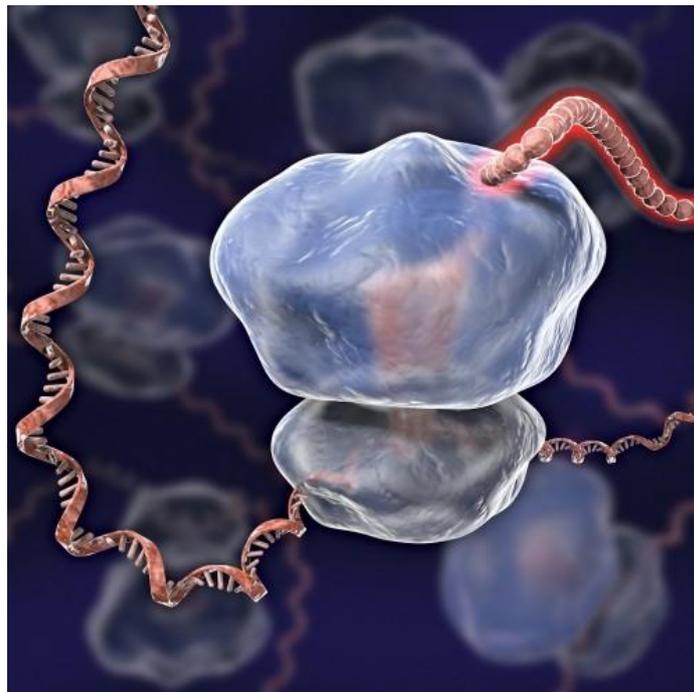


FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA L16/uL13 EN LA BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS Y LA TRADUCCIÓN



ÁLVARO GIL HERNÁNDEZ

SALAMANCA 2016



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
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

“Función de la proteína L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y en traducción”

**Memoria presentada por Álvaro Gil Hernández
para optar al grado de Doctor en Biotecnología**

Salamanca, 2016

DON CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ, PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO DE AGROBIOTECNOLOGÍA,

CERTIFICA

Que la memoria titulada “**Función de la proteína L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y la traducción**”, presentada por el licenciado **Álvaro Gil Hernández** para optar al grado de **Doctor en Biotecnología**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Mercedes Tamame González en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC/Universidad de Salamanca; y dentro del Programa de Doctorado de Agrobiotecnología RD1393/2007.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido el presente certificado en Salamanca a ___ de Febrero de 2016.

Dr. Carlos Nicolás Rodríguez
Presidente de la comisión académica del programa de doctorado de agrobiotecnología



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

CERTIFICA

Que ha dirigido el trabajo titulado **“Función de la proteína L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y la traducción”**, realizado por el licenciado **Álvaro Gil Hernández** en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Universidad de Salamanca para optar al grado de **Doctor en Biotecnología**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido el presente certificado en Salamanca a ___ de Febrero de 2016.

Dra. Mercedes Tamame González
Directora de la tesis



DRA. PILAR MARTÍN MARCOS, INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

CERTIFICA

Que ha co-dirigido el trabajo titulado **“Función de la proteína L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y la traducción”**, realizado por el licenciado **Álvaro Gil Hernández** en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Universidad de Salamanca para optar al grado de **Doctor en Biotecnología**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido el presente certificado en Salamanca a ____ de Febrero de 2016.

Dra. Pilar Martín Marcos
Co-Directora de la tesis



DOÑA BERTA DOPICO RIVELA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA

Que ha sido tutora del trabajo titulado “**Función de la proteína L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y la traducción**” realizado por el licenciado **Álvaro Gil Hernández** en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto CSIC/Universidad de Salamanca, dentro del Programa de Doctorado de Agrobiotecnología RD1393/2007, para optar al grado de **Doctor en Biotecnología**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido el presente certificado en Salamanca a ___ de Febrero de 2016.

Dra. Berta Dopico Rivela
Tutora de la tesis

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo ha sido llevar a cabo, mediante genética molecular, el análisis estructural y funcional de la proteína ribosómica eucariota L16 en *Saccharomyces cerevisiae*, para desvelar qué papel juega en la biogénesis de ribosomas y en la traducción de mRNAs. La proteína L16 se encuentra conservada en los ribosomas de los organismos en los tres dominios de la vida: bacterias, arqueobacterias y eucariotas. Sin embargo, su versión eucariota ha adquirido con la evolución una larga hélice en el extremo C-terminal. Las características estructurales y la localización de L16 en la subunidad 60S de *S. cerevisiae*, sugieren que esta proteína podría desempeñar nuevas funciones en la biogénesis de los ribosomas y en la traducción eucarióticas.

Para investigar las funciones primarias de L16 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 L16 se requieren para sus funciones en el procesamiento correcto de los RNAs ribosómicos, la traducción global de los RNA mensajeros y la regulación traduccional del mRNA *GCN4*.

