΔCT* usando una ADN-polimerasa de alta fidelidad, como molde los plásmidos **pAJ3** (*RPL19B_{Δi}*), **pAJ10** (*rpl19bΔ32*), **pAJ11** (*rpl19bΔ27*), **pAJ12** (*rpl19bΔ22*) y **pAJ26** (*rpl19bΔ39*), que contienen las secuencias de interés, y como cebadores los oligonucleótidos O1432-*Bam*HI (que posee la secuencia diana de la enzima *Bam*HI en su extremo 5', seguida del Exón 1 (AT) y 17 nt del Exón 2 de *RPL19B*) y O1397-*Pst*I (posee la secuencia diana de la enzima *Pst*I en su extremo 5' seguida del *Term* desde el codón de terminación TAA de *RPL19B* hasta la posición +280 desde el mismo) (**Tabla III de los Anexos**). Por otra parte, los plásmidos centroméricos **TK884** [*pGAL::RPL19B*, *CEN4 LEU2*] y **TK891** [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 URA3*] se digirieron con las mismas enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I (eliminandose así las ORF de *RPL19B* y *RPL19B_{Δi}* y las secuencias adyacentes de 280 nt desde el TAA hasta *Pst*I), donde se clonaron los alelos anteriores, obteniéndose los plásmidos centroméricos [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 LEU2*] y [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 URA3*] (**Figura 39**).

5) Amplificación y clonación de alelos mutantes *pS28::FLAG::rpl19bΔCT*: Se clonaron los alelos mutantes de truncación *rpl19bΔCT* en fase unidos a un epítipo FLAG en el extremo N-terminal de *RPL19B_{Δi}*. Para ello, primero se utilizó el vector TK349 [*YEplac195::pS28::short-FLAG::RPL16B*, *URA3*], y como insertos los fragmentos de ADN de 850 bp [*rpl19bΔCT::TermRPL19B*] obtenidos al digerir los plásmidos [*pGAL::rpl19bΔCT*, *CEN4 LEU2*] con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I. Se obtuvieron así los plásmidos [*pS28::FLAG::rpl19bΔCT*, *2μM LEU2*]. Después, estos plásmidos se digirieron con las enzimas *Eco*RI y *Pst*I, obteniendo los insertos *pS28::FLAG::rpl19bΔCT* que posteriormente se subclonaron en el vector TK884 [*pGAL::RPL19B_{Δi}*, *CEN4 LEU2*] digerido con las mismas enzimas, obteniendo finalmente los plásmidos [*pS28::FLAG::rpl19bΔCT*, *CEN4 LEU2*] (**Figura 89**).

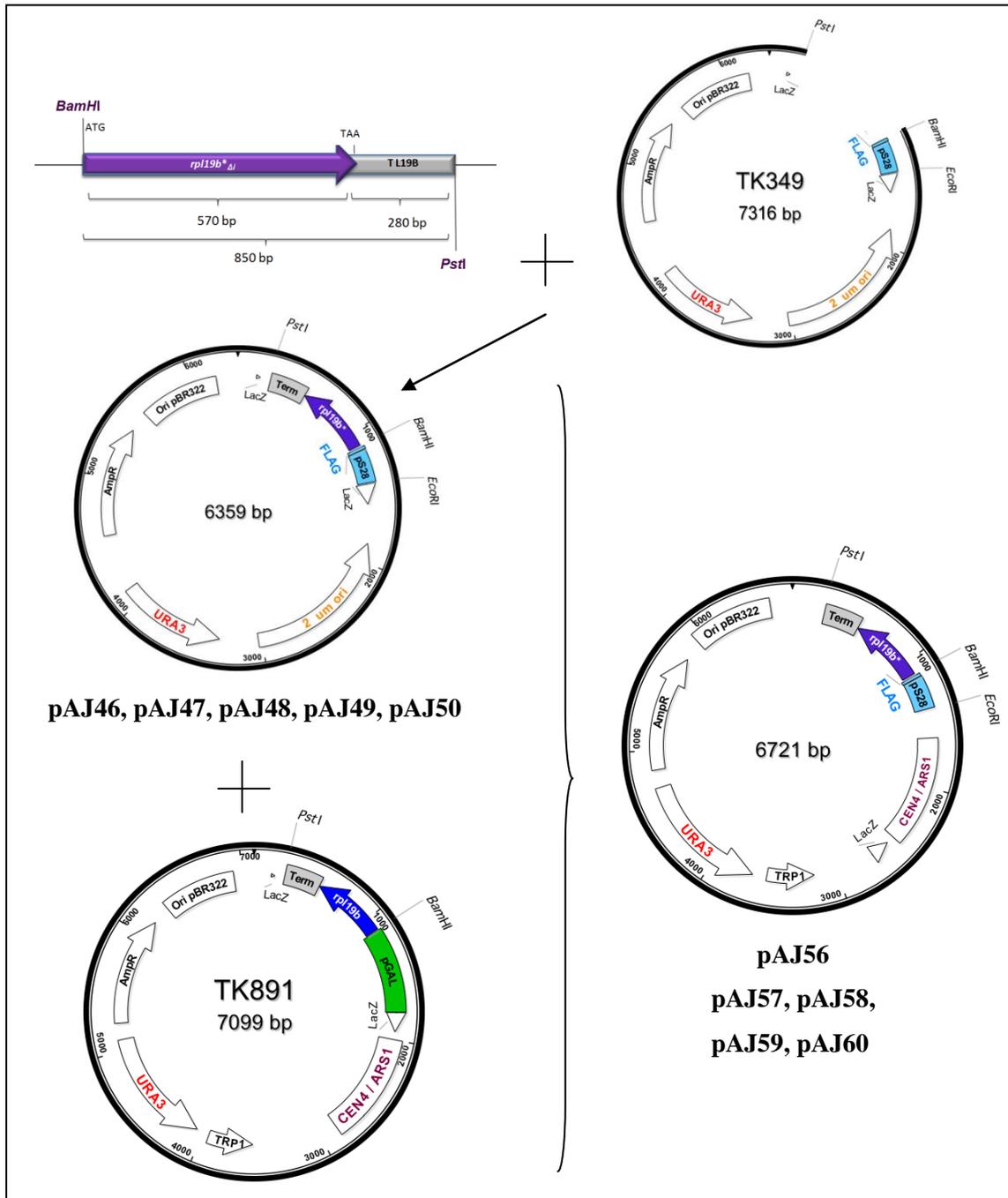


Figura 89. Esquema de la construcción de plásmidos con alelos de sobreexpresión marcados con un epítipo antigénico *pS28::FLAG::rpl19bACT*. Esquema de amplificación de las ORF de alelos mutantes *rpl19bACT*; mapa de los vectores TK349 ($2\mu M$ URA3) y TK891(CEN4URA3); plásmidos resultantes que contienen alelos de los mutantes indicados: pAJ46 (*RPL19B_{Δi}*), pAJ47 (*rpl19b Δ39*), pAJ48 (*rpl19b Δ32*), pAJ49 (*rpl19b Δ27*) y pAJ50 (*rpl19b Δ22*) (*pS28::FLAG::rpl19bACT*, $2\mu M$ URA3); y pAJ56 (*RPL19B_{Δi}*), pAJ57 (*rpl19b Δ39*), pAJ58 (*rpl19b Δ32*), pAJ59 (*rpl19b Δ27*) y pAJ60 (*rpl19b Δ22*) (*pS28::FLAG::rpl19bACT*, CEN4 URA3).

3.3. Técnicas de transformación de levaduras y de recuperación y purificación de plásmidos

a) Transformación de *S. cerevisiae*:

La transformación de *S. cerevisiae* se llevó a cabo según el procedimiento descrito por (Gietz *et al.*, 1995), que emplea acetato de litio para permeabilizar células intactas y hacerlas competentes para la transformación genética con ADN clonado, y permite obtener eficiencias de transformación de hasta 22 millones de transformantes por µg de DNA plasmídico.

Para obtener células competentes de levadura, se recogieron muestras de cultivos en fase exponencial (DO_{600nm} de 0-6-0,8) en medio mínimo definido (SD) suplementado con los aminoácidos necesarios, o en medio rico (YEPD). Las cantidades de ADN clonado utilizadas para la transformación oscilaban entre 500 ng y 1 µg si se trataba de ADN plasmídico, y entre 200 y 500 ng si se trataba de un fragmento lineal de ADN. Para la selección de los transformantes las células se plaquearon en medio SD suplementado con los requerimientos nutricionales de cada cepa excepto los de la auxotrofia que complementa el marcador de cada plásmido. En el caso de la selección para la resistencia a Geneticina, las células se incubaron 3 horas en YEPD a 28°C en agitación, previamente a extenderlas en medio YEPD con el antibiótico. Las células transformadas se incubaron a 28°C durante 2-3 días.

b) Recuperación de plásmidos de transformantes de levadura:

Para recuperar los plásmidos o las genotecas mutantes (plasmotecas) que portaban los distintos transformantes de *S. cerevisiae* se utilizó la técnica de *Yeast Plasmid Release* descrita por (Filetici *et al.*, 1985). La **purificación del ADN** total de *S. cerevisiae* se llevó a cabo según el procedimiento descrito por (Philippsen *et al.*, 1991) o por (Hoffman and Winston, 1987), y se **transformaron células competentes** de la cepa de *E. coli* DH5α, siguiendo el protocolo diseñado por (Hanahan, 1983). Para recuperar las colecciones de plásmidos o plasmotecas, donde la eficiencia de transformación es más crítica, se emplearon células de *E. coli* XL10-GOLD de alta eficiencia (10^8 colonias por µg de ADN).

c) Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*:

Las preparaciones rápidas a pequeña escala de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* se realizaron mediante el procedimiento descrito por (Holmes and Quigley, 1981). Para obtener preparaciones de ADN plasmídico sin ARN ni proteínas se emplearon las columnas

comerciales Nucleospin® *Plasmid* de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4. Técnicas de manipulación del ADN

a) Reacciones enzimáticas:

Los diversos tratamientos enzimáticos a los que se sometió el ADN se realizaron según los procedimientos generales descritos por (Sambrook and Russell, 2001) y teniendo en cuenta en cada caso las recomendaciones de las diferentes casas que los comercializan. Entre las modificaciones enzimáticas realizadas se encuentran:

- **Digestión con enzimas de restricción:** Se realiza de forma rutinaria para la caracterización física de los fragmentos de ADN, así como para la construcción de moléculas recombinantes. En la mayoría de los casos, las enzimas utilizadas pertenecen a la casa comercial Fermentas o Promega. Las soluciones tampón empleadas y la temperatura a la que se realizaron las digestiones fueron en cada caso las recomendadas por el fabricante.
- **Ligación:** Se utilizó la ligasa del fago T4 de Fermentas para la inserción de fragmentos de ADN en diferentes vectores.
- **Reacciones de Desfosforilación:** La eliminación del grupo fosfato en 5' se llevó a cabo mediante la fosfatasa alcalina de gamba *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), de Fermentas, en los casos en los que el vector poseía extremos compatibles o romos, para evitar la autoligación.
- **Extremos romos:** Para la creación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5', se empleó el fragmento largo de la ADN polimerasa de *E. coli* *Klenow Fragment*, de Fermentas.

b) Análisis y purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa:

El **análisis de los fragmentos de ADN** obtenidos por tratamiento con endonucleasas de restricción o purificados por diversos medios, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarosa D-1, Pronadisa) cuya concentración variaba entre el 0,5% y el 1,5% (p/v), según el tamaño de los fragmentos de ADN esperados. Los geles se prepararon con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-7,8) y se añadió el agente intercalante

bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. A las muestras se les añadió tampón de carga 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen-cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)). El mismo tampón TAE 1X se empleó para el desarrollo de la electroforesis, que se realizó a un voltaje constante de 50-120V. Para la visualización del ADN se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

La **purificación de fragmentos de ADN** de interés para posteriores técnicas (subclonación, transformación, marcaje de sondas, etc.) se realizó, después de su separación en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Gibco BRL/ Life technologies), utilizando las soluciones y columnas del sistema Nucleospin® *Gel & PCR Clean up* de Macherey-Nagel.

En algunos casos posteriormente se **precipitó el ADN** añadiendo a la solución de partida 1/10 del volumen de muestra de NaCl 2.5 M y 2 volúmenes de etanol 96% a - 20° C. Se centrifuga y se añade 1 mL de etanol 70%. Nuevamente se centrifuga y se retira el etanol. Se deja secar el precipitado y se resuspende en el volumen deseado de agua o TE.

c) Amplificación de secuencias de ADN por PCR (*Polymerase Chain Reaction*):

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron PCR para:

- Amplificación de las ORFs de *RPL19A*, *RPL19B*, *RPL19B_{Δi}* y *rpl19b*_{Δb}* así como del alelo nulo *rpl19a::KanMX4*, para su posterior clonación en plásmidos centroméricos.

- Comprobación de que las distintas inserciones o integraciones de fragmentos de ADN habían tenido lugar en los loci adecuados del genoma de *S. cerevisiae*: disrupciones génicas de los loci *RPL19A*, *RPL19B* y *GCN2* en distintas cepas.

- Generación del alelo nulo *rpl19a::KanMX4*.

- Ensayos de mutagénesis al azar y dirigida.

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN se utilizó un termociclador T (Biometra) y se siguió el protocolo general descrito por (Sambrook and Russell, 2001), pero teniendo en cuenta las recomendaciones hechas por cada fabricante, en función de la ADN-polimerasa utilizada en cada caso. Además, dependiendo de la temperatura de anillamiento (T_m) de los oligonucleótidos empleados así como de los reactivos utilizados y del tamaño del producto esperado, se realizaron modificaciones sobre el protocolo estándar de reacción para obtener una mayor eficiencia en la amplificación del sustrato:

- Desnaturalización inicial: 10 minutos a 94 °C.
- 20-30 ciclos de:
 - Desnaturalización del ADN: 1 minuto a 94°C
 - Anillamiento: 1 minuto a 55°C (3-4°C por debajo de la T_m de los oligonucleótidos)
 - Extensión: 1 a 7 minutos a 72°C
- Extensión final: 10 minutos a 72°C

Las enzimas utilizadas fueron *Taq-DNA Polymerase* (Biotools) de manera rutinaria, *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) para la amplificación de alta fidelidad cuando el producto obtenido por PCR iba a ser secuenciado o utilizado con posterioridad y *PfuUltra Hi-Fi DNA polymerase* (Agilent®), en los ensayos de mutagénesis al azar y dirigida.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde plásmidos (10-50 ng), fragmentos lineales de ADN (10-20 ng), ADN genómico (1-10 ng) o colonias aisladas de *S. cerevisiae* resuspendidas en 10 µl de agua MilliQ estéril y 50 µl de NaOH 20mM, y calentando la mezcla a 94°C durante 10 minutos, antes de preparar la reacción.

Se utilizaron parejas de oligonucleótidos en una concentración final de 50 µM y se usó una mezcla de los 4 dideoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche) en una concentración final 50 µM cada uno.

Para purificar los fragmentos de ADN resultantes se utilizaron los reactivos y columnas proporcionados en el Kit Nucleospin® *Gel & PCR Clean up* de Macherey-Nagel.

d) Mutagénesis al azar:

Para obtener alelos mutantes de *RPL19B*, se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes de mutagénesis al azar, *in vivo* e *in vitro*.

- Mutagénesis al azar *in vitro*:

Para realizar la mutagénesis al azar *in vitro*, se utilizó el sistema “**GeneMorph II EZ-Clone Domain Mutagenesis Kit**” de Agilent®, que permite generar transiciones y transversiones de las diferentes bases nitrogenadas con una frecuencia similar. Para ello, se utilizaron las enzimas, reactivos y células competentes suministradas por el Kit y se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones del Kit:

- Mediante una PCR con la enzima de baja fidelidad (*Mutazyme II ADN-polimerasa*) se obtiene un conjunto de moléculas mutantes, las cuales se utilizan como cebador para amplificar un plásmido completo mediante PCR con una ADN-polimerasa de alta fidelidad (*PfuUltra Hi-Fi DNA polymerase*). Para eliminar el ADN molde se trata el producto de PCR con la enzima de restricción **DpnI**, una endonucleasa cuya secuencia diana es 5'-Gm⁶ATC-3', por lo que digiere específicamente el ADN metilado y hemimetilado. Tras eso, con los vectores resultantes, se transforman las células competentes de *E.coli* **XL10-GOLD**, obteniendo así una **genoteca** de plásmidos mutados.

- Para purificar el ADN de la genoteca, se recogieron colonias de las células obtenidas tras la transformación de *E.coli* con un raspador y añadiendo medio LB/Amp a las placas, y se extrajo el ADN plasmídico, obteniendo una plasmoteca con la que se transforma la cepa hospedadora de *S. cerevisiae*.

Para optimizar la frecuencia de mutación, se varió la cantidad de ADN molde (cuanto mayor cantidad de ADN molde se utilice, mayor número de mutaciones) y el número de ciclos de amplificación por PCR (cuanto mayor sea el número de ciclos, mayor será el número de mutaciones) con la enzima de baja fidelidad del Kit (*Mutazyme II ADN-polimerasa*).

- **Mutagénesis al azar *in vivo*:**

Para la mutagénesis *in vivo*, se transformaron con el plásmido pAJ3 (que usamos como molde) células competentes de *E.coli* **XL1-RED** proporcionadas por Agilent®, que tienen una tasa de mutación unas 5000 veces mayor que una cepa WT, ya que tienen dañadas tres rutas de reparación del ADN al portar las mutaciones *mutS*, que produce un déficit en la reparación de errores en la amplificación del ADN, *mutD*, que conlleva una disminución de la actividad 3'-5' exonucleasa de la ADN polimerasa III, y *mutT*, que hace que la célula sea incapaz de hidrolizar el 8-oxo-dGTP, un producto resultante de la modificación oxidativa del dGTP, y causaría cambios de AT por CG.

Para optimizar la frecuencia de mutación, se varió el número de duplicaciones que sufría el ADN (número de generaciones) variando el tiempo de incubación de las cepas XL1-RED.

Tras la transformación, se recogen las colonias con 10⁹ células cada una obtenidas de *E.coli* con un raspador y añadiendo medio LB/Amp a las placas, y se extrae el ADN plasmídico, obteniendo una genoteca de plásmidos con la que se transforma la cepa hospedadora de *S.cerevisiae*. Estos plásmidos además de portar el alelo de interés mutado, pueden albergar mutaciones en diferentes zonas de su secuencia, por lo que tras seleccionar los plásmidos

mutados más interesantes, se realiza la subclonación del alelo mutado en un vector WT, con el que finalmente se re-transforma la cepa hospedadora de *S. cerevisiae* para comprobar si el fenotipo que produce es idéntico al del plásmido original.

e) **Mutagénesis Dirigida:**

Para poder generar mutaciones puntuales únicas en la ORF de *RPL19B*, se llevaron a cabo varios ensayos de mutagénesis dirigida *in vitro*. Para ello se utilizaron las enzimas, reactivos y células competentes suministrados por el Kit “**QuickChange Lighting**” de Agilent®, siguiéndose el protocolo descrito en el manual de instrucciones del Kit:

- Mediante una PCR con una enzima ADN-polimerasa de alta fidelidad (*PfuUltra Hi-Fi DNA polymerase*), usando un plásmido molde y parejas de oligonucleótidos que sustituyan los nucleótidos correspondientes en cada caso para generar los cambios en la secuencia de aminoácidos (**Tabla III de los Anexos**), se obtiene un plásmido con un alelo que portará la mutación de interés.

- Al igual que en el caso de la mutagénesis al azar *in vitro*, el producto de PCR se trató con la enzima de restricción *DpnI*, obteniendo así únicamente los plásmidos mutados [*rpl19b*_{Δi}*, *CEN6 URA3*]. Tras esto, se purificaron los plásmidos con los que se transformaron células competentes de *E.coli XL10-GOLD*. Las células se plaquearon en medio selectivo con ampicilina y se obtuvieron plásmidos *CEN6 URA3* que portaban el alelo *rpl19b*_{Δi}* con la mutación deseada, y con los que se transformó la cepa hospedadora adecuada.

f) **Secuenciación de ADN:**

La determinación de la secuencia nucleotídica de los distintos fragmentos de ADN fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación automática de ADN de la Universidad de Salamanca mediante el uso del secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems), para lo que se proporcionó 8 µl de mezcla compuesta por 50-150 ng del ADN de interés y 3 pmoles del oligonucleótido adecuado en cada caso.

Entre otros, se secuenciaron (los oligonucleótidos utilizados se especifican en la **Tabla III de los Anexos**):

-Los plásmidos pAJ portadores de alelos *RPL19A*, *RPL19B* y *RPL19B_{Δi}* generados por PCR para determinar su correcta amplificación mediante la comparación de las secuencias con las bases de datos del genoma de *S. cerevisiae*. Se utilizaron los oligonucleótidos complementarios a sus secuencias *F1L19A*, *F2L19A*, *F3L19A*, *F4L19A*, *R1L19A*, *R2L19A*,

R3L19A y *R4L19A* (para *RPL19A*), *F1L19B*, *F2L19B*, *F3L19B*, *F4L19B*, *R1L19B*, *R2L19B*, *R3L19B* y *R4L19B* (para *RPL19B*), y *F3L19B*, *F5L19B*, *R1L19B*, *R2L19B*, *R5L19B* (para *RPL19B_{Δi}*).

- Los alelos *rpl19b*_{Δi}* de los plásmidos obtenidos por **mutagénesis al azar** para comprobar qué mutaciones portaban los alelos *RPL19B_{Δi}*. Se utilizaron los oligonucleótidos *F5L19B* y *R5L19B*.

- Los alelos *rpl19b*_{Δi}* contenidos en plásmidos obtenidos por **mutagénesis dirigida**, para verificar qué, efectivamente, se habían producido las mutaciones deseadas en *RPL19B_{Δi}*. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos *F5L19B* y *R5L19B*.

- Los nuevos plásmidos pAJ generados portadores de alelos mutantes *pGAL::rpl19bΔACT* y *pS28::FLAG::RPL19BΔACT* para asegurarnos de su correcta clonación. Se utilizaron los oligonucleótidos *F5L19B* y *R5L19B*.

- Los **alelos nulos** de *RPL19A* y *RPL19B* generados por PCR para corroborar su correcta amplificación, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos *R6L19A* y *F1KanMX4* (para verificar *rpl19a::KanMX4*), *F6L19B*, *R6L19B*, *F1KanMX4* y *R1KanMX4* (para *rpl19b::KanMX4*), *F6L19B*, *R6L19B*, *LHISG* y *RHISG* (para *rpl19b::HISG*), y *1FGCN2*, *1RGCN2*, *HIS3iF* y *HIS3iR* (para *gcn2::HIS3*).

g) Oligonucleótidos empleados en distintas reacciones de PCR y secuenciación del ADN:

En la **Figura 90** (y **Tabla III de los Anexos**) se especifican los oligonucleótidos empleados así como su secuencia en dirección 5' → 3', su posición con respecto al primer nucleótido de la secuencia codificadora y se subrayan los sitios de corte para diversas enzimas de restricción que se añadieron en algunos casos.

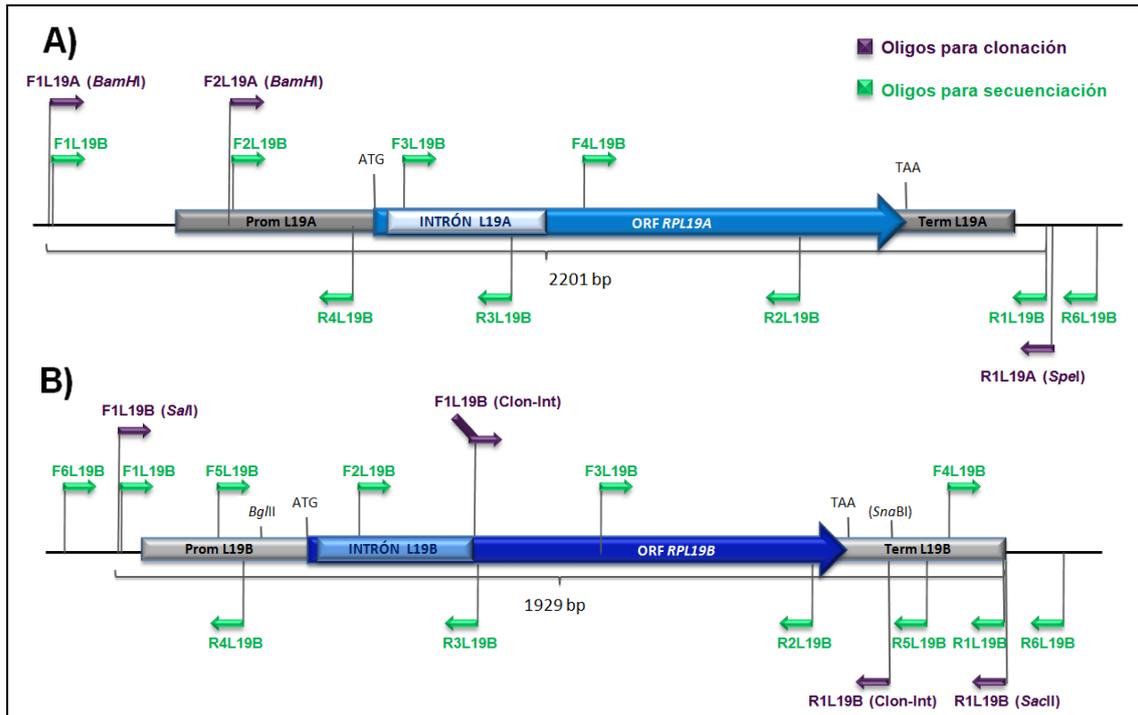


Figura 90. Esquema de la posición de los oligonucleótidos a lo largo de la secuencia de **A) *RPL19A*** y **B) *RPL19B***. En color morado se representan los oligonucleótidos utilizados para clonación, y en verde los utilizados para secuenciación.

3.5. Técnicas de manipulación y análisis de ARN

a) Extracción de ARN total de células de *S. cerevisiae*:

El ARN total de *S. cerevisiae* se preparó siguiendo el protocolo descrito por (Hinnebusch, 1985) para analizar preferentemente las cantidades netas de diferentes **ARNm**, o siguiendo el protocolo fenol-ácido (Schmitt *et al.*, 1990), para analizar los niveles de los **ARNr**. La estimación de la **concentración** del ARN de cada muestra se determinó por espectrofotometría en un equipo Nanodrop que mide la absorbancia de las soluciones a 260 nm, considerando que $A_{260}=1$ equivale a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del ARN (Sambrook and Russell, 2001). Tanto los medios de cultivo de las células como las condiciones de crecimiento, se describen en el apartado correspondiente de Resultados y Discusión.

b) Electroforesis de ARN en geles de agarosa:

La **integridad** del ARN se comprobó por electroforesis en geles de agarosa (Agarosa D-1, Pronadisa) del 0,8% (p/v) en condiciones nativas, preparados con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-7,8), y teñidos con bromuro de etidio (BrEt) a una

concentración de 0,5µg/ml. Se cargaron 2 µg de ARN extraído, a los que se añadió tampón de carga 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)). El tampón TAE 1X también se empleó para el desarrollo de la electroforesis, que se realizó a un voltaje constante de 80-90V. Para la visualización del ARN se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

c) Electroforesis de ARN en geles capilares:

La **calidad** y **cantidad** de los ARNr maduros se valoró sometiendo ~100 ng del ARN total disueltos en agua MiliQ a electroforesis capilar en gel utilizando chips de ARN, lo que se llevó a cabo por el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca mediante el uso de un Bioanalizador (Agilent Bioanalyzer®).

d) Hibridación de ARN:

• **Detección de secuencias de ARN específicas (“northern-blot”):**

Los análisis de northern-blot se llevaron a cabo siguiendo las técnicas descritas por (Sambrook and Russell, 2001) con algunas modificaciones.

- Para analizar los ARNs (tanto **ARNr** como **ARNm**), 10-12 µg de ARN total o un volumen fijo de muestra (10 µl), se precipitaron y se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos en 10 µl de tampón de carga para ARN (formamida desionizada al 50%, formaldehído al 16,2% (de una solución stock al 37%) y MOPS 0,02 M). Después, se añadieron 2 µl de tampón de electroforesis 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v), agua DEPC 0,1%) y 1µl de bromuro de etidio (1 mg/ml preparado con agua DEPC) por cada 10 µg de ARN. Los ARN se resolvieron en función de su tamaño someténdolos a electroforesis durante 6-7 horas a 100-110 V en geles de agarosa del 1,1-1,2% con formaldehído al 4% y 1X MOPS, usando tampón 1X MOPS pH = 7 para la electroforesis, y en condiciones de recircularización del mismo entre los dos electrodos para evitar la acidificación. El agua destilada y todas las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con agua DEPC al 0,1%, y las cubetas de electroforesis con SDS al 1%. Para la visualización del ARN se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

Para analizar los **ARNm**, los geles se incubaron 30 minutos en una solución NaOH 0,01M, 30 minutos en Tris-HCl 0,1M y 20 minutos en 10X SSC, y se transfirieron durante 14 horas en la solución salina 10X SSC a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche). Después se lavan las membranas en 6X SSC durante 5 minutos, se dejan secar a temperatura ambiente y se fijan los ARNs con un UV-Stratalinker 2400.

Para analizar los **ARNr**, después de la electroforesis los geles se sumergieron durante 20 minutos en solución alcalina (NaOH 0,01 M, NaCl 3M), y se transfirieron durante 4-5 horas a membranas de nylon cargadas positivamente en la misma solución alcalina según el procedimiento descrito por (Sambrook and Russell, 2001). Después de lavar las membranas en 6X SSC durante 5 minutos y dejarlas secar a temperatura ambiente, se fijan los ARNs utilizando también un UV-Stratalinker 2400.

- Para analizar los **ARNr de bajo peso molecular**, las muestras que contenían ~5 µg de ARN total, se precipitaron y se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos en 15 µl de tampón de carga (formamida al 90%, EDTA 1mM pH = 8, azul de bromofenol 0,1% y xilencianol 0,1%). Se añadieron 2 µl de tampón de electroforesis 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v), agua DEPC 0,1%), y los ARN se separaron por electroforesis durante ~5 horas a 220 V en geles del 6-8% de acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 8M, TEMED al 0,037%, APS al 0,07%, preparados en TBE 1X. Los ARN se electro-transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente utilizando una *Trans-blot cell* (Bio-Rad) a 220 mA constantes durante ~3 horas y 30 minutos con un tampón TBE 0,5X. Finalmente, se fijaron los ARN a las membranas con un UV-Stratalinker 2400.

- **Tinción de las membranas con Azul de Metileno:**

Antes de proceder a la hibridación de las membranas, éstas se tiñeron con azul de metileno, para comprobar el estado de los ARN ribosómicos 25S y 18S y la eficiencia de las transferencias. Para ello las membranas se sumergen en una solución con ácido acético al 5% y azul de metileno, que se deja actuar 5 minutos antes de lavar con agua MilliQ estéril para retirar el exceso de colorante.

- **Preparación de sondas marcadas radiactivamente:**

La detección de secuencias homólogas en preparaciones de ARN se realizó mediante hibridación con sondas específicas de ADN marcadas radiactivamente.

- El marcado radiactivo de los fragmentos de ADN de doble cadena utilizados como **sondas** se realizó por el método **Random primer labeling** (o de cebadores al azar) desarrollado por (Feinberg and Vogelstein, 1983; Feinberg and Vogelstein, 1984), en el que se utiliza una mezcla de hexanucleótidos de secuencias aleatorias como cebadores de la síntesis de ADN *in vitro*. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de los distintos componentes (Roche), utilizándose como molécula radiactiva [α -³²P]-dCTP

(Amersham Biosciences) con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Para purificar las moléculas de ADN marcadas se utilizaron columnas MicroSpin™ G-25 (Amersham Biosciences).

- El marcado radiactivo de **oligonucleótidos** en el extremo 5' se realizó, utilizando la polinucleótido kinasa del fago T4 (Fermentas), con 50 µCi de [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences). Para retirar los oligonucleótidos marcados no incorporados, se utilizaron columnas MicroSpin™ G-25 (Amersham Biosciences).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el ensayo de northern-blot se muestran en la **Tabla IV de los Anexos**.

- **Hibridación y lavado de las membranas:**

- **Hibridaciones ADN (sondas genómicas de doble cadena) – ARN:**

Las membranas se **pre-hibridaron** durante 1 hora o más, a 65°C en 10 ml del tampón Church and Gilbert, que contiene 0,25M tampón fosfato pH 7,1-7,2, BSA al 1%, EDTA 10mM y SDS al 7% (Church and Gilbert, 1984), y 150 µg/ml de ADN Fish desnaturalizado. Las **hibridaciones** se llevaron a cabo a 65°C, durante aproximadamente 16 horas en 5ml del mismo tampón Church and Gilbert al que se le añadió la sonda correspondiente desnaturalizada marcada radiactivamente, junto con 150 µg/ml de ADN Fish. Los **lavados** de las membranas se realizaron con una solución que contenía 2X SSC y SDS al 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente, y 0,5X SSC y SDS al 0,05% durante 30 minutos a 65°C.

- **Hibridaciones de ADN (oligonucleótidos) – ARN:**

Se **pre-hibridaron** las membranas durante 1-2 horas a 52°C en 10 ml de tampón Church and Gilbert (0,25 M tampón fosfato pH 7,1-7,2, BSA al 1%, EDTA 10mM, SDS al 7%) (Church and Gilbert, 1984) y después se **hibridaron** en 5 ml del mismo tampón Church and Gilbert junto con las sondas correspondientes desnaturalizadas y marcadas radiactivamente durante 16 horas a 52°C. Las membranas se **lavaron** con una solución de 2X SSC y SDS al 0,5% y con 0,5X SSC y SDS al 0,5%, ambas durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- **Reutilización de membranas (*Stripping*):**

Para hibridar las membranas con diferentes sondas, en los casos donde existía señal residual de la sonda anterior, ésta se eliminaba antes de añadir la siguiente sonda tratando las membranas con SDS al 1% a 100°C durante 5-10 minutos.

- **Detección de la radiación emitida:**

Las membranas se expusieron en pantallas BAS-III, en tiempos que oscilaron entre 1 minuto y 48 horas (dependiendo del experimento), y se analizaron en un Phosphorimager (Personal Molecular Imager, Bio-Rad), pudiéndose cuantificar la radiación emitida utilizando el programa Quantity One®. Posteriormente las membranas se expusieron en películas de autorradiografía (Kodak Biomax MR o Hyperfilm® MP Amersham Biosciences) durante tiempos que oscilaron entre 10 minutos y 15 días a -80°C, y se revelaron en un revelador automático (M35 X-OMAT Processor, Kodak).

e) **Ensayos de Primer Extension:**

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en (Venema *et al.*, 1998) con algunas modificaciones:

- De cultivos crecidos hasta fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6$), se purificaron las pre-partículas que contenían L19B o NOP7 marcadas por el epítipo TAP por afinidad mediante el uso de bolitas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen) como se describe en (Oeffinger *et al.*, 2007), con algunas modificaciones. Se centrifugaron los cultivos y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de RNP (HEPES 20 mM (pH = 7,4), AcOK 100 mM, 0,5% de Triton X-100, 0,1% de Tween 20, 40 mM de NaCl y 0,006% de Antifoam B), y se sometieron a vortex para lisar las células. Se añadieron las Dynabeads recubiertas con IgG a 4°C durante 30 min, y se lavaron tres veces con tampón de RNP para eliminar las proteínas unidas no específicamente. Los pre-ribosomas unidos a las bolitas se eluyeron mediante la escisión del sitio de la proteasa TEV dentro del TAP-tag con 10U de la proteasa TEV (Invitrogen). Después, se trataron con 5ml de Proteinasa K (Roche) durante 30 min a 37°C para degradar las proteínas asociadas, y se extrajo el ARN total por el método del fenol ácido (Schmitt *et al.*, 1990).

- Con cantidades equivalentes a ~5µg de cada ARN total purificado, se amplificaron los pre-ARNr que se encontrasen asociados a L19B::TAP o NOP7::TAP en los pre-ribosomas utilizando una transcriptasa reversa (Superscript ® III Reverse Transcriptase, Invitrogen) y un oligonucleótido E-C₂ (Tabla IV de los Anexos) complementario a una región inmediatamente cadena arriba del sitio de escisión en ITS2 – por lo que permite amplificar fragmentos definidos de los pre-ARNr 35S y 27S – y se marco radiactivamente con 50 µCi de [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences), utilizando la polinucleótido kinasa del fago T4 (Fermentas).

Después, se cargaron las muestras en geles del 6% de acrilamida/bisacrilamida (19:1), urea 8M, TEMED al 0,06%, APS al 0,1%, preparados en 1X TBE, y se separaron por electroforesis durante 4 horas y media a 50V. El gel se colocó sobre un papel Whatman™ (3MM) y se expuso en pantallas BAS-III (Fuji) durante 12-24 horas. Después se analizaron en un Phosphorimager (Personal Molecular Imager, Bio-Rad).

f) **Fraccionamiento y obtención de perfiles de polisomas:**

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos por (Foiani *et al.*, 1991; Pospisek and Valasek, 2013):

- Se obtuvieron extractos celulares utilizando el tampón de lisis (Tris HCl 10mM (pH = 7,5), NaCl 100mM, MgCl₂ 30mM, 2% de Heparina, 10% de cicloheximida, agua DEPC) y cicloheximida (125 µg/ml). Después, se cargaron 10 DO de cada extracto en gradientes de sacarosa (7% - 47%) preparados con el tampón de gradientes (Tris HCl 50mM (pH = 7,5), NH₄Cl 50mM, MgCl₂ 12mM, DTT 1mM, agua DEPC) para separar las partículas ribosómicas por centrifugación diferencial a 39.000 rpm con un rotor Sw40ti, durante 2 horas 45 minutos, a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman. Tras esto, con una continua monitorización de A₂₅₄ se obtuvo el perfil utilizando un equipo ISCO UA-6, con los parámetros:

- | | |
|---------------------------------|---|
| - Velocidad del lápiz: 5 | - Absorbancia: 0,5 |
| - Velocidad del papel: 2 cm/min | - Flujo: 0,750 ml |
| - Línea base: 9 | - Cero:  |

En algunos casos, se recogieron fracciones, de las que se extrajo el ARN total por el método de fenol-ácido (Schmitt *et al.*, 1990) y que se analizaron por northern-blot utilizando los oligonucleótidos **25S**, **18S**, **A₂-A₃**, **E-C₂** y **D-A₂** (**Tabla IV de los Anexos**).

- Los perfiles de elongación se realizaron en las mismas condiciones, a excepción de que los extractos se obtuvieron sin la adición de cicloheximida, y de la diferente composición del tampón de lisis (HEPES 20mM (pH = 7,4), AcOMg 2mM, AcOK 100mM, DTT 0,5mM, 10% de cicloheximida, agua DEPC) (Ashe *et al.*, 2000). Para la obtención de ECT, se recogió el mismo número de células de cultivos en YEPD en fase exponencial, se lavaron con medio rico sin glucosa (YEP) y se mantuvieron en agitación en el mismo medio a 28°C durante 2 y 5 minutos para inhibir la iniciación de la traducción. A continuación, se añadieron justo en ese momento 100 µg/ml de cicloheximida y 2mM Mg²⁺ durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron

y se resuspendieron en tampón de lisis con el fin de estabilizar los ribosomas que permaneciesen unidos aún a los ARNm. De esta forma, se puede analizar lo que ya ha ocurrido previamente en YEP, obteniendo una “imagen fija” del estado de la maquinaria traduccional tras la privación breve de glucosa. La cantidad de extracto correspondiente a 8 unidades de DO_{260nm} se centrifugó en gradientes continuos de sacarosa del 7 al 47%.

- Para la separación de las subunidades ribosómicas 40S y 60S, se emplearon tampones con bajas cantidades de Mg^{2+} y en ausencia de cicloheximida (Foiani *et al.*, 1991). Para la obtención de los extractos celulares se empleó el tampón de lisis (Tris HCl 50mM (pH = 7,5), NaCl 50mM, DTT 1mM, agua DEPC) y acida sódica 1M (NaN_3). Después, se cargaron 10 DO de cada extracto en gradientes de sacarosa (7% - 50%) preparados con el mismo tampón de lisis para separar las subunidades ribosómicas por centrifugación a 39.000 rpm con un rotor Sw40ti, durante 4 horas 30 minutos, a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman. Después se obtiene el perfil con una continua monitorización de A_{254} usando el equipo ISCO UA-6, con los parámetros:

- | | |
|---------------------------------|---|
| - Velocidad del lápiz: 5 | - Absorbancia: 1 |
| - Velocidad del papel: 2 cm/min | - Flujo: 0,750 ml |
| - Línea base: 9 | - Cero:  |

3.6. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas

a) Obtención de extractos proteicos:

Las extractos totales de proteínas de *S. cerevisiae* se prepararon por extracción con ácido tricloroacético (TCA) como se describe en (Reid and Schatz, 1982), donde tras recoger las células se resuspenden en 1ml de TCA al 20% , se rompen con Ballotini utilizando la FastPrep FP120 (Bio101 Savant), se lavan con 200 μ l de TCA al 5%, y se recoge el lisado de células, se pesa la biomasa del precipitado y se resuspende en función del peso de cada muestra en un volumen proporcional de tampón de Laemmli 2X (Tris-HCl 100 mM (pH = 6,8), glicerol al 20%, SDS al 4%, DTT 200mM y trazas de azul de bromofenol) para tratar de igualar la cantidad de proteína presente en todas las muestras. Se añade la mitad del volumen añadido de tampón de Laemmli 2X de Tris-Base 2M y se hierven las muestras durante 5 minutos. Después, se congelan a -80°C hasta su uso.

b) Precipitación con TAP:

Los factores o componentes pre-ribosómicos y los factores asociados a NOP7-TAP se purificaron por afinidad mediante el uso de bolitas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen) como se describe en (Oeffinger *et al.*, 2007), con algunas modificaciones.

Cultivos crecidos hasta fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6$), se recogieron y centrifugaron, y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de RNP (HEPES 20 mM (pH = 7,4), AcOK 100 mM, 0,5% de Triton X-100, Tween 20 0,1%, 40 mM de NaCl y Antifoam B 0,006%). Se sometieron a vortex para lisar las células con bolitas de vidrio utilizando una FastPrep FP120 (Bio101 Savant). Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. Se añadieron las Dynabeads recubiertas con IgG a 4°C durante 30-60 min, y se lavaron tres veces con tampón de RNP para eliminar las proteínas unidas no específicamente. Las partículas unidas a las bolitas se eluyeron mediante la escisión del sitio de la proteasa TEV dentro del TAP-tag añadiendo 10U de la proteasa TEV (Invitrogen) que actúa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminan las bolitas magnéticas añadiendo tampón de corte TEV (Tris-HCl (pH = 8) 10mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 0,1%, EDTA 0,5 mM, DTT 1mM) y se precipitan las proteínas añadiendo TCA al 10%. Se centrifuga y se lava el precipitado con acetona, se vuelve a centrifugar, y se resuspende el precipitado con tampón A (Tris 0,5M (pH = 11,5), SDS 6%) y tampón B (glicerol 75%, DTT 250 mM, trazas de azul de bromofenol) en proporción 3:1. Finalmente, se desnaturalizan las muestras durante 15 minutos a 65°C y se cargan en el gel de poliacrilamida para su análisis.

c) Determinación de la cantidad de proteína:

La determinación de la concentración total de proteínas se realizó siguiendo la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un espectrofotómetro para medir la DO a 750 nm. Como referencia, se utilizó una recta patrón realizada con albúmina pura de suero bovino (de vaca) BSA a diferentes concentraciones.

d) Electroforesis de proteínas:

Antes de analizar los extractos celulares, se desnaturalizaron por calor a 100°C y se centrifugaron durante 2 minutos. Después, las proteínas solubles presentes en el sobrenadante se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles del 10-15% de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) durante ~1 hora a una intensidad de corriente de 30 mA/gel, en

condiciones desnaturalizantes utilizando como tampón de carrera SDS-PAGE 1X, como se describe en (Laemmli, 1970).

Una vez terminada la electroforesis, bien se procede al análisis de los geles tiñéndolos con un reactivo de plata para observar las proteínas totales, o bien se transfieren a membranas de PVDF (Polifluoruro de Vinildeno) para posteriormente detectar una proteína específica mediante anticuerpos en un ensayo de western-blot.

e) Tinción de proteínas con nitrato de plata:

Este tipo de tinción permite detectar desde 0,3 a 10 ng de proteína gracias a la unión de los iones plata a las cadenas laterales de los aminoácidos seguida de la reducción de la plata, que aparece en el gel como una banda oscura. La intensidad de las bandas en este caso no depende sólo de la cantidad de proteína, sino de la cantidad de grupos sulfato que tenga cada proteína de la muestra (Switzer *et al.*, 1979).

La tinción con nitrato de plata se realizó con el Kit *Silver Stain Plus* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la electroforesis, se fijaron los geles manteniéndolos en la solución fijadora (Metanol 50 % (v/v), Ácido acético 10 % (v/v), Fixative Enhancer concentrate 10 % (v/v), en agua destilada) con suave agitación durante 30 minutos. A continuación, se aclararon 2 veces con agua destilada durante 20 minutos cada una, también con agitación, y se introdujeron en la solución de tinción (Silver Complex Solution 5 % (v/v), Reduction Moderador Solution 5 % (v/v), Image Development Reagent 5 % (v/v), Development Accelerator Solution 50 % (v/v), en agua destilada) durante aproximadamente 30 minutos o hasta que se alcanzó la intensidad de color deseada. Después se paró la tinción con una disolución de ácido acético 5 % (v/v) durante 15 minutos. Los geles se aclararon con agua destilada, se fotografiaron digitalmente y se secaron entre papel celofán para su conservación.

f) Electrotransferencia de proteínas:

Las proteínas de los geles se electrotransfieren a membranas de PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane, Bio-Rad) utilizando el sistema “Mini-Trans-Blot®” (Bio-Rad) con tampón CAPS (Ácido N-ciclohexil-3-aminopropansulfónico) 10mM (pH = 11) en frío durante 1 hora a 300mA. Para comprobar si la transferencia ha ocurrido correctamente, en ocasiones se tiñieron las membranas con *Rojo Ponceau* (Sigma).

g) Inmunodetección de proteínas (western-blot):

Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo TBST (Tris-HCl 20mM, (pH = 7,6), NaCl 137 mM, Tween 20 0,1%) con BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente (o más de 1 horas a 4°C). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en TBST durante 1 hora. Después de lavar 3 veces durante 5 minutos con abundante TBST, las membranas se incuban con el anticuerpo secundario (dilución 1:5000) unido a la peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se vuelven a lavar con TBST y se añade el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Para ello, se empleó el Kit Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectan exponiendo la membrana a películas CP-BU NEW (Agfa) que se revelaron en un revelador automático (M35 X-OMAT Processor, Kodak).

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal anti- FLAG (Sigma), a una dilución 1:10000.
- Anticuerpos monoclonales específicos frente a factores de ensamblaje (Nog2, Nop7, etc.) a una dilución 1:10000.
- Anticuerpo monoclonal anti-tubulina (Sigma) a una dilución de 1:10000.
- Anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz®), a una dilución 1:5000.

Para reutilizar algunas de las membranas e incubarlas con nuevos anticuerpos, se hicieron lavados de 15 minutos con Glicina 0,1M (pH = 2,5), agua MilliQ, SDS 1% y TBST 1%.

h) Medida de la actividad β-galactosidásica de proteínas de fusión reporteras (GCN4::*LacZ* o HIS4::*LacZ*):

La actividad β-galactosidásica se cuantificó mediante dos procedimientos:

- A partir del mismo número de células en cultivo: Por análisis enzimáticos según el protocolo descrito por (Lucchini *et al.*, 1984) después de crecer las cepas a 28°C hasta DO ~0,6 en medio mínimo definido SD conteniendo los suplementos necesarios, se recogen células y se resuspenden en tampón Z (Na₂HPO₄·7H₂O 60mM, NaH₂PO₄·H₂O 40mM, KCl 10mM, MgSO₄·7H₂O 1mM, pH final = 7) (Miller, 1972), cloroformo y SDS al 0,1%. Se incuban las muestras con ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) y se para la reacción cuando el color se torna a amarillo con Na₂CO₃. A continuación, se eliminan los restos celulares por centrifugación y se mide la DO con el sobrenadante a 420nm.

- A partir de la misma cantidad de proteína total: De cultivos celulares crecidos hasta fase exponencial ($DO \sim 0,6$) se prepararon extractos proteicos según el protocolo descrito por (Burke, 2000), utilizando tampón de rotura (Tris-HCl 0,1M, glicerol al 20%, β -mercaptoetanol al 0,007%), el inhibidor de proteasas PMSF y bolitas de vidrio. Después se mide la cantidad de proteína por Bradford (Ver apartado 3.6.c), y a 200-400 μ g de proteína total se añade el mismo tampón Z (Miller, 1972) y se incuba con ONPG. Finalmente, se procede al igual que en el caso anterior, parando la reacción cuando el color de las muestras se torna a amarillo con Na_2CO_3 y se mide la DO con el sobrenadante a 420nm.

Para establecer las condiciones de **represión del CGBA**, los cultivos se incubaban a 28°C en SD hasta fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6-0,8$). Para las condiciones de **des-represión del CGBA**, los cultivos se incubaron como en el caso anterior a 28°C hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,4$ y posteriormente se añadió 3-AT a una concentración de 10mM y se continuó la incubación durante 6 horas.

La **actividad β -galactosidásica** se expresa en Unidades definidas como los nanomoles de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína.

3.7. Técnicas de tinción y microscopía de levaduras

a) Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (DIC):

Las muestras se tomaron directamente de cultivos incubados en medio líquido hasta fase exponencial y se observó su morfología celular en un microscopio óptico Leica DM RXA, equipado con sistema de iluminación halógena, filtros para microscopía de contraste de fases y de contraste interferencial (DIC), y un equipo de fotografía digital.

b) Microscopía de fluorescencia:

Para muestras fluorescentes se usaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas.

- Tinción con Calcoflúor:

Para realizar tinciones con calcoflúor, que tiñe específicamente la quitina de la pared celular de las levaduras. Las células de *S. cerevisiae* incubadas en cultivos líquidos hasta fase exponencial se fijaron en el porta con formaldehído al 4%. Posteriormente, se les añadió calcoflúor (Blancophor BBH, Bayer Corporation), a una concentración de 1 mg/ml, dejándolo

actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células varias veces con PBS 1X, las muestras se observaron con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i con el filtro DAPI, ya que el calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul.

- **Tinción con DAPI:**

En la tinción con DAPI (4'-6'-diamindin-2-fenilindol), un compuesto que se une específicamente a zonas ricas en A y T del ADN, por lo que tiñe preferentemente los núcleos, células crecidas en medio líquido hasta fase exponencial se fijan en el porta y se añade a la muestra DAPI a una concentración de 1mg/ml y se incuba durante 2 minutos. Posteriormente, las células se observan con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i con el filtro DAPI.

- **Tinción con Calcoflúor y DAPI:**

Se sigue el mismo procedimiento llevado a cabo en los procesos anterior, añadiendo a la muestra, además de calcoflúor 1mg/ml, DAPI muestra a una concentración de 1mg/ml.

- **Fluorescencia directa con GFP:**

Para analizar el transporte núcleo-citoplasmático de pre-partículas ribosómicas 60S, se examinó la localización de la proteína ribosómica L25 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP). Las cepas portadoras de esta fusión RPL25-eGFP se incubaron hasta fase exponencial en medio mínimo definido SD. Se recogieron por centrifugación y se añadió un volumen de 50 µl etanol al 70% para fijar las células y crear poros. Después, se observaron con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i con el filtro GFP, ya que la proteína GFP es capaz de emitir luz verde cuando se excita con luz UV de longitud de onda de 395 nm.

- **Inmunofluorescencia para la tinción de microtúbulos:**

Para analizar el estado de los microtúbulos en las células mutantes de *S. cerevisiae*, se hizo un ensayo de inmunofluorescencia. Primero, células de cultivos crecidos hasta fase exponencial se fijaron con formaldehído al 3,7%. Se tratan con PEMS 1X (Pipes 100mM, EGTA 1mM, MgSO₄ 1mM, Sorbitol 1,2M, pH = 6,9), b-mercaptoetanol al 0,1%, Glusulasa al 0,02% y zymoliasa 20T (25ug/ml). Se permeabilizan las células con PEMS 1X y Tritón al 1% y se incuban con un anticuerpo primario anti-tubulina (dilución 1:100). Se hacen lavados con PEMBAL 1X (Pipes 100mM, EGTA 1mM, MgSO₄ 1mM, BSA 1%, acida sódica 0,1%, lisina hydrochloride 100mM, pH = 6,9) y Tritón al 0,1% y se incuban con un anticuerpo secundario

conjugado con el fluoróforo CY3 (dilución 1:500). Se vuelven a lavar las células con PEMBAL 1X y Tritón 0,1% y se resuspenden en PEMBAL para observarlas al microscopio. El fluoróforo CY3 emite señal de fluorescencia roja, por lo que es posible observar las fibras de tubulina con un filtro de RODAMINA en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i. Además, se tiñieron las células con DAPI para observar los núcleos.

3.8. Análisis bioinformáticos

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y proteínas, así como el diseño de plásmidos, se utilizó el programa *DNAStar*TM.

Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Las secuencias génicas y proteicas de *S. cerevisiae* se obtuvieron de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (www.yeastgenome.org).

Las búsquedas bibliográficas se realizaron principalmente a través de las bases de datos de *MedLine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Para la visualización del ADN y ARN teñido con BrEt, así como para realizar las cuantificaciones de la radiación emitida en los ensayos de northern-blot, se utilizó el programa *QuantityOne*[®].

Las predicciones bioinformáticas de la estructura del ribosoma y de L19e se realizaron utilizando los programas *UCSF- Chimera* y *Discovery Studio*, y para ello se utilizaron las coordenadas depositadas en (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Todas las imágenes de microscopía, tanto las obtenidas con el microscopio óptico Leica DM RXA como con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i, se procesaron con el programa *Metamorph*[®] y con *Image J* (*Nathional Institutes of Health*, USA).

ABREVIATURAS



Δ : deleción	CMF : Complejo multifactorial
°C o ° : grados centígrados	cpm : cuentas por millón
μg : microgramo	Cr : Cromosoma
μl : microlitro	CT : Complejo ternario
μM : micromolar	Da : Dalton
3-AT : 3-amino-1,2,4-triazol	DAPI : Diclorohidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
5-FOA : Ácido 5-fluoroorótico	DEPC : Dietilpirocarbonato
5-MT : 5-metil-DL-triptófano	DIC : contraste de interferencia diferencial
Å : Amstrong	DMSO : Dimetil sulfóxido
A : Adenina	DO : Densidad óptica
A : Absorbancia	ds RNA : <i>Double-stranded RNA</i> (ARN bicaterario)
aa : Aminoácidos	DTT : Ditioneitol
ADN : Ácido desoxirribonucleico	EB : <i>Eukaryotic bridge</i> (puente eucariótico entre subunidades ribosómicas)
ADN-pol : ADN polimerasa	ECT : Extractos celulares totales
ADP : Adenosín bifosfato	<i>E. coli</i> : Escherichia coli
ARN : Ácido ribonucleico	EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético
ARNm : ARN mensajero	eIF : Factor de inicio de la traducción eucariótico
ARN-pol : ARN polimerasa	ES : <i>Expansion segment</i> (segmento de expansión de ARNr)
ARNr : ARN ribosómico	g : gramo
ARNt : ARN de transferencia	G : Guanina
ARNt_i^{Met} : ARNt iniciador metiona	GCD : <i>General control Derepressed</i> (Efactor negativo de la traducción de <i>GCN4</i>)
ARS : Origen de autorreplicación autónomo	Gcd : Fenotipo de desrepresión constitutiva de <i>GCN4</i>
ATP : Adenosín trifosfato	GCN : <i>General Control Non-derepressible</i> (Efactor positivo de la traducción de <i>GCN4</i>)
bp : <i>Base pairs</i> (Pares de bases)	
BrEt : Bromuro de Etidio	
BSA : Albúmina de suero bovino	
C : Citosina	
CGBA : Control General de la biosíntesis de aminoácidos	

Gcn: Fenotipo de represión constitutiva de <i>GCN4</i>	NMD: <i>nonsense-mediated RNAm decay</i> (degradación mediada por ARNm sin sentido)
G-418: Geneticina	nt: nucleótido (s)
h: horas	ONPG: Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
hc: <i>high copy</i> (alto número de copias)	ORF: <i>Open Reading Frame</i> (Secuencia Abierta de Lectura)
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico	PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
Kbp: Kilo pares de bases	PBS: Solución Buffer de fosfatos
KDa: KiloDaltons	PEG: Polietilenglicol
LB: Luria Bertani	PIC: <i>pre-initiation complex</i> (Complejo de pre-iniciación)
LOF: <i>Loss of function</i> (pérdida de función)	pLOF: <i>Partial loss of function</i> (pérdida parcial de función)
LSU: <i>Large subunit</i> (subunidad mayor del ribosoma)	PM: Polisomas
M: Molar	PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro
M: Monosomas	PTC: <i>Premature termination codon</i> (Codón de terminación prematuro)
mA: miliamperios	p/v: peso/volumen
MCS: <i>multiple cloning site</i> (sitio múltiple de clonación)	RNP: Ribonucleopartículas
MDa: millones de Dalton	RPs: <i>Ribosomal proteins</i> (proteínas ribosómicas)
MFC: <i>Multi Factor Complex</i> (Complejo de múltiples factores)	RPG: <i>Ribosomal protein genes</i> (genes de proteínas ribosómicas)
min o (´): minutos	RPL: <i>Ribosomal protein of large subunit</i> (proteína ribosómica de la subunidad mayor)
Mg²⁺: Magnesio	rpm: Revoluciones por minuto
mg: miligramo	RPS: <i>Ribosomal protein of small subunit</i> (proteína ribosómica de la subunidad menor)
ml: Mililitro	
mM: milimolar	
NLS: Señal de Localización Nuclear	
ng: nanogramo	
nm: nanómetros	

S: Svedberg	TBS: Tampón tris- salino
<i>S. cerevisiae:</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TCA: Ácido tricloroacético
SD: Medio mínimo definido con glucosa	TE: Tampón tris/EDTA
SDS: Dodecilsulfado sódico	TEMED: N,N,N',N'- tetrametilendiamina
s: segundos	Tm: Temperatura de anillamiento
<i>Slg:</i> <i>Slow grow</i> (crecimiento lento)	TRIS: Tris-(hidoximetil)-aminometano
SnRNA: <i>Small nuclear RNA</i> (ARN pequeño nuclear)	U: Uracilo
SnoRNA: <i>Small nucleolar RNA</i> (ARN pequeño nucleolar)	UTR: <i>Untranslated Region</i> (Región no traducida)
SSC: Sodio Salino Citrato	V: Volumen
SSU: <i>Small subunit</i> (subunidad menor del ribosoma)	v/v: volumen/volumen
<i>T. thermophila:</i> <i>Tetrahymena thermophila</i>	wt: Wild type (cepa Silvestre)
TAE: Tampón tris-acetato EDTA	X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
TAP: <i>Tandem Affinity Purification</i> (Purificación de afinidad en tándem)	YEPD: Medio rico con glucosa
TBE: Tris/Borato/EDTA	YNB: Yeast Nitrogen Base (Base de nitrógeno de levaduras)
	YPG: Medio rico con galactosa y rafinosa

- AMINOÁCIDOS:

A: Alanina	M: Metionina
C: Cisteína	N: Asparragina
D: Ácido Aspártico	P: Prolina
E: Ácido Glutámico	Q: Glutamina
F: Fenilalanina	R: Arginina
G: Glicina	S: Serina
H: Histidina	T: Treonina
I: Isoleucina	V: Valina
K: Lisina	W: Triptófano
L: Leucina	Y: Tirosina

-**NOTA:** Los anglicismos se escriben en *cursiva* en la Memoria.

ANEXOS



Tabla I. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas y generadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
Y07156	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl19a::KanMX4</i>	Euroscarf
Y03053	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl19b::KanMX4</i>	Euroscarf
Hm696	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn2::HIS3</i>	Este estudio
Hm697	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl19a::KanMX4 gcn2::HIS3</i>	Este estudio
Hm 698	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl19b::KanMX4 gcn2::HIS3</i>	Este estudio
TY1099	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl19a::His3MX4 rpl19b::KanMX4 [Ycplac111::pGAL::RPL19B_{Δi}]</i>	Pöll <i>et al.</i> , 2009
Cepas con genotipo común <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl19a::His3MX4 rpl19b::KanMX4 (Δrpl19a Δrpl19b)</i>		
1. Con alelos silvestres RPL19B		
Hm670	<i>pGAL::RPL19B_{Δi} (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm566	<i>RPL19B (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm567	<i>RPL19B (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm568	<i>RPL19B_{Δi} (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm569	<i>RPL19B_{Δi} (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm570	<i>RPL19B (CEN6 URA3); RPL19A (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm571	<i>RPL19A (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm572	<i>RPL19A (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
2. Con alelos mutantes rpl19b_{Δi}*		
Hm573	<i>rpl19bΔ32 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm574	<i>rpl19bΔ27 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm575	<i>rpl19bΔ22 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm576	<i>rpl19b D148A, K153R, Δ34 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm577	<i>rpl19b N27D, I96T, Δ34 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm578	<i>rpl19b S61F, I142M, Δ2 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio

Hm581	<i>rpl19b N27D, A65T (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm582	<i>rpl19b A168T (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm618	<i>rpl19bΔ32 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm619	<i>rpl19bΔ27 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm620	<i>rpl19bΔ22 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm621	<i>rpl19b D148A, K153R, Δ34 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm622	<i>rpl19b N27D, I96T, Δ34 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm623	<i>rpl19b S61F, I142M, Δ2 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm579	<i>rpl19b N27D, A65T (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm580	<i>rpl19b A168T (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm656	<i>rpl19b N27D (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm657	<i>rpl19b S37A (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm658	<i>rpl19b G48R (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm659	<i>rpl19b L185A (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm660	<i>rpl19b D188R (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm661	<i>rpl19bΔ39 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm662	<i>rpl19bΔ39+i (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm663	<i>rpl19b N27D (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm664	<i>rpl19b S27A (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm665	<i>rpl19b G48R (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm666	<i>rpl19b L185A (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm667	<i>rpl19b D188R (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm668	<i>rpl19bΔ39 (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm669	<i>rpl19bΔ39+i (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
3. Con alelos mutantes <i>pGal::rpl19bΔCT</i>		
Hm670	<i>pGal::RPL19B_{Δi} (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm671	<i>pGal::rpl19bΔ39 (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm672	<i>pGal::rpl19bΔ32 (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm673	<i>pGal::rpl19bΔ27 (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm674	<i>pGal::rpl19bΔ22 (CEN4 URA3)</i>	Este estudio
Hm675	<i>pGal::RPL19B_{Δi} (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm676	<i>pGal::rpl19bΔ39 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio

Hm677	<i>pGAL::rpl19bΔ32 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm678	<i>pGAL::rpl19bΔ27 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm679	<i>pGAL::rpl19bΔ22 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
4. Con alelos mutantes <i>pS28::FLAG::rpl19bΔCT</i>		
Hm680	<i>pS28::FLAG::RPL19A (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm681	<i>pS28::FLAG::RPL19B (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm682	<i>pS28::FLAG::RPL19B_{Δi} (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm683	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ39 (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm684	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ32 (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm685	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ27 (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm686	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ22 (2μM LEU2)</i>	Este estudio
Hm687	<i>pS28::FLAG::RPL19A (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm688	<i>pS28::FLAG::RPL19B (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm689	<i>pS28::FLAG::RPL19B_{Δi} (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm690	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ39 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm691	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ32 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm692	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ27 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Hm693	<i>pS28::FLAG::rpl19bΔ22 (CEN4 LEU2)</i>	Este estudio
Otras Cepas		
H96	MATα <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ ura3-52</i>]	A.G. Hinnebusch
Hm624	MATα <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ ura3-52</i>] <i>rpl19a::KanMX4</i>	Este estudio
Hm585	MATα <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ ura3-52</i>] <i>rpl19b::KanMX4</i>	Este estudio
Hm586	MATα <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ ura3-5</i>] <i>rpl19b::HISG</i>	Este estudio
Hm498	MATa <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 leu2::HisG</i>	R.Baldosa
Hm625	MATa <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 leu2::HisG</i> <i>rpl19a::KanMX4</i>	Este estudio
Hm583	MATa <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 leu2::HisG</i> <i>rpl19b::KanMX4</i>	Este estudio
H117	MATa <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ URA3</i>]	A.G. Hinnebusch
H275	MATa <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52</i> [<i>HIS4::LacZ URA3</i>] <i>gcd17</i>	Martín-Marcos <i>et al.</i> , 2007

F35	MAT α <i>ura3-52 ino1 can1 [HIS4::LacZ URA3]</i>	G. Luccini
TD301-4D	MATa <i>His4-303 ura3-52 leu2-3 leu2-112 Sui1-1 [AUU/Phe]::LacZ</i>	T.F. Donahue
Hm694	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpL19a::His3MX4 rpL19b::KanMX4 [RPL19B, CEN6 LEU2] nop7::NOP7::TAP::URA3</i>	J. Woolford
Hm695	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpL19a::His3MX4 RPL19B::TAP::URA3</i>	J. Woolford
5X47 [K1 ⁻]	MATa/MAT α <i>his1/HIS1, trp1/TRP1, ura3/URA3 L-0</i>	R. Esteban
37-4C [K1 ⁻]	MATa <i>kar1-1 leu1Δ0 clo- L-0, T, W</i>	R. Esteban
1101 [K1 ⁺]	MAT α <i>kar1-1 his4-1 L-A L-BC M1 [K1⁺]</i>	R. Esteban

Tabla II. Plásmidos utilizados, descripción y procedencia.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
Con alelos <i>rpl19</i>, <i>CEN6</i>		
pAJ1	pRS316:: <i>RPL19B</i>	Este estudio
pAJ2	pRS315:: <i>RPL19B</i>	Este estudio
pAJ3	pRS316:: <i>RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ4	pRS315:: <i>RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ7	pRS315:: <i>RPL19A</i> (clonada con extremos romos)	Este estudio
pAJ8	pRS315:: <i>RPL19A</i>	Este estudio
pAJ9	pRS316:: <i>RPL19A</i>	Este estudio
pAJ10	pRS316:: <i>rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pAJ11	pRS316:: <i>rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pAJ12	pRS316:: <i>rpl19bΔ22</i>	Este estudio
pAJ13	pRS316:: <i>rpl19b D148A, K153R, Δ34</i>	Este estudio
pAJ14	pRS316:: <i>rpl19b N27D, I96T, Δ2</i>	Este estudio
pAJ15	pRS316:: <i>rpl19b S61F, I142M, Δ34</i>	Este estudio
pAJ16	pRS315:: <i>rpl19b N27D, A65T</i>	Este estudio
pAJ17	pRS315:: <i>rpl19b A168T</i>	Este estudio
pAJ18	pRS316:: <i>rpl19b N27D, A65T</i>	Este estudio
pAJ19	pRS316:: <i>rpL19b A168T</i>	Este estudio
pMJ10	pRS316:: <i>rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pMJ11	pRS316:: <i>rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pMJ12	pRS316:: <i>rpl19bΔ22</i>	Este estudio
pMJ13	pRS316:: <i>rpl19b D148A, K153R, Δ34</i>	Este estudio
pMJ14	pRS316:: <i>rpl19b N27D, I96T, Δ2</i>	Este estudio
pMJ15	pRS316:: <i>rpl19b S61F, I142M, Δ34</i>	Este estudio
pAJ22	pRS316:: <i>rpl19b S13A</i>	Este estudio
pAJ23	pRS316:: <i>rpl19b N27D</i>	Este estudio
pAJ24	pRS316:: <i>rpl19b S37A</i>	Este estudio
pAJ25	pRS316:: <i>rpl19b G48R</i>	Este estudio
pAJ26	pRS316:: <i>rpl19bΔ39</i>	Este estudio
pAJ27	pRS315:: <i>rpl19b S13A</i>	Este estudio
pAJ28	pRS315:: <i>rpl19b N27D</i>	Este estudio
pAJ29	pRS315:: <i>rpl19b S37A</i>	Este estudio
pAJ30	pRS315:: <i>rpl19b G48R</i>	Este estudio
pAJ31	pRS315:: <i>rpl19bΔ39</i>	Este estudio

pAJ42	pRS316:: <i>rpl19b_(i)Δ39</i>	Este estudio
pAJ43	pRS315:: <i>rpl19b_(i)Δ39</i>	Este estudio
pAJ44	pRS316:: <i>rpl19b L185A</i>	Este estudio
pAJ45	pRS316:: <i>rpl19b D188R</i>	Este estudio
pAJ46	pRS315:: <i>rpl19b L185A</i>	Este estudio
pAJ47	pRS315:: <i>rpl19b D188R</i>	Este estudio
Con alelos <i>pGAL::rpl19bΔCT, CEN4</i>		
pAJ32 (= TK884)	YCplac111:: <i>pGAL::RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ33	YCplac111:: <i>pGAL::rpl19bΔ39</i>	Este estudio
pAJ34	YCplac111:: <i>pGAL::rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pAJ35	YCplac111:: <i>pGAL::rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pAJ36	YCplac111:: <i>pGAL::rpl19bΔ22</i>	Este estudio
pAJ37 (= TK891)	YCplac33:: <i>pGAL::RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ38	YCplac33:: <i>pGAL::rpl19bΔ39</i>	Este estudio
pAJ39	YCplac33:: <i>pGAL::rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pAJ40	YCplac33:: <i>pGAL::rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pAJ41	YCplac33:: <i>pGAL::rpl19bΔ22</i>	Este estudio
Con alelos <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔCT, 2μm</i>		
pAJ48	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19A</i>	Este estudio
pAJ49	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19B</i>	Este estudio
pAJ50	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ51	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ39</i>	Este estudio
pAJ52	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pAJ53	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pAJ54	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ22</i>	Este estudio
pAJ55	YEplac195:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19b_(i)Δ39</i>	Este estudio
Con alelos <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔCT, CEN4</i>		
pAJ56	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19A</i>	Este estudio
pAJ57	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19B</i>	Este estudio
pAJ58	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::RPL19B_{Δi}</i>	Este estudio
pAJ59	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ39</i>	Este estudio
pAJ60	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ32</i>	Este estudio
pAJ61	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ27</i>	Este estudio
pAJ62	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19bΔ22</i>	Este estudio
pAJ63	YCplac111:: <i>pRPS28::FLAG::rpl19b_(i)Δ39</i>	Este estudio

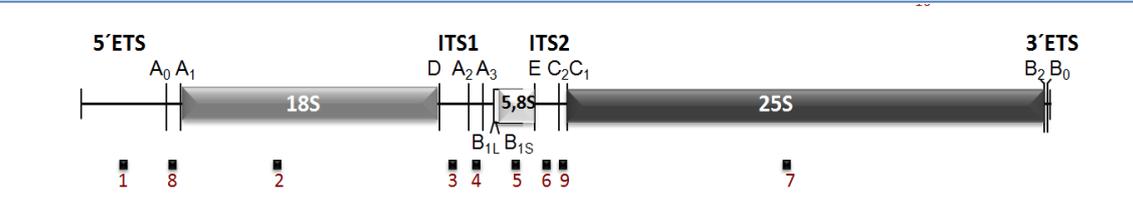
Plásmidos portadores de alelos nulos para <i>rpL19</i>		
pAJ5	pRS316:: <i>pRPL19B::KanMX4::tRPL19B</i>	Este estudio
pAJ6	pRS315:: <i>pRPL19B::KanMX4::tRPL19B</i>	Este estudio
pAJ20	pRS316:: <i>pRPL19B::HisG::URA3::HisG::tRPL19B</i>	Este estudio
pAJ21	pRS315:: <i>pRPL19B::HisG::URA3::HisG::tRPL19B</i>	Este estudio
Otros plásmidos		
TK230	YCplac111:: <i>pGAL LEU2</i>	Ferreira-Cerca <i>et al.</i> , 2005
TK884	YCplac111:: <i>pGAL::RPL19B_{Δi}</i>	Pöll <i>et al.</i> , 2009
TK891	YCplac33:: <i>pGAL::RPL19B_{Δi}</i>	Pöll <i>et al.</i> , 2009
TK349	YEplac195:: <i>pRPS28::short-FLAG::RPL16B, URA3</i>	P. Milketeit
pD0	pRS315:: <i>HISG::URA3::HISG</i>	D. Iglesias-Gato
pFA6a-KanMX4	pFA6a:: <i>KanMX4</i>	Wach <i>et al.</i> , 1994
p1877	pRS316:: <i>RPL25::eGFP, URA3</i>	Gadal <i>et al.</i> , 2001
p436	pBR322:: <i>GCN2::HIS3::GCN2</i>	R. Barrera
p437	pRS316:: <i>HIS3</i>	R. Barrera
p180	YCp50:: <i>GCN4::LacZ</i> (con las 4 uORFs)	Hinnebusch, 1985
p226	YCp50:: <i>GCN4::LacZ</i> (sólo con la uORF 4)	Mueller and Hinnebusch. 1986
p227	YCp50:: <i>GCN4::LacZ</i> (sin ninguna uORF)	Mueller and Hinnebusch. 1986
pM226	YCp50:: <i>GCN4::LacZ</i> (La uORF 1 se introduce en <i>GCN4 130 nt</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1994
p367	pBR322:: <i>HIS4::lacZ</i> (con ATG como codón de inicio), <i>CEN4 URA3</i>	Cigan <i>et al.</i> , 1988
p391	pBR322:: <i>HIS4::lacZ</i> con UUG como codón de inicio, <i>CEN4 URA3</i>	Cigan <i>et al.</i> , 1988
pC477	<i>FUN12::2μm::URA3</i>	T. Dever
pAS425	<i>PAB1::2μm::URA3</i>	A. Sachs

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para clonación, amplificación y secuenciación. Se indica la secuencia y posición respecto al ATG de la secuencia codificadora de cada gen. Se subrayan los sitios de corte para diversas enzimas de restricción que se añadieron en algunos casos. En verde se destacan los nucleótidos que han sido mutados en la secuencia de *rpl19b*.

NOMBRE	SECUENCIA	POSICIÓN
Oligonucleótidos usados para las AMPLIFICACIONES de los alelos <i>RPL19B</i> y <i>rpl19b_{Δi}</i>		
<i>FIL19B-Sall</i>	5'- ACGCGT <u>CGACT</u> AGAGCCTCATCGCTCTGTCTC - 3'	- 474
<i>RIL19B-SacII</i>	5'- TCC <u>CCGCGGA</u> ATCGGCCAGTGGGTATACGAC - 3'	+ 2435
<i>FIL19B</i> (Clon-Int) (<i>BglIII</i> -ATG- Ex2- <i>RPL19B</i>)	5'- CTTGAT <u>AGATCT</u> TTTTACCAAATCGAATAAAAAGTCAC CAATAAATTAGAGGAAAATGGCTAACTTGCCTACTCAA AGAGACTTGC - 3'	+ 1388
<i>RIL19B</i> (Clon-Int) (<i>SnaBI</i> -Term <i>RPL19B</i>)	5'- CATATATAGAACAATGAGAAGGT <u>ACGTA</u> ATTTCTTAG CTAATTATTTGTAATCAATTAAGCGTCTTCTTTAGCAAAG CGTCTCTC - 3'	+ 2009
<i>O1432-BamHI</i>	5'- TTTTTTGGATCCATGGCTAACTTGCCTACTC - 3'	+ 1388
<i>O1397-PstI</i>	5'- TTTTTTCTGCAGACCAATTTTACACGATGCC - 3'	+ 2242
Oligonucleótidos usados para la AMPLIFICACIÓN del alelo <i>RPL19A</i>		
<i>FIL19A-BamHI</i>	5'- CGCGGATCCGTCCCTCTTGCTTTGCAGTTC - 3'	- 934
<i>F2L19A-BamHI</i>	5'- CGCGGATCCCCAGACATTACGCATTTTCCG - 3'	- 413
<i>RIL19A-SpeI</i>	5'- GGACTAGTAATGGCATCAATTCGACCTCG - 3'	+ 2063
Oligonucleótidos usados para la AMPLIFICACIÓN de alelos <i>rpl19b*_{Δi}</i> (por mutagénesis dirigida)		
<i>F-N27D</i>	5' - GGTTTGGTTAGACCCAGACGAAACTTCTGAAATTGC-3'	+ 1447
<i>R-N27D</i>	5'- GCAATTTCAGAAGTTTCGTCTGGGTCTAACCAAACC - 3'	+ 1482
<i>F-S37A</i>	5' - GCCCAAGCCAACGCTAGAAATGCCATTAG - 3'	+ 1481
<i>R-S37A</i>	5'- CTAATGGCATTCTAGCGTTGGCTTGGGC - 3'	+ 1509
<i>F-G48R</i>	5'- GAAAATTGGTCAAGAACCGAACCATCGTCAAGAAG GC - 3'	+ 1509
<i>R-G48R</i>	5'- GCCTTCTTGACGATGGTTCGGTTCTTGACCAATTTTC-3'	+ 1545
<i>F-HALO</i>	5'- GCTAAGGCTGATGCTTAACGTGAAAAGGCTTTG - 3'	+ 1817
<i>R-HALO</i>	5'- CAAAGCCTTTTCACGTTAAGCATCAGCCTTAGC - 3'	+ 1849
<i>F-L185A</i>	5'- GAAAAGAGAGACGCTTTGGCAAAGGAAGACGCT TAATTG - 3'	+ 1918
<i>R-L185A</i>	5'- CAATTAAGCGTCTTCTTTGCCAAAGCGTCTCTCTTT TC - 3'	+ 1960
<i>F-D188R</i>	5'- GAGAGACGCTTTGCTAAAGGAAACGCGCTTAATTGATT	+ 1923

	AC - 3'	
<i>R-D188R</i>	5'- GTAATCAATTAAGCGCGTTTCCTTTAGCAAAGCGTCTC TC - 3'	+ 1962
Oligonucleótidos usados para la SECUENCIACIÓN del alelo <i>RPL19A</i>		
<i>F1L19A</i>	5'- GTCCCTCTTGCTTTGCAGTTC - 3'	- 934
<i>F2L19A</i>	5'- CCAGACATTACGCATTTTCCG - 3'	- 413
<i>F3L19A</i>	5'- ACTCCCTCTTGAGGAATGCG - 3'	+ 1069
<i>F4L19A</i>	5'- ACCTCTGAAATTGCTCAAGCC - 3'	+ 1590
<i>R1L19A</i>	5'- TAATGGCATCAATTGACCTCG - 3'	+ 2063
<i>R2L19A</i>	5'- TCAGCTTCTTCGTTCAAAGCC - 3'	+ 1985
<i>R3L19A</i>	5'- GTCTATTGCGCGTCAAAGATAG - 3'	+ 1463
<i>R4L19A</i>	5'- GTATTCTCTGTTGATCACTGTC - 3'	+ 941
<i>R6L19A</i>	5'- GTAGAAGTCGACGACGACGG - 3'	+ 2309
Oligonucleótidos usados para la SECUENCIACIÓN de los alelos <i>RPL19B</i> y <i>rpl19b_{Δi}</i>		
<i>F1L19B</i>	5'- TAGAGCCTCATCGCTCTGTCTC - 3'	- 474
<i>F2L19B</i>	5'- CGCATAGTTGGTAGCAACATCC - 3'	+ 1127
<i>F3L19B</i>	5'- CTCGTTTACCATCCCAAGTCG - 3'	+ 1644
<i>F4L19B</i>	5'- GTCGTAGTCATCGCTAATGTAC - 3'	+ 2141
<i>F5L19B</i>	5'- CGCTATGGGAATTGGGCAGG - 3'	- 189
<i>F6L19B</i>	5'- CTTTGTTACAGTGCATCTACTGC - 3'	- 679
<i>R1L19B</i>	5'- AATCGGCCAGTGGGTATACGAC - 3'	+ 2435
<i>R2L19B</i>	5'- TCTTCTGTCACGAGCAGCTCTG - 3'	+ 1881
<i>R3L19B</i>	5'- GTACGCAAGTTAGCCCTGTG - 3'	+ 1401
<i>R4L19B</i>	5'- CTACCGATGTGGAATGTGTAG - 3'	- 126
<i>R5L19B</i>	5'- CTACGAACAGTCTCCTTACC - 3'	+ 2084
<i>R6L19B</i>	5'- TACGATAAAAAGGTCACCTTTCGC - 3'	+ 2626
OTROS oligonucleótidos usados para SECUENCIACIÓN		
<i>F1KanMX4</i>	5'- CATCCTATGGAAGTGCCTCG - 3'	+ 702/ <i>KanMX4</i>
<i>R1KanMX4</i>	5'- AGTTTAGTCTGACCATCTCATCTG - 3'	+ 189/ <i>KanMX4</i>
<i>1FGCN2</i>	5'- CCCTCCAGCAGCTATCATAT - 3'	+397 / <i>GCN2</i>
<i>1RGCN2</i>	5'- GACGATTCAGATGTCACCCT - 3'	- 589 / <i>GCN2</i>
<i>LHISG</i>	5'- CGCTCTTATTGACCACACCTTACC - 3'	+ 915 / <i>HISG</i>
<i>RHISG</i>	5'- CGTTCCTCTTTATCCTGTCTGAACC - 3'	+ 62 / <i>HISG</i>
<i>HIS3iF</i>	5'- GTAGTGAGAGTGCGTTCAAG - 3'	+ 585 / <i>HIS3</i>
<i>HIS3iR</i>	5'- GAAGATCGAGTGCTCTATCG - 3'	+ 86 / <i>HIS3</i>

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de northern-blot y su secuencia correspondiente.



NOMBRE	SECUENCIA
1. 35S-ETS	5'- TCAGGTCTCTCTGCTGC - 3'
2. 18S	5'- AGCCATTTCGAGTTTCACTG - 3'
3. D-A ₂	5'- TTAAGCGCAGGCCCGGCTGG - 3'
4. A ₂ -A ₃	5'-TGTTACCTCTGGGCCC - 3'
5. 5,8S	5'- TGC GTTCTTCATCGATGCGAGAACC - 3'
6. E-C ₂	5'- GGCCAGCAAGTTA - 3'
7. 25S	5'- CTCCGCTTATTGATATGC - 3'
8. A ₀ -A ₁	5'- CACCTATTCCTCTTGCTAGAAG - 3'
9. C ₁ -C ₂	5'- CGCCTAGACGCTCTCTTCTTA - 3'
SCR1	5'- GAGGGAAGCGCCACAATGTG - 3'
U4	5'- CACCGAATTGACCATGAGGAGAGCGTCTGG - 3'
1-ARNm-A	5'- GATCCAAATGAAACCTCTGAAATTGCTCAAGCCAAC - 3'
1-ARNm-B	5'- GACCCAAACGAAACTTCTGAAATTGCCCAAGC - 3'

Tabla V. Factores de ensamblaje que participan en el procesamiento y maduración de las subunidades ribosómicas 40S y 60S en *S. cerevisiae*.

ETAPA EN LA QUE INTERVIENE	PROTEÍNA	COMENTARIOS	ESENCIAL	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Procesamiento de pre-partículas 43S	BMS1	GTPasa. Interviene también en el procesamiento de pre-66S	Sí	(Karbstein <i>et al.</i> , 2005)
	DBP4	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Liang <i>et al.</i> , 1997)
	DBP8	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Granneman <i>et al.</i> , 2006)
	DHR1	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Colley <i>et al.</i> , 2000)
	DHR2	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Colley <i>et al.</i> , 2000)
	DIM1	Dimetilasa que metila el ARNr 20S antes de su salida al citoplasma	Sí	(Lafontaine <i>et al.</i> , 1994)
	FAL1	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Kressler <i>et al.</i> , 1997)
	GAR1	Proteína de unión al ARNr que facilita la pseudo-uridilación del pre-ARNr	Sí	(Girard <i>et al.</i> , 1992)
	HAS1	DEAD-box ARN-Helicasa que participa también en el procesamiento de pre-66S	Sí	(Emery <i>et al.</i> , 2004)
	IMP3	RLP que guarda el sitio a S9	Sí	(Lee and Baserga, 1999)
	LTV1	Participa en el transporte núcleo-citoplasma de la pre-43S	No	(Seiser <i>et al.</i> , 2006)
	NHP2	Proteína de unión al ARNr que facilita la pseudo-uridilación del pre-ARNr	Sí	(Watkins and Bohnsack, 2012)
	NOB1	Endonucleasa	Sí	(Fatica <i>et al.</i> , 2003a)
	NOPI	Subunidad catalítica de snoRNP C/D Box con función metil-transferasa	Sí	(Tollervey <i>et al.</i> , 1991)
	NOP56	Proteína de unión al ARNr que facilita la metilación del pre-ARNr	Sí	(Lafontaine and Tollervey, 2000)
	NOP58	Proteína de unión al ARNr que facilita la metilación del pre-ARNr	Sí	(Wu <i>et al.</i> , 1998)
	PNO1/ DIM2	Participa en el transporte núcleo-citoplasma del pre-43S. Interacciona además con NOB1	No	(Vanrobays <i>et al.</i> , 2008)
	PRP43	DEAD-box ARN-Helicasa que también participa en el procesamiento de pre-66S. Además, está implicada en el proceso de eliminación de intrones	Sí	(Combs <i>et al.</i> , 2006)
	ROK1	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Garcia and Uhlenbeck, 2008)
	RRP3	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Garcia and Uhlenbeck, 2008)
SNR10	snoRNP de la familia A/ACA Box. Participa además en la pseudouridilación del pre-ARNr	No	(Watkins and Bohnsack, 2012)	
SNR30	snoRNP de la familia A/ACA Box	Sí	(Watkins and Bohnsack, 2012)	
UTP1-17	Forman parte del Procesoma de 40S	Sí	(Dragon <i>et al.</i> , 2002) (Krogan <i>et al.</i> , 2004)	
U3	snoRNP de la familia C/D Box	Sí	(Watkins and	

				Bohnsack, 2012)
	U14	snoRNP de la familia C/D Box. Participa además en la 2'-O-metilación del pre-ARNr	Sí	(Watkins and Bohnsack, 2012)
Procesamiento de pre-partículas 66S				
Cortes A ₀ , A ₁ , A ₂ y A ₃ (etapa temprana)	BMS1	GTPasa. Interviene también en el procesamiento de pre-43S	Sí	(Karbstein <i>et al.</i> , 2005)
	BRX1	Proteína de unión al ARNr. Es un Factor A ₃	Sí	(Shimoji <i>et al.</i> , 2012)
	CBF5	Subunidad catalítica de los snoRNP H/ACA con función pseudouridina-sintasa	Sí	(Lafontaine <i>et al.</i> , 1998)
	CIC1/NSA3	Participa en el reordenamiento del pre-ARNr. Factores A ₃	Sí	(Fatica <i>et al.</i> , 2003b)
	DBP2	DEAD-Box ARN Helicasa	No	(Bond <i>et al.</i> , 2001)
	DBP3	DEAD-Box ARN Helicasa	No	(Weaver <i>et al.</i> , 1997)
	DBP6	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Kressler <i>et al.</i> , 1998)
	DBP7	DEAD-Box ARN Helicasa	No	(Daugeron and Linder, 1998)
	DBP9	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Daugeron <i>et al.</i> , 2001)
	DRS1	DEAD-Box ARN Helicasa. Factor A ₃ y Factor B	Sí	(Merl <i>et al.</i> , 2010)
	EBP2	Factor A ₃	Sí	(Shimoji <i>et al.</i> , 2012)
	ERB1	Factor A ₃	Sí	(Pestov <i>et al.</i> , 2001)
	HAS1	DEAD-box ARN-Helicasa que también participa en el procesamiento de pre-43S. Factor A ₃ y Factor B	Sí	(Dembowski <i>et al.</i> , 2013)
	MAK5	DEAD-Box ARN Helicasa	Sí	(Zagulski <i>et al.</i> , 2003)
	MRP	Endonucleasa	Sí	(Lygerou <i>et al.</i> , 1996)
	NOC1	Participa en el transporte intranuclear	Sí	(Milkereit <i>et al.</i> , 2001)
	NOC2	Participa en el transporte intranuclear	Sí	(Milkereit <i>et al.</i> , 2001)
	NOC3	Participa en el transporte intranuclear	Sí	(Milkereit <i>et al.</i> , 2001)
	NOP7	Posee un dominio de unión proteína- proteína. Es un Factor A ₃	Sí	(Adams <i>et al.</i> , 2002)
	NOP8		Sí	(Zanchin and Goldfarb, 1999)
	NOP12	Proteína de unión a ARNr. Es un Factor A ₃	No	(Granneman <i>et al.</i> , 2011)
	NOP15	Participa en el reordenamiento del pre-ARNr. Es un Factor A ₃	Sí	(Oeffinger and Tollervey, 2003)
	NPA1	Factor de ensamblaje muy temprano	Sí	(Dez <i>et al.</i> , 2004)
NPA2		Sí	(Rosado <i>et al.</i> , 2007a)	
NUG1	GTPasa	Sí	(Bassler <i>et al.</i> , 2001)	
PRP43	DEAD-box ARN-Helicasa que también participa en el procesamiento de pre- 43S. Además, está implicada en el proceso de eliminación de intrones	Sí	(Combs <i>et al.</i> , 2006)	

	PWP1	Factor A ₃	Sí	(Sahasranaman <i>et al.</i> , 2011)
	RAT1	5' → 3' ARN Exonucleasa	No	(Oeffinger <i>et al.</i> , 2009)
	RLP7	RLP que guarda el sitio a L7 en el pre-ribosoma 60S. Es un Factor A ₃	Sí	(Babiano <i>et al.</i> , 2013)
	RNT1	Endonucleasa	No	(Kufel <i>et al.</i> , 1999)
	RRP8	Metiltransferasa que metila el ARNr 25S y participa en el procesamiento en A ₂ y de pre-43S	No	(Peifer <i>et al.</i> , 2013)
	RRP17	5' → 3' ARN Exonucleasa. Interviene además en el procesamiento de 25,5 S	Sí	(Oeffinger <i>et al.</i> , 2009)
	RSA3		No	(de la Cruz <i>et al.</i> , 2004)
	XRN1	RNasa	No	(Henry <i>et al.</i> , 1994)
	YTM1	Es un Factor A ₃	Sí	(Miles <i>et al.</i> , 2005)
Corte C ₂ (etapa intermedia)	DBP10	DEAD-box ARN-Helicasa. Es un Factor B	Sí	(Burger <i>et al.</i> , 2000)
	MAK11	Proteína de andamiaje. Es un Factor B	Sí	(Saveanu <i>et al.</i> , 2007)
	NIP7	Proteína de unión al ARNr. Es un Factor B	Sí	(Zanchin <i>et al.</i> , 1997)
	NOG1	GTPasa. Es un Factor B	Sí	(Kallstrom <i>et al.</i> , 2003)
	NOG2	GTPasa. Es un Factor B	Sí	(Saveanu <i>et al.</i> , 2001)
	NOP2	ARN Metil-transferasa. Es un Factor B	Sí	(Hong <i>et al.</i> , 1997)
	NSA2	Proteína de unión al ARNr. Es un Factor B	Sí	(Lebreton <i>et al.</i> , 2006a)
	RLP24	RLP que guarda el sitio a L24 en el pre-ribosoma 60S. Además, es una proteína de unión al ARNr. Es un Factor B	Sí	(Saveanu <i>et al.</i> , 2003)
	RPF2	Proteína de unión al ARNr. Es un Factor B	Sí	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
	RRS1	Participa además en el transporte intranuclear. Es un Factor B	Sí	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
	SPB4	DEAD-box ARN-Helicasa. Es un Factor B	Sí	(Garcia-Gomez <i>et al.</i> , 2011b)
TIF6	Proteína de unión al ARNr. Es un Factor B	Sí	(Basu <i>et al.</i> , 2001)	
Estabilidad 27SB	RIX7	AAA-ATPasa	Sí	(Kressler <i>et al.</i> , 2008)
	NSA1	Favorece la liberación de RIX7 de los pre-ribosomas 60S	Sí	(Kressler <i>et al.</i> , 2008)
Procesamiento 7S y liberación de factores nucleares	REA1	AAA-ATPasa. Favorece la liberación de YTM1 y RSA4 de los pre-ribosoma 60S	Sí	(Bassler <i>et al.</i> , 2010)
	RSA4	Interviene también en el transporte nuclear	Sí	(de la Cruz <i>et al.</i> , 2005)
	MTR4	DEAD-Box ARN-Helicasa	Sí	(de la Cruz <i>et al.</i> , 1998)
Transporte nuclear y citoplasmático	ALB1		No	(Bradatsch <i>et al.</i> , 2012)
	ARX1	Receptor nuclear con papel regulador en la translocación núcleo-citoplasma de los pre-ribosomas 60S	No	(Bradatsch <i>et al.</i> , 2012)
	BUD20		No	(Bassler <i>et al.</i> , 2012)

	CRM1	Receptor de salida nuclear	Sí	(Ho <i>et al.</i> , 2000)
	ECM1	Se une a los pre-ribosomas y a las nucleoporinas para facilitar el transporte	No	(Yao <i>et al.</i> , 2010)
	MEX67	Forma interacciones con las nucleoporinas	No	(Yao <i>et al.</i> , 2007)
	NMD3	Actúa como adaptador y dirige los pre-ribosomas hacia el receptor CRM1	Sí	(Hedges <i>et al.</i> , 2005)
	NOP53		Sí	(Granato <i>et al.</i> , 2008)
Procesamiento 6S	NGL2	Nucleasa	Sí	(Faber <i>et al.</i> , 2002)
	REX1	3'→5' Exoribonucleasa	No	(van Hoof <i>et al.</i> , 2000)
	REX2	3'→5' Exoribonucleasa	No	van Hoof <i>et al.</i> , 2000)
Maduración citoplasmática	DRG1	AAA-ATPasa. Favorece la liberación de NOG1 y RLP24 del pre-ribosoma 60S	Sí	(Pertschy <i>et al.</i> , 2007)
	EFL1/RIA1	GTPasa que favorecen la liberación de TIF6	Sí	(Senger <i>et al.</i> , 2001)
	JJJ1	Favorece la liberación de ARX1 y ALB1 del pre-ribosoma 60S	No	(Greber <i>et al.</i> , 2012)
	LSG1/KRE35	GTPasa que favorece la liberación de NMD3 del pre-ribosoma 60S	Sí	(Hedges <i>et al.</i> , 2005)
	MRT4	RPL que guarda el sitio a P0 en el pre-ribosoma 60S	No	(Rodríguez-Mateos <i>et al.</i> , 2009)
	REI1	Favorece la liberación de ALB1, ARX1 y TIF6 del pre-ribosoma 60S	No	(Parnell and Bass, 2009)
	RRP6	Componente del Exosoma	Sí	(Briggs <i>et al.</i> , 1998)
	SDO1	Participa en la liberación de TIF6		(Senger <i>et al.</i> , 2001)
	SSA1/SSA2	ATPasas que participan en la liberación de ALB1 y ARX1		(Lebreton <i>et al.</i> , 2006b)
	YVH1	Fosfatasa	No	(Kemmler <i>et al.</i> , 2009)

Tabla VI. Reguladores positivos y negativos de la traducción de *GCN4*

REGULADORES POSITIVOS		FUNCIÓN
<i>GCN1</i>		Regulador positivo de GCN2 formando complejo con GCN20
<i>GCN2</i>		Quinasa específica de eIF2 α
<i>GCN3</i>		Subunidad α de eIF2B
<i>GCN20</i>		Regulador positivo de GCN2 formando complejo con GCN1
REGULADORES NEGATIVOS		FUNCIÓN
<i>GCD1</i>		Subunidad γ de eIF2B
<i>GCD2</i>		Subunidad δ de eIF2B
<i>GCD5</i>		Lisil-ARNt sintetasa
<i>GCD6</i>		Subunidad ϵ de eIF2B
<i>GCD7</i>		Subunidad β de eIF2B
<i>GCD10</i>		Junto a GCD14 metilación de la A58 de los ARNt
<i>GCD11</i>		Subunidad γ de eIF2
<i>GCD13</i>		Subunidad C160 de la ARN Polimerasa III
<i>GCD14</i>		Junto a GCD10 metilación de la A58 de los ARNt
<i>GCD15</i>		Subunidad C128 de la ARN Polimerasa III
<i>GCD16</i>		Subunidad C34 de la ARN Polimerasa III
<i>GCD17</i>		Proteína ribosómica L33A de subunidad 60S del ribosoma
<i>GCD18</i>		Gen GUA1 perteneciente a la ruta de biosíntesis de nucleótidos de guanina
<i>SUI1</i>		eIF1
<i>SUI2</i>		Subunidad α de eIF2
<i>SUI3</i>		Subunidad β de eIF2

BIBLIOGRAFIA

- Abastado J. P., Miller P. F., Jackson B. M. and Hinnebusch A. G. 1991. Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control. *Mol Cell Biol.* **11**: 486-96
- Acker M. G., Shin B. S., Dever T. E. and Lorsch J. R. 2006. Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem.* **281**: 8469-75
- Adams C. C., Jakovljevic J., Roman J., Harnpicharnchai P. and Woolford J. L., Jr. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *RNA.* **8**: 150-65
- Addinall S. G., Downey M., Yu M., Zubko M. K., Dewar J., Leake A., Hallinan J., Shaw O., James K., Wilkinson D. J., Wipat A., Durocher D. and Lydall D. 2008. A genomewide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **180**: 2251-66
- Aitken C. E. and Lorsch J. R. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 568-76
- Alani E., Cao L. and Kleckner N. 1987. A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics.* **116**: 541-5
- Albuquerque C. P., Smolka M. B., Payne S. H., Bafna V., Eng J. and Zhou H. 2008. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* **7**: 1389-96
- Algire M. A., Maag D. and Lorsch J. R. 2005. Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell.* **20**: 251-62
- Algire M. A. and Lorsch J. R. 2006. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol.* **10**: 480-6
- Allmang C., Kufel J., Chanfreau G., Mitchell P., Petfalski E. and Tollervey D. 1999. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**: 5399-410
- Allmang C., Mitchell P., Petfalski E. and Tollervey D. 2000. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1684-91
- Anderson J. S. and Parker R. P. 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**: 1497-506
- Anger A. M., Armache J. P., Berninghausen O., Habeck M., Subklewe M., Wilson D. N. and Beckmann R. 2013. Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature.* **497**: 80-5
- Armache J. P., Jarasch A., Anger A. M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Soding J., Westhof E., Wilson D. N. and Beckmann R. 2010. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 19748-53
- Asano K., Clayton J., Shalev A. and Hinnebusch A. G. 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* **14**: 2534-46
- Ashe M. P., De Long S. K. and Sachs A. B. 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol Biol Cell.* **11**: 833-48
- Aspesi A., Pavesi E., Robotti E., Crescitelli R., Boria I., Avondo F., Moniz H., Da Costa L., Mohandas N., Roncaglia P., Ramenghi U., Ronchi A., Gustinich S., Merlin S., Marengo E., Ellis S. R., Follenzi A., Santoro C. and Dianzani I. 2014. Dissecting the transcriptional phenotype of ribosomal protein deficiency: implications for Diamond-Blackfan Anemia. *Gene.* **545**: 282-9
- Babiano R. and de la Cruz J. 2010. Ribosomal protein L35 is required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **38**: 5177-92
- Babiano R., Badis G., Saveanu C., Namane A., Doyen A., Diaz-Quintana A., Jacquier A., Fromont-Racine M. and de la Cruz J. 2013. Yeast ribosomal protein L7 and its homologue Rlp7 are simultaneously present at distinct sites on pre-60S ribosomal particles. *Nucleic Acids Res.* **41**: 9461-70
- Badis G., Fromont-Racine M. and Jacquier A. 2003. A snoRNA that guides the two most conserved pseudouridine modifications within rRNA confers a growth advantage in yeast. *RNA.* **9**: 771-9

- Badis G., Saveanu C., Fromont-Racine M. and Jacquier A. 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell*. **15**: 5-15
- Baker K. E. and Parker R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*. **16**: 293-9
- Balogopal V. and Parker R. 2009. Stm1 modulates mRNA decay and Dhh1 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **181**: 93-103
- Balakin A. G., Smith L. and Fournier M. J. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*. **86**: 823-34
- Balbas P., Soberon X., Merino E., Zurita M., Lomeli H., Valle F., Flores N. and Bolivar F. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. *Gene*. **50**: 3-40
- Ball S. 2011. Diamond Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. **2011**: 487-91
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B. and Steitz T. A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. **289**: 905-20
- Barbosa C., Peixeiro I. and Romao L. 2013. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet*. **9**: e1003529
- Barthelme D., Dinkelaker S., Albers S. V., Londei P., Ermiler U. and Tampe R. 2011. Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**: 3228-33
- Bassler J., Grandi P., Gadal O., Lessmann T., Petfalski E., Tollervy D., Lechner J. and Hurt E. 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell*. **8**: 517-29
- Bassler J., Kallas M., Pertschy B., Ulbrich C., Thoms M. and Hurt E. 2010. The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Mol Cell*. **38**: 712-21
- Bassler J., Klein I., Schmidt C., Kallas M., Thomson E., Wagner M. A., Bradatsch B., Rechberger G., Strohmaier H., Hurt E. and Bergler H. 2012. The conserved Bud20 zinc finger protein is a new component of the ribosomal 60S subunit export machinery. *Mol Cell Biol*. **32**: 4898-912
- Basu U., Si K., Warner J. R. and Maitra U. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* *TIF6* gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol*. **21**: 1453-62
- Bauer J. W., Brandl C., Haubenreisser O., Wimmer B., Weber M., Karl T., Klausegger A., Breitenbach M., Hintner H., von der Haar T., Tuite M. F. and Breitenbach-Koller L. 2013. Specialized yeast ribosomes: a customized tool for selective mRNA translation. *PLoS One*. **8**: e67609
- Becker T., Bhushan S., Jarasch A., Armache J. P., Funes S., Jossinet F., Gumbart J., Mielke T., Berninghausen O., Schulten K., Westhof E., Gilmore R., Mandon E. C. and Beckmann R. 2009. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*. **326**: 1369-73
- Bee A., Ke Y., Forootan S., Lin K., Beesley C., Forrest S. E. and Foster C. S. 2006. Ribosomal protein L19 is a prognostic marker for human prostate cancer. *Clin Cancer Res*. **12**: 2061-5
- Bee A., Brewer D., Beesley C., Dodson A., Forootan S., Dickinson T., Gerard P., Lane B., Yao S., Cooper C. S., Djamgoz M. B., Gosden C. M., Ke Y. and Foster C. S. 2011. siRNA knockdown of ribosomal protein gene *RPL19* abrogates the aggressive phenotype of human prostate cancer. *PLoS One*. **6**: e22672
- Behm-Ansmant I., Kashima I., Rehwinkel J., Sauliere J., Wittkopp N. and Izaurralde E. 2007. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett*. **581**: 2845-53
- Belle A., Tanay A., Bitincka L., Shamir R. and O'Shea E. K. 2006. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 13004-9
- Beltrame M., Henry Y. and Tollervy D. 1994. Mutational analysis of an essential binding site for the U3 snoRNA in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. *Nucleic Acids Res*. **22**: 5139-47
- Ben-Shem A., Jenner L., Yusupova G. and Yusupov M. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*. **330**: 1203-9

- Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G. and Yusupov M. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. **334**: 1524-9
- Bergkessel M., Whitworth G. B. and Guthrie C. 2011. Diverse environmental stresses elicit distinct responses at the level of pre-mRNA processing in yeast. *RNA*. **17**: 1461-78
- Bitterman P. B. and Polunovsky V. A. 2014. eIF4E-mediated translational control of cancer incidence. *Biochim Biophys Acta*.
- Boeke J. D., LaCrute F. and Fink G. R. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*. **197**: 345-6
- Bond A. T., Mangus D. A., He F. and Jacobson A. 2001. Absence of Dbp2p alters both nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing. *Mol Cell Biol*. **21**: 7366-79
- Bosio M. C., Negri R. and Dieci G. 2011. Promoter architectures in the yeast ribosomal expression program. *Transcription*. **2**: 71-77
- Bowie A. G. and Haga I. R. 2005. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol*. **42**: 859-67
- Brachmann C. B., Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P. and Boeke J. D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. **14**: 115-32
- Bradatsch B., Katahira J., Kowalinski E., Bange G., Yao W., Sekimoto T., Baumgartel V., Boese G., Bassler J., Wild K., Peters R., Yoneda Y., Sinning I. and Hurt E. 2007. Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Mol Cell*. **27**: 767-79
- Bradatsch B., Leidig C., Granneman S., Gnadig M., Tollervey D., Bottcher B., Beckmann R. and Hurt E. 2012. Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol*. **19**: 1234-41
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-54
- Breinig F., Tipper D. J. and Schmitt M. J. 2002. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*. **108**: 395-405
- Briand J. F., Navarro F., Gadal O. and Thuriaux P. 2001. Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **21**: 189-95
- Briggs M. W., Burkard K. T. and Butler J. S. 1998. Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J Biol Chem*. **273**: 13255-63
- Brina D., Grosso S., Miluzio A. and Biffo S. 2011. Translational control by 80S formation and 60S availability: the central role of eIF6, a rate limiting factor in cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Cycle*. **10**: 3441-6
- Burger F., Daugeron M. C. and Linder P. 2000. Dbp10p, a putative RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res*. **28**: 2315-23
- Burke D.D., Stearns T. 2000. *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Burroughs L., Woolfrey A. and Shimamura A. 2009. Shwachman-Diamond syndrome: a review of the clinical presentation, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. **23**: 233-48
- Cabañas M. J., Vazquez D. and Modolell J. 1978. Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur J Biochem*. **87**: 21-7
- Calvo O., Cuesta R., Anderson J., Gutierrez N., Garcia-Barrio M. T., Hinnebusch A. G. and Tamame M. 1999. GCD14p, a repressor of *GCN4* translation, cooperates with Gcd10p and Lhp1p in the maturation of initiator methionyl-tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **19**: 4167-81
- Cardenas D., Revuelta-Cervantes J., Jimenez-Diaz A., Camargo H., Remacha M. and 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**: 4520-9

- Carroll K. and Wickner R. B. 1995. Translation and M1 double-stranded RNA propagation: *MAK18 = RPL41B* and cycloheximide curing. *J Bacteriol.* **177**: 2887-91
- Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. and Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* **407**: 340-8
- Chakrabarti S., Jayachandran U., Bonneau F., Fiorini F., Basquin C., Domcke S., Le Hir H. and Conti E. 2011. Molecular mechanisms for the RNA-dependent ATPase activity of Upf1 and its regulation by Upf2. *Mol Cell.* **41**: 693-703
- Chamieh H., Ballut L., Bonneau F. and Le Hir H. 2008. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol.* **15**: 85-93
- Chan S. W. and Egan P. A. 2005. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *FASEB J.* **19**: 1510-2
- Chandramouli P., Topf M., Menetret J. F., Eswar N., Cannone J. J., Gutell R. R., Sali A. and Akey C. W. 2008. Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution. *Structure.* **16**: 535-48
- Chang Y. F., Imam J. S. and Wilkinson M. F. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem.* **76**: 51-74
- Chaudhuri S., Vyas K., Kapasi P., Komar A. A., Dinman J. D., Barik S. and Mazumder B. 2007. Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation. *RNA.* **13**: 2224-37
- Chen J. J. and London I. M. 1995. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci.* **20**: 105-8
- Chen S. J., Lin G., Chang K. J., Yeh L. S. and Wang C. C. 2008. Translational efficiency of a non-AUG initiation codon is significantly affected by its sequence context in yeast. *J Biol Chem.* **283**: 3173-80
- Cheung Y. N., Maag D., Mitchell S. F., Fekete C. A., Algire M. A., Takacs J. E., Shirokikh N., Pestova T., Lorsch J. R. and Hinnebusch A. G. 2007. Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection *in vivo*. *Genes Dev.* **21**: 1217-30
- Chow C. S., Lamichhane T. N. and Mahto S. K. 2007. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chem Biol.* **2**: 610-9
- Chu S., Archer R. H., Zengel J. M. and Lindahl L. 1994. The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 659-63
- Church G. M. and Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**: 1991-5
- Cigan A. M., Pabich E. K. and Donahue T. F. 1988. Mutational analysis of the *HIS4* translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **8**: 2964-75
- Colley A., Beggs J. D., Tollervey D. and Lafontaine D. L. 2000. Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol.* **20**: 7238-46
- Combs D. J., Nagel R. J., Ares M., Jr. and Stevens S. W. 2006. Prp43p is a DEAH-box spliceosome disassembly factor essential for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* **26**: 523-34
- Conde J. and Fink G. R. 1976. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**: 3651-5
- Cuesta R., Hinnebusch A. G. and Tamame M. 1998. Identification of GCD14 and GCD15, novel genes required for translational repression of GCN4 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **148**: 1007-20
- Czaplinski K., Weng Y., Hagan K. W. and Peltz S. W. 1995. Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA.* **1**: 610-23
- Czaplinski K., Ruiz-Echevarria M. J., Paushkin S. V., Han X., Weng Y., Perlick H. A., Dietz H. C., Ter-Avanesyan M. D. and Peltz S. W. 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* **12**: 1665-77

- Dabeva M. D. and Warner J. R. 1993. Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. *J Biol Chem.* **268**: 19669-74
- Daugeron M. C. and Linder P. 1998. Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. *RNA.* **4**: 566-81
- Daugeron M. C., Kressler D. and Linder P. 2001. Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p. *RNA.* **7**: 1317-34
- de la Cruz J., Kressler D., Tollervey D. and Linder P. 1998. Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 1128-40
- de la Cruz J., Lacombe T., Deloche O., Linder P. and Kressler D. 2004. The putative RNA helicase Dbp6p functionally interacts with Rpl3p, Nop8p and the novel trans-acting Factor Rsa3p during biogenesis of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **166**: 1687-99
- de la Cruz J., Sanz-Martinez E. and Remacha M. 2005. The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res.* **33**: 5728-39
- de Las Heras-Rubio A., Perucho L., Paciucci R., Vilardell J. and Lleonart M. E. 2013. Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **33**: 115-41
- Decatur W. A. and Fournier M. J. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci.* **27**: 344-51
- Dechampsme A. M., Koroleva O., Leger-Silvestre I., Gas N. and Camier S. 1999. Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. *J Cell Biol.* **145**: 1369-80
- DeLabre M. L., Kessl J., Karamanou S. and Trumpower B. L. 2002. *RPL29* codes for a non-essential protein of the 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae* and exhibits synthetic lethality with mutations in genes for proteins required for subunit coupling. *Biochim Biophys Acta.* **1574**: 255-61
- Dembowski J. A., Kuo B. and Woolford J. L., Jr. 2013. Has1 regulates consecutive maturation and processing steps for assembly of 60S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res.* **41**: 7889-904
- Deplazes A., Mockli N., Luke B., Auerbach D. and Peter M. 2009. Yeast Uri1p promotes translation initiation and may provide a link to cotranslational quality control. *EMBO J.* **28**: 1429-41
- Deshmukh M., Tsay Y. F., Paulovich A. G. and Woolford J. L., Jr. 1993. Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol.* **13**: 2835-45
- Deutschbauer A. M., Jaramillo D. F., Proctor M., Kumm J., Hillenmeyer M. E., Davis R. W., Nislow C. and Giaever G. 2005. Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast. *Genetics.* **169**: 1915-25
- Dever T. E., Feng L., Wek R. C., Cigan A. M., Donahue T. F. and Hinnebusch A. G. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell.* **68**: 585-96
- Dever T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* **108**: 545-56
- Dever T. E. and Green R. 2012. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**: a013706
- Dez C., Froment C., Noaillic-Depeyre J., Monsarrat B., Caizergues-Ferrer M. and Henry Y. 2004. Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol.* **24**: 6324-37
- Dieci G., Ruotolo R., Braglia P., Carles C., Carpentieri A., Amoresano A. and Ottonello S. 2009. Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **379**: 489-93
- Diedrich G., Spahn C. M., Stelzl U., Schafer M. A., Wooten T., Bochkariov D. E., Cooperman B. S., Traut R. R. and Nierhaus K. H. 2000. Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *EMBO J.* **19**: 5241-50
- Dinman J. D., Icho T. and Wickner R. B. 1991. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 174-8

- Dinman J. D. and Wickner R. B. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and *gag/gag-pol* ratio are critical for yeast M₁ double-stranded RNA virus propagation. *J Virol.* **66**: 3669-76
- Donahue T. F. and Cigan A. M. 1988. Genetic selection for mutations that reduce or abolish ribosomal recognition of the HIS4 translational initiator region. *Mol Cell Biol.* **8**: 2955-63
- Dong J., Nanda J. S., Rahman H., Pruitt M. R., Shin B. S., Wong C. M., Lorsch J. R. and Hinnebusch A. G. 2008. Genetic identification of yeast 18S rRNA residues required for efficient recruitment of initiator tRNA(Met) and AUG selection. *Genes Dev.* **22**: 2242-55
- Dorris D. R., Erickson F. L. and Hannig E. M. 1995. Mutations in *GCD11*, the structural gene for eIF-2 gamma in yeast, alter translational regulation of *GCN4* and the selection of the start site for protein synthesis. *EMBO J.* **14**: 2239-49
- Dragon F., Gallagher J. E., Compagnone-Post P. A., Mitchell B. M., Porwancher K. A., Wehner K. A., Wormsley S., Settlege R. E., Shabanowitz J., Osheim Y., Beyer A. L., Hunt D. F. and Baserga S. J. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature.* **417**: 967-70
- Dresios J., Derkatch I. L., Liebman S. W. and Synetos D. 2000. Yeast ribosomal protein L24 affects the kinetics of protein synthesis and ribosomal protein L39 improves translational accuracy, while mutants lacking both remain viable. *Biochemistry.* **39**: 7236-44
- Dresios J., Panopoulos P., Suzuki K. and Synetos D. 2003. A dispensable yeast ribosomal protein optimizes peptidyltransferase activity and affects translocation. *J Biol Chem.* **278**: 3314-22
- Dressman M. A., Baras A., Malinowski R., Alvis L. B., Kwon I., Walz T. M. and Polymeropoulos M. H. 2003. Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer. *Cancer Res.* **63**: 2194-9
- Dunbar D. A., Wormsley S., Agentis T. M. and Baserga S. J. 1997. Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Mol Cell Biol.* **17**: 5803-12
- Dutca L. M., Gallagher J. E. and Baserga S. J. 2011. The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by *in vivo* chemical probing. *Nucleic Acids Res.* **39**: 5164-80
- Eisinger D. P., Dick F. A. and Trumpower B. L. 1997. Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Mol Cell Biol.* **17**: 5136-45
- Emery B., de la Cruz J., Rocak S., Deloche O. and Linder P. 2004. Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **52**: 141-58
- Eng F. J. and Warner J. R. 1991. Structural basis for the regulation of splicing of a yeast messenger RNA. *Cell.* **65**: 797-804
- Enyenihi A. H. and Saunders W. S. 2003. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **163**: 47-54
- Faber A. W., Van Dijk M., Raué H. A. and Vos J. C. 2002. Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **8**: 1095-101
- Fairman-Williams M. E., Guenther U. P. and Jankowsky E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol.* **20**: 313-24
- Fatica A., Oeffinger M., Dlakic M. and Tollervey D. 2003a. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol.* **23**: 1798-807
- Fatica A., Oeffinger M., Tollervey D. and Bozzoni I. 2003b. Cic1p/Nsa3p is required for synthesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *RNA.* **9**: 1431-6
- Fatscher T., Boehm V., Weiche B. and Gehring N. H. 2014. The interaction of cytoplasmic poly(A)-binding protein with eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay. *RNA.* **20**: 1579-92
- Feinberg A. P. and Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**: 6-13
- Feinberg A. P. and Vogelstein B. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem.* **137**: 266-7

- Felici F., Cesareni G. and Hughes J. M. 1989. The most abundant small cytoplasmic RNA of *Saccharomyces cerevisiae* has an important function required for normal cell growth. *Mol Cell Biol.* **9**: 3260-8
- Fernandez-Pevida A., Rodriguez-Galan O., Diaz-Quintana A., Kressler D. and de la Cruz J. 2012. Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation. *J Biol Chem.* **287**: 38390-407
- Ferreira-Cerca S., Poll G., Gleizes P. E., Tschochner H. and Milkereit P. 2005. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell.* **20**: 263-75
- Ferreira-Cerca S., Poll G., Kuhn H., Neueder A., Jakob S., Tschochner H. and Milkereit P. 2007. Analysis of the *in vivo* assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol Cell.* **28**: 446-57
- Fewell S. W. and Woolford J. L., Jr. 1999. Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to *RPS14B* pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol Cell Biol.* **19**: 826-34
- Filetici P., Junakovic N. and Ballario P. 1985. Rapid alkaline preparation for yeast circular covalently closed DNA molecules. *Curr Genet.* **9**: 123-6
- Finberg R. W. and Kurt-Jones E. A. 2004. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect.* **6**: 1356-60
- Fleischer T. C., Weaver C. M., McAfee K. J., Jennings J. L. and Link A. J. 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* **20**: 1294-307
- Foiani M., Cigan A. M., Paddon C. J., Harashima S. and Hinnebusch A. G. 1991. GCD2, a translational repressor of the *GCN4* gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **11**: 3203-16
- Fournier M. J. and Maxwell E. S. 1993. The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem Sci.* **18**: 131-5
- French S. L., Osheim Y. N., Cioci F., Nomura M. and Beyer A. L. 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol.* **23**: 1558-68
- Gadal O., Strauss D., Kessl J., Trumppower B., Tollervey D. and Hurt E. 2001. Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol.* **21**: 3405-15
- Galani K., Nissan T. A., Petfalski E., Tollervey D. and Hurt E. 2004. Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J Biol Chem.* **279**: 55411-8
- Gallagher J. E., Dunbar D. A., Granneman S., Mitchell B. M., Osheim Y., Beyer A. L. and Baserga S. J. 2004. RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev.* **18**: 2506-17
- Gamalinda M., Jakovljevic J., Babiano R., Talkish J., de la Cruz J. and Woolford J. L., Jr. 2013. Yeast polypeptide exit tunnel ribosomal proteins L17, L35 and L37 are necessary to recruit late-assembling factors required for 27SB pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* **41**: 1965-83
- Gamalinda M., Ohmayer U., Jakovljevic J., Kumcuoglu B., Woolford J., Mbom B., Lin L. and Woolford J. L., Jr. 2014. A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev.* **28**: 198-210
- Gamalinda M. and Woolford J. L., Jr. 2014. Deletion of L4 domains reveals insights into the importance of ribosomal protein extensions in eukaryotic ribosome assembly. *RNA.* **20**: 1-7
- Garcia I. and Uhlenbeck O. C. 2008. Differential RNA-dependent ATPase activities of four rRNA processing yeast DEAD-box proteins. *Biochemistry.* **47**: 12562-73
- Garcia-Barrio M. T., Naranda T., Vazquez de Aldana C. R., Cuesta R., Hinnebusch A. G., Hershey J. W. and Tamame M. 1995. GCD10, a translational repressor of *GCN4*, is the RNA-binding subunit of eukaryotic translation initiation factor-3. *Genes Dev.* **9**: 1781-96
- Garcia-Barrio M., Dong J., Ufano S. and Hinnebusch A. G. 2000. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* **19**: 1887-99

- Garcia-Barrio M., Dong J., Cherkasova V. A., Zhang X., Zhang F., Ufano S., Lai R., Qin J. and Hinnebusch A. G. 2002. Serine 577 is phosphorylated and negatively affects the tRNA binding and eIF2 α kinase activities of GCN2. *J Biol Chem.* **277**: 30675-83
- Garcia-Gomez J. J., Babiano R., Lebaron S., Froment C., Monsarrat B., Henry Y. and de la Cruz J. 2011a. Nop6, a component of 90S pre-ribosomal particles, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* **8**: 112-24
- Garcia-Gomez J. J., Lebaron S., Froment C., Monsarrat B., Henry Y. and de la Cruz J. 2011b. Dynamics of the putative RNA helicase Spb4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **31**: 4156-64
- Garcia-Gomez J. J., Fernandez-Pevada A., Lebaron S., Rosado I. V., Tollervey D., Kressler D. and de la Cruz J. 2014. Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3. *PLoS Genet.* **10**: e1004205
- Garcia-Marcos A., Sanchez S. A., Parada P., Eid J., Jameson D. M., Remacha M., Gratton E. and Ballesta J. P. 2008. Yeast ribosomal stalk heterogeneity *in vivo* shown by two-photon FCS and molecular brightness analysis. *Biophys J.* **94**: 2884-90
- Garre E., Romero-Santacreu L., Barneo-Muñoz M., Miguel A., Perez-Ortin J. E. and Alepuz P. 2013. Nonsense-mediated mRNA decay controls the changes in yeast ribosomal protein pre-mRNAs levels upon osmotic stress. *PLoS One.* **8**: e61240
- Gartmann M., Blau M., Armache J. P., Mielke T., Topf M. and Beckmann R. 2010. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J Biol Chem.* **285**: 14848-51
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D. and Brown P. O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **11**: 4241-57
- Gazda H. T., Preti M., Sheen M. R., O'Donohue M. F., Vlachos A., Davies S. M., Kattamis A., Doherty L., Landowski M., Burros C., Ghazvinian R., Sieff C. A., Newburger P. E., Niewiadomska E., Matysiak M., Glader B., Atsidaftos E., Lipton J. M., Gleizes P. E. and Beggs A. H. 2012. Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat.* **33**: 1037-44
- Gebauer F. and Hentze M. W. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 827-35
- Geerlings T. H., Vos J. C. and Raue H. A. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA.* **6**: 1698-703
- Ghaemmaghami S., Huh W. K., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E. K. and Weissman J. S. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* **425**: 737-41
- Ghosh A., Jindal S., Bentley A. A., Hinnebusch A. G. and Komar A. A. 2014. Rps5-Rps16 communication is essential for efficient translation initiation in yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **42**: 8537-55
- Gietz R. D. and Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**: 527-34
- Gietz D., St Jean A., Woods R. A. and Schiestl R. H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1425
- Gietz R. D., Schiestl R. H., Willems A. R. and Woods R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* **11**: 355-60
- Gilbert W. V. 2011. Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci.* **36**: 127-32
- Girard J. P., Lehtonen H., Caizergues-Ferrer M., Amalric F., Tollervey D. and Lapeyre B. 1992. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* **11**: 673-82
- Goehring A. S., Mitchell D. A., Tong A. H., Keniry M. E., Boone C. and Sprague G. F., Jr. 2003. Synthetic lethal analysis implicates Ste20p, a p21-activated protein kinase, in polarisome activation. *Mol Biol Cell.* **14**: 1501-16
- Gonzalez A., Jimenez A., Vazquez D., Davies J. E. and Schindler D. 1978. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* **521**: 459-69

- Granato D. C., Machado-Santelli G. M. and Oliveira C. C. 2008. Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J.* **275**: 4164-78
- Grandi P., Rybin V., Bassler J., Petfalski E., Strauss D., Marzioch M., Schafer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervey D., Gavin A. C. and Hurt E. 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell.* **10**: 105-15
- Granneman S. and Baserga S. J. 2004. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res.* **296**: 43-50
- Granneman S., Lin C., Champion E. A., Nandineni M. R., Zorca C. and Baserga S. J. 2006. The nucleolar protein Esf2 interacts directly with the DEXD/H box RNA helicase, Dbp8, to stimulate ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res.* **34**: 3189-99
- Granneman S., Petfalski E. and Tollervey D. 2011. A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J.* **30**: 4006-19
- Grant C. M. and Hinnebusch A. G. 1994. Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in *GCN4* translational control. *Mol Cell Biol.* **14**: 606-18
- Grant C. M., Miller P. F. and Hinnebusch A. G. 1994. Requirements for intergenic distance and level of eukaryotic initiation factor 2 activity in reinitiation on *GCN4* mRNA vary with the downstream cistron. *Mol Cell Biol.* **14**: 2616-28
- Greber B. J., Boehringer D., Montellese C. and Ban N. 2012. Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 1228-33
- Grollman A. P. 1967. Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem.* **242**: 3226-33
- Gruhler A., Olsen J. V., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman N. J., Mann M. and Jensen O. N. 2005. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics.* **4**: 310-27
- Gudipati R. K., Neil H., Feuerbach F., Malabat C. and Jacquier A. 2012. The yeast *RPL9B* gene is regulated by modulation between two modes of transcription termination. *EMBO J.* **31**: 2427-37
- Haarer B., Viggiano S., Hibbs M. A., Troyanskaya O. G. and Amberg D. C. 2007. Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes Dev.* **21**: 148-59
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-80
- Hansen J. L., Moore P. B. and Steitz T. A. 2003. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol.* **330**: 1061-75
- Harashima S. and Hinnebusch A. G. 1986. Multiple *GCD* genes required for repression of *GCN4*, a transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **6**: 3990-8
- Harding H. P., Zhang Y. and Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* **397**: 271-4
- Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* **6**: 1099-108
- Harnpicharnchai P., Jakovljevic J., Horsey E., Miles T., Roman J., Rout M., Meagher D., Imai B., Guo Y., Brame C. J., Shabanowitz J., Hunt D. F. and Woolford J. L., Jr. 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell.* **8**: 505-15
- Hart K., Klein T. and Wilcox M. 1993. A Minute encoding a ribosomal protein enhances wing morphogenesis mutants. *Mech Dev.* **43**: 101-10
- Hartwell L. H. and McLaughlin C. S. 1969. A mutant of yeast apparently defective in the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **62**: 468-74
- Hatakeyama T., Kaufmann F. and Schroeter B. 1989. Primary structures of five ribosomal proteins from the archaeobacterium *Halobacterium marismortui* and their structural relationships to eubacterial and eukaryotic ribosomal proteins. *Eur J Biochem.* **185**: 685-93

- Hausner T. P., Geigenmuller U. and Nierhaus K. H. 1988. The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin. *J Biol Chem.* **263**: 13103-11
- Hedges J., West M. and Johnson A. W. 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J.* **24**: 567-79
- Helser T. L., Baan R. A. and Dahlberg A. E. 1981. Characterization of a 40S ribosomal subunit complex in polyribosomes of *Saccharomyces cerevisiae* treated with cycloheximide. *Mol Cell Biol.* **1**: 51-7
- Henry Y., Wood H., Morrissey J. P., Petfalski E., Kearsey S. and Tollervy D. 1994. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* **13**: 2452-63
- Hermann-Le Denmat S., Sipiczki M. and Thuriaux P. 1994. Suppression of yeast RNA polymerase III mutations by the URP2 gene encoding a protein homologous to the mammalian ribosomal protein S20. *J Mol Biol.* **240**: 1-7
- Hinnebusch A. G. and Fink G. R. 1983. Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 5374-8
- Hinnebusch A. G. 1984. Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**: 6442-6
- Hinnebusch A. G. 1985. A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **5**: 2349-60
- Hinnebusch A. G. 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **52**: 248-73
- Hinnebusch, A. G. 1992. General and pathway-specific regulatory mechanism controlling the synthesis of amino acid biosynthesis enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae : Gene expression. Vol 2. pp 319-414.* Strathern, J.N., Jones, E.W. y Broach, J.R., ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hinnebusch A. G. 1994. The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. *Semin Cell Biol.* **5**: 417-26
- Hinnebusch, A. G. 1996. Translational control of *GCN4*: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2. pp199-244. In *Translational control. J.W.B. Hershey, Mathews, M.B. Sonenberg, N., ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.*
- Hinnebusch A. G. and Natarajan K. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell.* **1**: 22-32
- Hinnebusch A. G. 2005. Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* **59**: 407-50
- Hinnebusch A. G. 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci.* **31**: 553-62
- Hinnebusch A. G. 2011. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75**: 434-67, first page of table of contents
- Hinnebusch A. G. 2014. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annu Rev Biochem.* **83**: 779-812
- Hiraishi H., Shin B. S., Udagawa T., Nemoto N., Chowdhury W., Graham J., Cox C., Reid M., Brown S. J. and Asano K. 2013. Interaction between 25S rRNA A loop and eukaryotic translation initiation factor 5B promotes subunit joining and ensures stringent AUG selection. *Mol Cell Biol.* **33**: 3540-8
- Ho J. H. and Johnson A. W. 1999. NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**: 2389-99
- Ho J. H., Kallstrom G. and Johnson A. W. 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol.* **151**: 1057-66
- Hoareau-Aveilla C., Fayet-Lebaron E., Jady B. E., Henras A. K. and Kiss T. 2012. Utp23p is required for dissociation of snR30 small nucleolar RNP from preribosomal particles. *Nucleic Acids Res.* **40**: 3641-52

- Hoffman C. S. and Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. **57**: 267-72
- Hogg J. R. and Goff S. P. 2010. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell*. **143**: 379-89
- Holmes D. S. and Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. **114**: 193-7
- Hong B., Brockenbrough J. S., Wu P. and Aris J. P. 1997. Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol Cell Biol*. **17**: 378-88
- Hong M., Kim H. and Kim I. 2014. Ribosomal protein L19 overexpression activates the unfolded protein response and sensitizes MCF7 breast cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. **450**: 673-8
- Horn D. M., Mason S. L. and Karbstein K. 2011. Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *J Biol Chem*. **286**: 34082-7
- Horos R. and von Lindern M. 2012. Molecular mechanisms of pathology and treatment in Diamond Blackfan Anaemia. *Br J Haematol*. **159**: 514-27
- Houseley J. and Tollervey D. 2006. Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Rep*. **7**: 205-11
- Hsu C. L. and Stevens A. 1993. Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol Cell Biol*. **13**: 4826-35
- Hu J., Li H. and Zhang J. 2010. Analysis of transcriptional synergy between upstream regions and introns in ribosomal protein genes of yeast. *Comput Biol Chem*. **34**: 106-14
- Huang C. J., Chien C. C., Yang S. H., Chang C. C., Sun H. L., Cheng Y. C., Liu C. C., Lin S. C. and Lin C. M. 2008. Faecal ribosomal protein L19 is a genetic prognostic factor for survival in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. **12**: 1936-43
- Hughes J. M. and Ares M., Jr. 1991. Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J*. **10**: 4231-9
- Hung N. J. and Johnson A. W. 2006. Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **26**: 3718-27
- Hung N. J., Lo K. Y., Patel S. S., Helmke K. and Johnson A. W. 2008. Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast. *Mol Biol Cell*. **19**: 735-44
- Hurt E., Hannus S., Schmelzl B., Lau D., Tollervey D. and Simos G. 1999. A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol*. **144**: 389-401
- Ide S., Miyazaki T., Maki H. and Kobayashi T. 2010. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*. **327**: 693-6
- Iglesias-Gato D., Martin-Marcos P., Santos M. A., Hinnebusch A. G. and Tamame M. 2011. Guanine nucleotide pool imbalance impairs multiple steps of protein synthesis and disrupts *GCN4* translational control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **187**: 105-22
- Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G. and Philippe M. 2003. Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol Cell*. **95**: 195-209
- Jackson R. J., Hellen C. U. and Pestova T. V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**: 113-27
- Jacobson A. and Peltz S. W. 1996. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. **65**: 693-739
- Jakob S., Ohmayer U., Neueder A., Hierlmeier T., Perez-Fernandez J., Hochmuth E., Deutzmann R., Griesenbeck J., Tschochner H. and Milkereit P. 2012. Interrelationships between yeast ribosomal protein assembly events and transient ribosome biogenesis factors interactions in early pre-ribosomes. *PLoS One*. **7**: e32552

- Jakovljevic J., de Mayolo P. A., Miles T. D., Nguyen T. M., Leger-Silvestre I., Gas N. and Woolford J. L., Jr. 2004. The carboxy-terminal extension of yeast ribosomal protein S14 is necessary for maturation of 43S preribosomes. *Mol Cell*. **14**: 331-42
- Jakovljevic J., Ohmayer U., Gamalinda M., Talkish J., Alexander L., Linnemann J., Milkereit P. and Woolford J. L., Jr. 2012. Ribosomal proteins L7 and L8 function in concert with six A(3) assembly factors to propagate assembly of domains I and II of 25S rRNA in yeast 60S ribosomal subunits. *RNA*. **18**: 1805-22
- Jenner L., Melnikov S., Garreau de Loubresse N., Ben-Shem A., Iskakova M., Urzhumtsev A., Meskauskas A., Dinman J., Yusupova G. and Yusupov M. 2012. Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr Opin Struct Biol*. **22**: 759-67
- Johnston M. and Davis R. W. 1984. Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **4**: 1440-8
- Jia M. H., Larossa R. A., Lee J. M., Rafalski A., Derose E., Gonye G. and Xue Z. 2000. Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol Genomics*. **3**: 83-92
- Joncourt R., Eberle A. B., Rufener S. C. and Muhlemann O. 2014. Eukaryotic Initiation Factor 4G Suppresses Nonsense-Mediated mRNA Decay by Two Genetically Separable Mechanisms. *PLoS One*. **9**: e104391
- Jones D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*. **292**: 195-202
- Jones D. T. and Ward J. J. 2003. Prediction of disordered regions in proteins from position specific score matrices. *Proteins*. **53 Suppl 6**: 573-8
- Jorgensen P., Rupes I., Sharom J. R., Schnepfer L., Broach J. R. and Tyers M. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*. **18**: 2491-505
- Joo Y. J., Kim J. H., Kang U. B., Yu M. H. and Kim J. 2011. Gcn4p-mediated transcriptional repression of ribosomal protein genes under amino-acid starvation. *EMBO J*. **30**: 859-72
- Jouffe C., Cretenet G., Symul L., Martin E., Atger F., Naef F. and Gachon F. 2013. The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol*. **11**: e1001455
- Kallstrom G., Hedges J. and Johnson A. 2003. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol*. **23**: 4344-55
- Kamita M., Kimura Y., Ino Y., Kamp R. M., Polevoda B., Sherman F. and Hirano H. 2011. N(alpha)-Acetylation of yeast ribosomal proteins and its effect on protein synthesis. *J Proteomics*. **74**: 431-41
- Kappel L., Loibl M., Zisser G., Klein I., Fruhmann G., Gruber C., Unterweger S., Rechberger G., Pertschy B. and Bergler H. 2012. Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *J Cell Biol*. **199**: 771-82
- Karbstein K., Jonas S. and Doudna J. A. 2005. An essential GTPase promotes assembly of preribosomal RNA processing complexes. *Mol Cell*. **20**: 633-43
- Karbstein K. 2011. Inside the 40S ribosome assembly machinery. *Curr Opin Chem Biol*. **15**: 657-63
- Karbstein K. 2013. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol*. **23**: 242-50
- Kellis M., Birren B. W. and Lander E. S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **428**: 617-24
- Kemmler S., Occhipinti L., Veisu M. and Panse V. G. 2009. Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *J Cell Biol*. **186**: 863-80
- Kennedy B. K. and Kaeberlein M. 2009. Hot topics in aging research: protein translation, 2009. *Aging Cell*. **8**: 617-23
- Kervestin S., Li C., Buckingham R. and Jacobson A. 2012. Testing the faux-UTR model for NMD: analysis of Upf1p and Pab1p competition for binding to eRF3/Sup35p. *Biochimie*. **94**: 1560-71
- Kim T. H., Kim B. H., Yahalom A., Chamovitz D. A. and von Arnim A. G. 2004. Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the *Arabidopsis* translation initiation factor subunit eIF3h. *Plant Cell*. **16**: 3341-56

- Kiss T., Fayet-Lebaron E. and Jady B. E. 2010. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell*. **37**: 597-606
- Klein D. J., Moore P. B. and Steitz T. A. 2004. The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol*. **340**: 141-77
- Klinge S., Voigts-Hoffmann F., Leibundgut M., Arpagaus S. and Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*. **334**: 941-8
- Klinge S., Voigts-Hoffmann F., Leibundgut M. and Ban N. 2012. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci*. **37**: 189-98
- Kolarov J., Kolarova N. and Nelson N. 1990. A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem*. **265**: 12711-6
- Komili S., Farny N. G., Roth F. P. and Silver P. A. 2007. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*. **131**: 557-71
- Kondoh N., Shuda M., Tanaka K., Wakatsuki T., Hada A. and Yamamoto M. 2001. Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. **21**: 2429-33
- Kondrashov N., Pusic A., Stumpf C. R., Shimizu K., Hsieh A. C., Xue S., Ishijima J., Shiroishi T. and Barna M. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*. **145**: 383-97
- Kongsuwan K., Yu Q., Vincent A., Frisardi M. C., Rosbash M., Lengyel J. A. and Merriam J. 1985. A Drosophila Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature*. **317**: 555-8
- Kos M. and Tollervey D. 2010. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell*. **37**: 809-20
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M. and Yanagawa H. 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**: 10171-6
- Kovacs D., Rakacs M., Agoston B., Lenkey K., Semrad K., Schroeder R. and Tompa P. 2009. Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Lett*. **583**: 88-92
- Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*. **108**: 229-41
- Kressler D., de la Cruz J., Rojo M. and Linder P. 1997. Fallp is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **17**: 7283-94
- Kressler D., de la Cruz J., Rojo M. and Linder P. 1998. Dbp6p is an essential putative ATP-dependent RNA helicase required for 60S-ribosomal-subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **18**: 1855-65
- Kressler D., Roser D., Pertschy B. and Hurt E. 2008. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J Cell Biol*. **181**: 935-44
- Kressler D., Hurt E. and Bassler J. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*. **1803**: 673-83
- Kressler D., Hurt E., Bergler H. and Bassler J. 2012. The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation--molecular machines that strip pre-ribosomal particles. *Biochim Biophys Acta*. **1823**: 92-100
- Krogan N. J., Peng W. T., Cagney G., Robinson M. D., Haw R., Zhong G., Guo X., Zhang X., Canadien V., Richards D. P., Beattie B. K., Lalev A., Zhang W., Davierwala A. P., Mnaimneh S., Starostine A., Tikuisis A. P., Grigull J., Datta N., Bray J. E., Hughes T. R., Emili A. and Greenblatt J. F. 2004. High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell*. **13**: 225-39
- Kruiswijk T., Kunst A., Planta R. J. and Mager W. H. 1978. Modification of yeast ribosomal proteins. Methylation. *Biochem J*. **175**: 221-5
- Kruiswijk T., de Hey J. T. and Planta R. J. 1978. Modification of yeast ribosomal proteins. Phosphorylation. *Biochem J*. **175**: 213-9
- Kufel J., Dichtl B. and Tollervey D. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA*. **5**: 909-17
- Kuhle B. and Ficner R. 2014. eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining. *EMBO J*. **33**: 1177-91

- Kuroda K., Takenoyama M., Baba T., Shigematsu Y., Shiota H., Ichiki Y., Yasuda M., Uramoto H., Hanagiri T. and Yasumoto K. 2010. Identification of ribosomal protein L19 as a novel tumor antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **101**: 46-53
- LaCava J., Houseley J., Saveanu C., Petfalski E., Thompson E., Jacquier A. and Tollervey D. 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell.* **121**: 713-24
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-5
- Lafontaine D., Delcour J., Glasser A. L., Desgres J. and Vandenhaute J. 1994. The *DIM1* gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J Mol Biol.* **241**: 492-7
- Lafontaine D. L., Bousquet-Antonelli C., Henry Y., Caizergues-Ferrer M. and Tollervey D. 1998. The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* **12**: 527-37
- Lafontaine D. L. and Tollervey D. 2000. Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol.* **20**: 2650-9
- Lageix S., Rothenburg S., Dever T. E. and Hinnebusch A. G. 2014. Enhanced interaction between pseudokinase and kinase domains in Gcn2 stimulates eIF2alpha phosphorylation in starved cells. *PLoS Genet.* **10**: e1004326
- Lamanna A. C. and Karbstein K. 2011. An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage. *J Mol Biol.* **405**: 3-17
- Lascaris R. F., Mager W. H. and Planta R. J. 1999. DNA-binding requirements of the yeast protein Rap1p as selected in silico from ribosomal protein gene promoter sequences. *Bioinformatics.* **15**: 267-77
- Lebaron S., Schneider C., van Nues R. W., Swiatkowska A., Walsh D., Bottcher B., Granneman S., Watkins N. J. and Tollervey D. 2012. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 744-53
- Lebreton A., Saveanu C., Decourty L., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2006a. Nsa2 is an unstable, conserved factor required for the maturation of 27SB pre-rRNAs. *J Biol Chem.* **281**: 27099-108
- Lebreton A., Saveanu C., Decourty L., Rain J. C., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2006b. A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol.* **173**: 349-60
- Lee S. J. and Baserga S. J. 1997. Functional separation of pre-rRNA processing steps revealed by truncation of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein component, Mpp10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 13536-41
- Lee S. J. and Baserga S. J. 1999. Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. *Mol Cell Biol.* **19**: 5441-52
- LeFebvre A. K., Korneeva N. L., Trutschl M., Cvek U., Duzan R. D., Bradley C. A., Hershey J. W. and Rhoads R. E. 2006. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem.* **281**: 22917-32
- Leger-Silvestre I., Milkereit P., Ferreira-Cerca S., Saveanu C., Rousselle J. C., Choismel V., Guinefoleau C., Gas N. and Gleizes P. E. 2004. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* **23**: 2336-47
- Lemay V., Hossain A., Osheim Y. N., Beyer A. L. and Dragon F. 2011. Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**: 9659-70
- Li C., Ge M., Yin Y., Luo M. and Chen D. 2012. Silencing expression of ribosomal protein L26 and L29 by RNA interfering inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Mol Cell Biochem.* **370**: 127-39
- Liang W. Q. and Fournier M. J. 1995. U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Genes Dev.* **9**: 2433-43
- Liang W. Q., Clark J. A. and Fournier M. J. 1997. The rRNA-processing function of the yeast U14 small nucleolar RNA can be rescued by a conserved RNA helicase-like protein. *Mol Cell Biol.* **17**: 4124-32
- Lindahl L., Archer R. H. and Zengel J. M. 1992. A new rRNA processing mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 295-301

- Lindahl L., Bommanakanti A., Li X., Hayden L., Jones A., Khan M., Oni T. and Zengel J. M. 2009. RNase MRP is required for entry of 35S precursor rRNA into the canonical processing pathway. *RNA*. **15**: 1407-16
- Lindstrom M. S. 2009. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem Biophys Res Commun*. **379**: 167-70
- Liu Y. and Chang A. 2009. A mutant plasma membrane protein is stabilized upon loss of Yvh1, a novel ribosome assembly factor. *Genetics*. **181**: 907-15
- Liu B., Han Y. and Qian S. B. 2013. Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. *Mol Cell*. **49**: 453-63
- Liu X. D., Xie L., Wei Y., Zhou X., Jia B., Liu J. and Zhang S. 2014. Abiotic Stress Resistance, a Novel Moonlighting Function of Ribosomal Protein RPL44 in the Halophilic Fungus *Aspergillus glaucus*. *Appl Environ Microbiol*. **80**: 4294-300
- Lo K. Y., Li Z., Wang F., Marcotte E. M. and Johnson A. W. 2009. Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *J Cell Biol*. **186**: 849-62
- Lo K. Y., Li Z., Bussiere C., Bresson S., Marcotte E. M. and Johnson A. W. 2010. Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell*. **39**: 196-208
- Loar J. W., Seiser R. M., Sundberg A. E., Sagerson H. J., Ilias N., Zobel-Thropp P., Craig E. A. and Lycan D. E. 2004. Genetic and biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **168**: 1877-89
- Lomakin I. B. and Steitz T. A. 2013. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature*. **500**: 307-11
- Lucchini G., Hinnebusch A. G., Chen C. and Fink G. R. 1984. Positive regulatory interactions of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **4**: 1326-33
- Lupas A., Van Dyke M. and Stock J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. **252**: 1162-4
- Lygerou Z., Allmang C., Tollervy D. and Seraphin B. 1996. Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP *in vitro*. *Science*. **272**: 268-70
- Lynch S. R., Gonzalez R. L. and Puglisi J. D. 2003. Comparison of X-ray crystal structure of the 30S subunit-antibiotic complex with NMR structure of decoding site oligonucleotide-paromomycin complex. *Structure*. **11**: 43-53
- Machin N. A., Lee J. M. and Barnes G. 1995. Microtubule stability in budding yeast: characterization and dosage suppression of a benomyl-dependent tubulin mutant. *Mol Biol Cell*. **6**: 1241-59
- Malmstrom L., Riffle M., Strauss C. E., Chivian D., Davis T. N., Bonneau R. and Baker D. 2007. Superfamily assignments for the yeast proteome through integration of structure prediction with the gene ontology. *PLoS Biol*. **5**: e76
- Malygin A. A., Parakhnevitch N. M., Ivanov A. V., Eperon I. C. and Karpova G. G. 2007. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucleic Acids Res*. **35**: 6414-23
- Marchler-Bauer A., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., He S., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Liebert C. A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G. H., Mullokandov M., Song J. S., Tasneem A., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N. and Bryant S. H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*. **37**: D205-10
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Omelchenko M. V., Robertson C. L., Song J. S., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Zheng C. and Bryant S. H. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*. **39**: D225-9
- Marcotrigiano J., Lomakin I. B., Sonenberg N., Pestova T. V., Hellen C. U. and Burley S. K. 2001. A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell*. **7**: 193-203

- Marintchev A., Edmonds K. A., Marintcheva B., Hendrickson E., Oberer M., Suzuki C., Herdy B., Sonenberg N. and Wagner G. 2009. Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell*. **136**: 447-60
- Marmier-Gourrier N., Clery A., Schlotter F., Senty-Segault V. and Branlant C. 2011. A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5'-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**: 9731-45
- Martin H., Rodriguez-Pachon J. M., Ruiz C., Nombela C. and Molina M. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **275**: 1511-9
- Martin R., Straub A. U., Doebele C. and Bohnsack M. T. 2013. DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. *RNA Biol.* **10**: 4-18
- Martin-Marcos P., Hinnebusch A. G. and Tamame M. 2007. Ribosomal protein L33 is required for ribosome biogenesis, subunit joining, and repression of *GCN4* translation. *Mol Cell Biol.* **27**: 5968-85
- Martin-Marcos P., Cheung Y. N. and Hinnebusch A. G. 2011. Functional elements in initiation factors 1, 1A, and 2beta discriminate against poor AUG context and non-AUG start codons. *Mol Cell Biol.* **31**: 4814-31
- Mauro V. P. and Edelman G. M. 2002. The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 12031-6
- Mauro V. P. and Edelman G. M. 2007. The ribosome filter redux. *Cell Cycle.* **6**: 2246-51
- Mayerle M. and Woodson S. A. 2013. Specific contacts between protein S4 and ribosomal RNA are required at multiple stages of ribosome assembly. *RNA.* **19**: 574-85
- Mayes A. E., Verdone L., Legrain P. and Beggs J. D. 1999. Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J.* **18**: 4321-31
- Mazumder B., Sampath P., Seshadri V., Maitra R. K., DiCorleto P. E. and Fox P. L. 2003. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell.* **115**: 187-98
- Melamed D., Eliyahu E. and Arava Y. 2009. Exploring translation regulation by global analysis of ribosomal association. *Methods.* **48**: 301-5
- Melnikov S., Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Jenner L., Yusupova G. and Yusupov M. 2012. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 560-7
- Merl J., Jakob S., Ridinger K., Hierlmeier T., Deutzmann R., Milkereit P. and Tschochner H. 2010. Analysis of ribosome biogenesis factor-modules in yeast cells depleted from pre-ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **38**: 3068-80
- Meskauskas A. and Dinman J. D. 2001. Ribosomal protein L5 helps anchor peptidyl-tRNA to the P-site in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **7**: 1084-96
- Meskauskas A. and Dinman J. D. 2007. Ribosomal protein L3: gatekeeper to the A site. *Mol Cell.* **25**: 877-88
- Meyer A. E., Hung N. J., Yang P., Johnson A. W. and Craig E. A. 2007. The specialized cytosolic J-protein, Jjj1, functions in 60S ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 1558-63
- Meyer M. and Vilardeell J. 2009. The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing. *Brief Funct Genomic Proteomic.* **8**: 60-7
- Miles T. D., Jakovljevic J., Horsey E. W., Harnpicharnchai P., Tang L. and Woolford J. L., Jr. 2005. Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes. *Mol Cell Biol.* **25**: 10419-32
- Milkereit P., Gadal O., Podtelejnikov A., Trumtel S., Gas N., Petfalski E., Tollervey D., Mann M., Hurt E. and Tschochner H. 2001. Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell.* **105**: 499-509
- Miller O. L., Jr. and Beatty B. R. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science.* **164**: 955-7
- Miller J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller P. F. and Hinnebusch A. G. 1989. Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in *GCN4* mRNA determine their distinct functions in translational control. *Genes Dev.* **3**: 1217-25

- Miozzari G., Niederberger P. and Hutter R. 1977. Action of tryptophan analogues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **115**: 307-16
- Mitchell P., Petfalski E. and Tollervey D. 1996. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev.* **10**: 502-13
- Mitchell P. and Tollervey D. 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell.* **11**: 1405-13
- Miyazaki M., Uritani M., Fujimura K., Yamakatsu H., Kageyama T. and Takahashi K. 1988. Peptide elongation factor 1 from yeasts: purification and biochemical characterization of peptide elongation factors 1 alpha and 1 beta (gamma) from *Saccharomyces carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem.* **103**: 508-21
- Miyoshi K., Shirai C. and Mizuta K. 2003. Transcription of genes encoding trans-acting factors required for rRNA maturation/ribosomal subunit assembly is coordinately regulated with ribosomal protein genes and involves Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1969-73
- Moore J. B. t., Farrar J. E., Arceci R. J., Liu J. M. and Ellis S. R. 2010. Distinct ribosome maturation defects in yeast models of Diamond-Blackfan anemia and Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica.* **95**: 57-64
- Morris D. R. and Geballe A. P. 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol.* **20**: 8635-42
- Morrissey J. P. and Tollervey D. 1997. U14 small nucleolar RNA makes multiple contacts with the pre-ribosomal RNA. *Chromosoma.* **105**: 515-22
- Mortimer R. K. and Johnston J. R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics.* **113**: 35-43
- Moy T. I. and Silver P. A. 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* **13**: 2118-33
- Mueller P. P. and Hinnebusch A. G. 1986. Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*. *Cell.* **45**: 201-7
- Mueller P. P., Harashima S. and Hinnebusch A. G. 1987. A segment of *GCN4* mRNA containing the upstream AUG codons confers translational control upon a heterologous yeast transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 2863-7
- Mueller P. P., Grueter P., Hinnebusch A. G. and Trachsel H. 1998. A ribosomal protein is required for translational regulation of *GCN4* mRNA. Evidence for involvement of the ribosome in eIF2 recycling. *J Biol Chem.* **273**: 32870-7
- Muhlemann O. and Jensen T. H. 2012. mRNP quality control goes regulatory. *Trends Genet.* **28**: 70-7
- Muhlrad D. and Parker R. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature.* **370**: 578-81
- Nanda J. S., Cheung Y. N., Takacs J. E., Martin-Marcos P., Saini A. K., Hinnebusch A. G. and Lorsch J. R. 2009. eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol.* **394**: 268-85
- Natarajan K., Meyer M. R., Jackson B. M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A. G. and Marton M. J. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol.* **21**: 4347-68
- Ni L. and Snyder M. 2001. A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **12**: 2147-70
- Nicholson P. and Muhlemann O. 2010. Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem Soc Trans.* **38**: 1615-20
- Nieduszynski C. A., Knox Y. and Donaldson A. D. 2006. Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev.* **20**: 1874-9
- Nishimura T., Wada T. and Okada K. 2004. A key factor of translation reinitiation, ribosomal protein L24, is involved in gynoecium development in *Arabidopsis*. *Biochem Soc Trans.* **32**: 611-3
- Nissan T. A., Bassler J., Petfalski E., Tollervey D. and Hurt E. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* **21**: 5539-47

- Norrander J., Kempe T. and Messing J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. **26**: 101-6
- Oeffinger M. and Tollervey D. 2003. Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *EMBO J.* **22**: 6573-83
- Oeffinger M., Dlakic M. and Tollervey D. 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.* **18**: 196-209
- Oeffinger M., Wei K. E., Rogers R., DeGrasse J. A., Chait B. T., Aitchison J. D. and Rout M. P. 2007. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods*. **4**: 951-6
- Oeffinger M., Zenklusen D., Ferguson A., Wei K. E., El Hage A., Tollervey D., Chait B. T., Singer R. H. and Rout M. P. 2009. Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol Cell*. **36**: 768-81
- Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Tarry M. J., Carter A. P. and Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. **292**: 897-902
- Ohmayer U., Gamalinda M., Sauert M., Ossowski J., Pöll G., Linnemann J., Hierlmeier T., Perez-Fernandez J., Kumcuoglu B., Leger-Silvestre I., Faubladiet M., Griesenbeck J., Woolford J., Tschochner H. and Milkereit P. 2013. Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. *PLoS One*. **8**: e68412
- Ohtake Y. and Wickner R. B. 1995. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol Cell Biol*. **15**: 2772-81
- Osheim Y. N., French S. L., Keck K. M., Champion E. A., Spasov K., Dragon F., Baserga S. J. and Beyer A. L. 2004. Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. **16**: 943-54
- Panse V. G. and Johnson A. W. 2010. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci*. **35**: 260-6
- Parenteau J., Durand M., Veronneau S., Lacombe A. A., Morin G., Guerin V., Cecez B., Gervais-Bird J., Koh C. S., Brunelle D., Wellinger R. J., Chabot B. and Abou Elela S. 2008. Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Mol Biol Cell*. **19**: 1932-41
- Parenteau J., Durand M., Morin G., Gagnon J., Lucier J. F., Wellinger R. J., Chabot B. and Elela S. A. 2011. Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell*. **147**: 320-31
- Parnell K. M. and Bass B. L. 2009. Functional redundancy of yeast proteins Reh1 and Rei1 in cytoplasmic 60S subunit maturation. *Mol Cell Biol*. **29**: 4014-23
- Park H. S., Himmelbach A., Browning K. S., Hohn T. and Ryabova L. A. 2001. A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell*. **106**: 723-33
- Park H. S., Browning K. S., Hohn T. and Ryabova L. A. 2004. Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor. *EMBO J.* **23**: 1381-91
- Park E. H., Walker S. E., Lee J. M., Rothenburg S., Lorsch J. R. and Hinnebusch A. G. 2011. Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1*PABP mRNPs in vivo. *EMBO J.* **30**: 302-16
- Passmore L. A., Schmeing T. M., Maag D., Applefield D. J., Acker M. G., Algire M. A., Lorsch J. R. and Ramakrishnan V. 2007. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell*. **26**: 41-50
- Pearson N. J., Fried H. M. and Warner J. R. 1982. Yeast use translational control to compensate for extra copies of a ribosomal protein gene. *Cell*. **29**: 347-55
- Peifer C., Sharma S., Watzinger P., Lamberth S., Kotter P. and Entian K. D. 2013. Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Res*. **41**: 1151-63
- Peisker K., Braun D., Wolfle T., Hentschel J., Funfschilling U., Fischer G., Sickmann A. and Rospert S. 2008. Ribosome-associated complex binds to ribosomes in close proximity of Rpl31 at the exit of the polypeptide tunnel in yeast. *Mol Biol Cell*. **19**: 5279-88

- Peltz S. W., He F., Welch E. and Jacobson A. 1994. Nonsense-mediated mRNA decay in yeast. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **47**: 271-98
- Perez-Fernandez J., Roman A., De Las Rivas J., Bustelo X. R. and Dosil M. 2007. The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol Cell Biol.* **27**: 5414-29
- Pertschy B., Saveanu C., Zisser G., Lebreton A., Tengg M., Jacquier A., Liebming E., Nobis B., Kappel L., van der Klei I., Hogenauer G., Fromont-Racine M. and Bergler H. 2007. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol Cell Biol.* **27**: 6581-92
- Pestov D. G., Stockelman M. G., Strezoska Z. and Lau L. F. 2001. ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3621-30
- Pestov D. G. and Shcherbik N. 2012. Rapid cytoplasmic turnover of yeast ribosomes in response to rapamycin inhibition of TOR. *Mol Cell Biol.* **32**: 2135-44
- Pestova T. V., Lomakin I. B., Lee J. H., Choi S. K., Dever T. E. and Hellen C. U. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* **403**: 332-5
- Petes T. D. and Botstein D. 1977. Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 5091-5
- Petersson F., Del Rincon S. V. and Miller W. H., Jr. 2014. Eukaryotic translation initiation factor 4E as a novel therapeutic target in hematological malignancies and beyond. *Expert Opin Ther Targets.* **18**: 1035-48
- Philippsen P., Stotz A. and Scherf C. 1991. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**: 169-82
- Pisarev A. V., Skabkin M. A., Pisareva V. P., Skabkina O. V., Rakotondrafara A. M., Hentze M. W., Hellen C. U. and Pestova T. V. 2010. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell.* **37**: 196-210
- Pleiss J. A., Whitworth G. B., Bergkessel M. and Guthrie C. 2007. Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol Cell.* **27**: 928-37
- Plocik A. M. and Guthrie C. 2012. Diverse forms of RPS9 splicing are part of an evolving autoregulatory circuit. *PLoS Genet.* **8**: e1002620
- Poddar D., Basu A., Baldwin W. M., 3rd, Kondratov R. V., Barik S. and Mazumder B. 2013. An extraribosomal function of ribosomal protein L13a in macrophages resolves inflammation. *J Immunol.* **190**: 3600-12
- Poll G., Braun T., Jakovljevic J., Neueder A., Jakob S., Woolford J. L., Jr., Tschochner H. and Milkereit P. 2009. rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PLoS One.* **4**: e8249
- Pospisek M. and Valasek L. 2013. Polysome profile analysis--yeast. *Methods Enzymol.* **530**: 173-81
- Powers T. and Walter P. 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **10**: 987-1000
- Poyry T. A., Kaminski A. and Jackson R. J. 2004. What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev.* **18**: 62-75
- Presutti C., Ciafre S. A. and Bozzoni I. 1991. The ribosomal protein L2 in *S. cerevisiae* controls the level of accumulation of its own mRNA. *EMBO J.* **10**: 2215-21
- Rabl J., Leibundgut M., Ataide S. F., Haag A. and Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science.* **331**: 730-6
- Rajagopal V., Park E. H., Hinnebusch A. G. and Lorsch J. R. 2012. Specific domains in yeast translation initiation factor eIF4G strongly bias RNA unwinding activity of the eIF4F complex toward duplexes with 5'-overhangs. *J Biol Chem.* **287**: 20301-12
- Rakauskaitė R. and Dinman J. D. 2011. Mutations of highly conserved bases in the peptidyltransferase center induce compensatory rearrangements in yeast ribosomes. *RNA.* **17**: 855-64
- Reid G. A. and Schatz G. 1982. Import of proteins into mitochondria. Yeast cells grown in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides. *J Biol Chem.* **257**: 13056-61

- Rhodin M. H. and Dinman J. D. 2010. A flexible loop in yeast ribosomal protein L11 coordinates P-site tRNA binding. *Nucleic Acids Res.* **38**: 8377-89
- Rhodin M. H., Rakauskaite R. and Dinman J. D. 2011. The central core region of yeast ribosomal protein L11 is important for subunit joining and translational fidelity. *Mol Genet Genomics.* **285**: 505-16
- Rodriguez-Cousino N., Gomez P. and Esteban R. 2013. L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl Environ Microbiol.* **79**: 4661-74
- Rodriguez-Galan O., Garcia-Gomez J. J. and de la Cruz J. 2013. Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: current status and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* **1829**: 775-90
- Rodriguez-Mateos M., Garcia-Gomez J. J., Francisco-Velilla R., Remacha M., de la Cruz J. and Ballesta J. P. 2009. Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **37**: 7519-32
- Rolfes R. J. and Hinnebusch A. G. 1993. Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol.* **13**: 5099-111
- Rosado I. V., Dez C., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Henry Y. and de la Cruz J. 2007a. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Npa2p (Urb2p) reveals a low-molecular-mass complex containing Dbp6p, Npa1p (Urb1p), Nop8p, and Rsa3p involved in early steps of 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol.* **27**: 1207-21
- Rosado I. V., Kressler D. and de la Cruz J. 2007b. Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Res.* **35**: 4203-13
- Rout M. P., Blobel G. and Aitchison J. D. 1997. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell.* **89**: 715-25
- Sahasranaman A., Dembowski J., Strahler J., Andrews P., Maddock J. and Woolford J. L., Jr. 2011. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *EMBO J.* **30**: 4020-32
- Sagot I., Schaeffer J. and Daignan-Fornier B. 2005. Guanylic nucleotide starvation affects *Saccharomyces cerevisiae* mother-daughter separation and may be a signal for entry into quiescence. *BMC Cell Biol.* **6**: 24
- Saini A. K., Nanda J. S., Lorsch J. R. and Hinnebusch A. G. 2010. Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection by modulating tRNA(i)(Met) binding to the ribosome. *Genes Dev.* **24**: 97-110
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold spring harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Sattlegger E. and Hinnebusch A. G. 2005. Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation. *J Biol Chem.* **280**: 16514-21
- Saveanu C., Bienvenu D., Namane A., Gleizes P. E., Gas N., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.* **20**: 6475-84
- Saveanu C., Namane A., Gleizes P. E., Lebreton A., Rousselle J. C., Noaillic-Depeyre J., Gas N., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2003. Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol.* **23**: 4449-60
- Saveanu C., Rousselle J. C., Lenormand P., Namane A., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2007. The p21-activated protein kinase inhibitor Skb15 and its budding yeast homologue are 60S ribosome assembly factors. *Mol Cell Biol.* **27**: 2897-909
- Schaap P. J., van't Riet J., Woldringh C. L. and Raue H. A. 1991. Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* **221**: 225-37
- Schafer T., Strauss D., Petfalski E., Tollervey D. and Hurt E. 2003. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* **22**: 1370-80
- Schmitt M. E., Brown T. A. and Trumpower B. L. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3091-2

- Schmitt M. E. and Clayton D. A. 1993. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13**: 7935-41
- Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. and Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell.* **102**: 615-23
- Searfoss A., Dever T. E. and Wickner R. 2001. Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol.* **21**: 4900-8
- Seiser R. M., Sundberg A. E., Wollam B. J., Zobel-Thropp P., Baldwin K., Spector M. D. and Lycan D. E. 2006. Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **174**: 679-91
- Senger B., Lafontaine D. L., Graindorge J. S., Gadal O., Camasses A., Sanni A., Garnier J. M., Breitenbach M., Hurt E. and Fasiolo F. 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell.* **8**: 1363-73
- Sengupta J., Bussiere C., Pallesen J., West M., Johnson A. W. and Frank J. 2010. Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *J Cell Biol.* **189**: 1079-86
- Serrano R., Martin H., Casamayor A. and Arino J. 2006. Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slf2 MAPK pathway. *J Biol Chem.* **281**: 39785-95
- Shalgi R., Hurt J. A., Krykbaeva I., Taipale M., Lindquist S. and Burge C. B. 2013. Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Mol Cell.* **49**: 439-52
- Shannon K. W. and Rabinowitz J. C. 1988. Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* MIS1 gene encoding mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. *J Biol Chem.* **263**: 7717-25
- Shenton D., Smirnova J. B., Selley J. N., Carroll K., Hubbard S. J., Pavitt G. D., Ashe M. P. and Grant C. M. 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem.* **281**: 29011-21
- Shimoji K., Jakovljevic J., Tsuchihashi K., Umeki Y., Wan K., Kawasaki S., Talkish J., Woolford J. L., Jr. and Mizuta K. 2012. Ebp2 and Brx1 function cooperatively in 60S ribosomal subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **40**: 4574-88
- Shoemaker C. J. and Green R. 2012. Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 594-601
- Shore D. and Nasmyth K. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell.* **51**: 721-32
- Shuda M., Kondoh N., Tanaka K., Ryo A., Wakatsuki T., Hada A., Goseki N., Igari T., Hatsuse K., Aihara T., Horiuchi S., Shichita M., Yamamoto N. and Yamamoto M. 2000. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* **20**: 2489-94
- Sikorski R. S. and Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **122**: 19-27
- Simoff I., Moradi H. and Nygard O. 2009. Functional characterization of ribosomal protein L15 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **55**: 111-25
- Singh C. R., Lee B., Udagawa T., Mohammad-Qureshi S. S., Yamamoto Y., Pavitt G. D. and Asano K. 2006. An eIF5/eIF2 complex antagonizes guanine nucleotide exchange by eIF2B during translation initiation. *EMBO J.* **25**: 4537-46
- Singh G., Rebbapragada I. and Lykke-Andersen J. 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* **6**: e111
- Sok J., Wang X. Z., Batchvarova N., Kuroda M., Harding H. and Ron D. 1999. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol.* **19**: 495-504
- Sonenberg N. and Dever T. E. 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol.* **13**: 56-63

- Sonenberg N. and Hinnebusch A. G. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. **136**: 731-45
- Song J. M., Cheung E. and Rabinowitz J. C. 1996. Organization and characterization of the two yeast ribosomal protein *YL19* genes. *Curr Genet*. **30**: 273-8
- Sood R., Porter A. C., Olsen D. A., Cavener D. R. and Wek R. C. 2000. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics*. **154**: 787-801
- Soudet J., Gelugne J. P., Belhabich-Baumas K., Caizergues-Ferrer M. and Mougou A. 2010. Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **29**: 80-92
- Spahn C. M., Beckmann R., Eswar N., Penczek P. A., Sali A., Blobel G. and Frank J. 2001. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*. **107**: 373-86
- Spahn C. M., Gomez-Lorenzo M. G., Grassucci R. A., Jorgensen R., Andersen G. R., Beckmann R., Penczek P. A., Ballesta J. P. and Frank J. 2004. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J*. **23**: 1008-19
- Spriggs K. A., Bushell M. and Willis A. E. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*. **40**: 228-37
- Staley J. P. and Woolford J. L., Jr. 2009. Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Curr Opin Cell Biol*. **21**: 109-18
- Steffen K. K., McCormick M. A., Pham K. M., MacKay V. L., Delaney J. R., Murakami C. J., Kaerberlein M. and Kennedy B. K. 2012. Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **191**: 107-18
- Straight A. F., Marshall W. F., Sedat J. W. and Murray A. W. 1997. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science*. **277**: 574-8
- Strunk B. S., Loucks C. R., Su M., Vashisth H., Cheng S., Schilling J., Brooks C. L., 3rd, Karbstein K. and Skiniotis G. 2011. Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science*. **333**: 1449-53
- Strunk B. S., Novak M. N., Young C. L. and Karbstein K. 2012. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell*. **150**: 111-21
- Sulima S. O., Gulay S. P., Anjos M., Patchett S., Meskauskas A., Johnson A. W. and Dinman J. D. 2014. Eukaryotic rpL10 drives ribosomal rotation. *Nucleic Acids Res*. **42**: 2049-63
- Switzer R. C., 3rd, Merrill C. R. and Shifrin S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. **98**: 231-7
- Sydorsky Y., Dilworth D. J., Yi E. C., Goodlett D. R., Wozniak R. W. and Aitchison J. D. 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Mol Cell Biol*. **23**: 2042-54
- Szamecz B., Rutkai E., Cuchalova L., Munzarova V., Herrmannova A., Nielsen K. H., Burela L., Hinnebusch A. G. and Valasek L. 2008. eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on *GCN4* mRNA. *Genes Dev*. **22**: 2414-25
- Takahashi S., Araki Y., Ohya Y., Sakuno T., Hoshino S., Kontani K., Nishina H. and Katada T. 2008. Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. *RNA*. **14**: 1950-8
- Talkish J., Zhang J., Jakovljevic J., Horsey E. W. and Woolford J. L., Jr. 2012. Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. **40**: 8646-61
- Taylor D. J., Nilsson J., Merrill A. R., Andersen G. R., Nissen P. and Frank J. 2007. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *EMBO J*. **26**: 2421-31
- Taylor D. J., Devkota B., Huang A. D., Topf M., Narayanan E., Sali A., Harvey S. C. and Frank J. 2009. Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. *Structure*. **17**: 1591-604

- Thapa M., Bommakanti A., Shamsuzzaman M., Gregory B., Samsel L., Zengel J. M. and Lindahl L. 2013. Repressed synthesis of ribosomal proteins generates protein-specific cell cycle and morphological phenotypes. *Mol Biol Cell*. **24**: 3620-33
- Thiebauld O., Schepetilnikov M., Park H. S., Geldreich A., Kobayashi K., Keller M., Hohn T. and Ryabova L. A. 2009. A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *EMBO J*. **28**: 3171-84
- Thomson E. and Tollervey D. 2005. Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA*. **11**: 1215-24
- Thomson E. and Tollervey D. 2010. The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **30**: 976-84
- Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M. and Hurt E. C. 1991. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J*. **10**: 573-83
- Tong A. H., Lesage G., Bader G. D., Ding H., Xu H., Xin X., Young J., Berriz G. F., Brost R. L., Chang M., Chen Y., Cheng X., Chua G., Friesen H., Goldberg D. S., Haynes J., Humphries C., He G., Hussein S., Ke L., Krogan N., Li Z., Levinson J. N., Lu H., Menard P., Munyana C., Parsons A. B., Ryan O., Tonikian R., Roberts T., Sdicu A. M., Shapiro J., Sheikh B., Suter B., Wong S. L., Zhang L. V., Zhu H., Burd C. G., Munro S., Sander C., Rine J., Greenblatt J., Peter M., Bretscher A., Bell G., Roth F. P., Brown G. W., Andrews B., Bussey H. and Boone C. 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*. **303**: 808-13
- Toussaint M., Levasseur G., Tremblay M., Paquette M. and Conconi A. 2005. Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem Cell Biol*. **83**: 449-59
- Trapman J., Retel J. and Planta R. J. 1975. Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res*. **90**: 95-104
- Tschochner H. and Hurt E. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*. **13**: 255-63
- Udem S. A. and Warner J. R. 1972. Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*. **65**: 227-42
- Udem S. A. and Warner J. R. 1973. The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem*. **248**: 1412-6
- Ulbrich C., Diepholz M., Bassler J., Kressler D., Pertschy B., Galani K., Bottcher B. and Hurt E. 2009. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell*. **138**: 911-22
- Underwood M. R. and Fried H. M. 1990. Characterization of nuclear localizing sequences derived from yeast ribosomal protein L29. *EMBO J*. **9**: 91-9
- Valasek L., Nielsen K. H., Zhang F., Fekete C. A. and Hinnebusch A. G. 2004. Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection. *Mol Cell Biol*. **24**: 9437-55
- van Hoof A., Lennertz P. and Parker R. 2000. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J*. **19**: 1357-65
- van Nues R. W., Venema J., Rientjes J. M., Dirks-Mulder A. and Raue H. A. 1995. Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. *Biochem Cell Biol*. **73**: 789-801
- Vanrobays E., Leplus A., Osheim Y. N., Beyer A. L., Wacheul L. and Lafontaine D. L. 2008. TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *RNA*. **14**: 2061-73
- Vazquez de Aldana C. R., Dever T. E. and Hinnebusch A. G. 1993. Mutations in the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF-2 alpha) that overcome the inhibitory effect of eIF-2 alpha phosphorylation on translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 7215-9
- Vazquez de Aldana C. R., Marton M. J. and Hinnebusch A. G. 1995. GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J*. **14**: 3184-99
- Venema J., Planta R. J. and Raue H. A. 1998. *In vivo* mutational analysis of ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*. **77**: 257-70

- Venema J. and Tollervey D. 1995. Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **11**: 1629-50
- Venema J. and Tollervey D. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*. **33**: 261-311
- Voigts-Hoffmann F., Klinge S. and Ban N. 2012. Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. *Curr Opin Struct Biol*. **22**: 768-77
- Voorhees R. M., Fernandez I. S., Scheres S. H. and Hegde R. S. 2014. Structure of the Mammalian ribosome-sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*. **157**: 1632-43
- Vos H. R., Faber A. W., de Gier M. D., Vos J. C. and Raue H. A. 2004. Deletion of the three distal S1 motifs of *Saccharomyces cerevisiae* Rrp5p abolishes pre-rRNA processing at site A(2) without reducing the production of functional 40S subunits. *Eukaryot Cell*. **3**: 1504-12
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R. and Philippsen P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **10**: 1793-808
- Wang X. Z., Lawson B., Brewer J. W., Zinszner H., Sanjay A., Mi L. J., Boorstein R., Kreibich G., Hendershot L. M. and Ron D. 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*. **16**: 4273-80
- Wang X. Z., Kuroda M., Sok J., Batchvarova N., Kimmel R., Chung P., Zinszner H. and Ron D. 1998. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J*. **17**: 3619-30
- Wang Y., Liu C. L., Storey J. D., Tibshirani R. J., Herschlag D. and Brown P. O. 2002. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 5860-5
- Wang H., Zhao L. N., Li K. Z., Ling R., Li X. J. and Wang L. 2006. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer*. **6**: 91
- Wang L., Pulk A., Wasserman M. R., Feldman M. B., Altman R. B., Cate J. H. and Blanchard S. C. 2012. Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol*. **19**: 957-63
- Warner J. R. and Gorenstein C. 1977. The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins *in vitro*. *Cell*. **11**: 201-12
- Warner J. R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*. **24**: 437-40
- Warner J. R., Vilardell J. and Sohn J. H. 2001. Economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **66**: 567-74
- Warner J. R. and McIntosh K. B. 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell*. **34**: 3-11
- Watkins N. J. and Bohnsack M. T. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **3**: 397-414
- Weaver P. L., Sun C. and Chang T. H. 1997. Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol Cell Biol*. **17**: 1354-65
- Wek R. C., Jackson B. M. and Hinnebusch A. G. 1989. Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 4579-83
- Wells S. E., Hillner P. E., Vale R. D. and Sachs A. B. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*. **2**: 135-40
- Weisser M., Voigts-Hoffmann F., Rabl J., Leibundgut M. and Ban N. 2013. The crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with eIF1 and eIF1A. *Nat Struct Mol Biol*. **20**: 1015-7
- Wery M., Ruidant S., Schillewaert S., Lepore N. and Lafontaine D. L. 2009. The nuclear poly(A) polymerase and Exosome cofactor Trf5 is recruited cotranscriptionally to nucleolar surveillance. *RNA*. **15**: 406-19
- Wethmar K. 2014. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **10**: 1002/wrna.1245
- Wickner R. B. 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. **60**: 250-65

- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornrhein C., Hartsch T. and Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**: 327-39
- Winey M., Yarar D., Giddings T. H., Jr. and Mastrorade D. N. 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell*. **8**: 2119-32
- Wintermeyer W., Peske F., Beringer M., Gromadski K. B., Savelsbergh A. and Rodnina M. V. 2004. Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochem Soc Trans*. **32**: 733-7
- Woodson S. A. 2011. RNA folding pathways and the self-assembly of ribosomes. *Acc Chem Res*. **44**: 1312-9
- Wool I. G. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. **21**: 164-5
- Woolford J. L., Jr. and Baserga S. J. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **195**: 643-81
- Wu P., Brockenbrough J. S., Metcalfe A. C., Chen S. and Aris J. P. 1998. Nop5p is a small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18 S rRNA processing in yeast. *J Biol Chem*. **273**: 16453-63
- Xue S. and Barna M. 2012. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **13**: 355-69
- Yang R., Wek S. A. and Wek R. C. 2000. Glucose limitation induces *GCN4* translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol*. **20**: 2706-17
- Yang S. H., Huang C. J., Lee C. L., Liu C. C., Chien C. C. and Chen S. H. 2010. Fecal RNA detection of cytokeratin 19 and ribosomal protein L19 for colorectal cancer. *Hepatology*. **57**: 710-5
- Yang E. J., Seo J. W. and Choi I. H. 2011. Ribosomal Protein L19 and L22 Modulate TLR3 Signaling. *Immune Netw*. **11**: 155-62
- Yao W., Roser D., Kohler A., Bradatsch B., Bassler J. and Hurt E. 2007. Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell*. **26**: 51-62
- Yao Y., Demoinet E., Saveanu C., Lenormand P., Jacquier A. and Fromont-Racine M. 2010. Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *RNA*. **16**: 1007-17
- Yoon H. J. and Donahue T. F. 1992. The *suil* suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon. *Mol Cell Biol*. **12**: 248-60
- Yoshida K. and Blobel G. 2001. The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol*. **152**: 729-40
- Yu Y., Abaeva I. S., Marintchev A., Pestova T. V. and Hellen C. U. 2011. Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. *Nucleic Acids Res*. **39**: 4851-65
- Yusupova G. and Yusupov M. 2014. High-Resolution Structure of the Eukaryotic 80S Ribosome. *Annu Rev Biochem*. **83**: 467-86
- Zabetakis D. 2000. Inheritance of suppressors of the drug sensitivity of a NSR1 deleted yeast strain. *Yeast*. **16**: 1147-59
- Zagulski M., Kressler D., Becam A. M., Rytka J. and Herbert C. J. 2003. Mak5p, which is required for the maintenance of the M1 dsRNA virus, is encoded by the yeast ORF YBR142w and is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome. *Mol Genet Genomics*. **270**: 216-24
- Zanchin N. I., Roberts P., DeSilva A., Sherman F. and Goldfarb D. S. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol*. **17**: 5001-15
- Zanchin N. I. and Goldfarb D. S. 1999. Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol Cell Biol*. **19**: 1518-25
- Zaragoza D., Ghavidel A., Heitman J. and Schultz M. C. 1998. Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol*. **18**: 4463-70

Zhang J., Harnpicharnchai P., Jakovljevic J., Tang L., Guo Y., Oeffinger M., Rout M. P., Hiley S. L., Hughes T. and Woolford J. L., Jr. 2007. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev.* **21**: 2580-92

Zhang W., Dunkle J. A. and Cate J. H. 2009. Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science.* **325**: 1014-7

Zhao F., Zhao Q., Blount K. F., Han Q., Tor Y. and Hermann T. 2005. Molecular recognition of RNA by neomycin and a restricted neomycin derivative. *Angew Chem Int Ed Engl.* **44**: 5329-34

Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L. and Philippe M. 1995. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**: 4065-72

Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R. T., Remotti H., Stevens J. L. and Ron D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**: 982-95