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. El Licenciado Álvaro Gil Hernández agradece la financiación recibida para su ejecución al Consejo Superior de Investigaciones Científicas a través de una Beca Predoctoral del Programa JAE (Junta de Ampliación de Estudios) (2011/2015).

A mi familia

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. El ribosoma	1
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 L16	10
2.1. Localización y contactos de L16 en el ribosoma eucariota.....	12
2.2. Funciones extra-ribosómicas de la ortóloga humana L13a.....	13
3. Biogénesis de ribosomas	15
3.1. Procesamiento de los precursores del RNA ribosómico	17
3.2. Ensamblaje de las subunidades ribosómicas	20
a. Pre-partículas 90S	20
b. Pre-partículas 40S	21
c. Pre-partículas 60S	22
3.3. Mecanismos de vigilancia en la biogénesis de ribosomas.....	25
4. Traducción	26
4.1. Inicio de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	26
4.2. Elongación de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	30
4.3. Terminación de la traducción en <i>S. cerevisiae</i>	30
4.4. Regulación traduccional en <i>S. cerevisiae</i>	31
4.5. Regulación traduccional de <i>GCN4</i>	32
ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO	37
OBJETIVOS	39
RESULTADOS	40
<u>CAPÍTULO I: GENERACIÓN DE MUTACIONES DE PÉRDIDA PARCIAL</u>	
 DE FUNCIÓN DE L16	40
1. Mutagénesis aleatoria del alelo <i>RPL16B</i>Δ_i	40
2. Predicción de las alteraciones que causarían las variantes de L16B en la estructura de alta resolución de la subunidad 60S	43
3. Fenotipo de crecimiento de los mutantes <i>rpl16b</i>Δ_i^*	45
4. Defectos en la iniciación de la traducción en los mutantes <i>rpl16b</i>Δ_i^*	47
5. Defectos en la biogénesis de ribosomas en los mutantes <i>rpl16b</i>Δ_i^*	53

Índice

5.1 Procesamiento de los precursores de los RNAs ribosómicos en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	53
5.2 Análisis de los RNAs de pequeño tamaño molecular.....	58
5.3 Análisis de pulso y caza con uracilo tritiado de los RNAs en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	59
6. Las proteínas mutantes L16B* se ensamblan correctamente en pre-ribosomas 60S.....	61
7. Traducción del mRNA de GCN4 en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	65
7.1 Análisis de la transcripción de <i>HIS4</i> en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	66
7.2 Análisis de la regulación traduccional de <i>GCN4</i> en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	68
8. Defectos en la fidelidad de la traducción en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	72
8.1 Análisis de sensibilidad a antibióticos que afectan a la traducción.....	72
8.2 Análisis de la frecuencia en el cambio de fase de lectura programada.....	73
8.3 Reconocimiento del codón AUG en el inicio de la traducción.....	75
<u>CAPÍTULO II: ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MUTANTES <i>rpl16b</i></u>	79
1. Fenotipo de crecimiento de los mutantes <i>rpl16bΔCT</i>.....	81
2. Defectos en la iniciación de la traducción y en la biogénesis de ribosomas en los mutantes <i>rpl16bΔCT</i>	84
2.1 Procesamiento de los precursores de los RNAs ribosómicos en los mutantes <i>rpl16bΔCT</i>	86
3. Las proteínas truncadas L16BACT se ensamblan en pre-partículas ribosómicas	90
4. La ausencia del extremo C-terminal de L16 no provoca cambios significativos en la composición de las pre-partículas ribosómicas.....	91
5. Aislamiento de supresores de dosis de las mutaciones <i>rpl16bΔCT</i>	94
6. Dominancia negativa de los alelos <i>rpl16bΔCT</i> cuando se sobreexpresan.....	100
DISCUSIÓN	102
1. Interpretación de las consecuencias fenotípicas de las mutaciones <i>rpl16bΔCT</i> y <i>rpl16bΔ_i*</i>	102
2. Defectos en la traducción en los mutantes <i>rpl16bΔCT</i> y <i>rpl16bΔ_i*</i>.....	109

3. Defectos en el procesamiento de los precursores de los rRNAs en los mutantes <i>rpl16bΔCT</i> y <i>rpl16bΔ_i*</i>	112
4. L16 en el ensamblaje y la maduración de pre-ribosomas 60S.....	114
5. Regulación traduccional de <i>GCN4</i> en los mutantes <i>rpl16bΔ_i*</i>	116
CONCLUSIONES	120
MATERIALES Y MÉTODOS	122
1. Microorganismos utilizados	122
2. Medios de cultivo	122
3. Materiales y procedimientos generales de biología molecular	124
3.1. Vectores empleados	124
3.2. Plásmidos	125
3.3. Transformación y obtención de DNA plasmídico de levaduras y <i>E. coli</i>	127
3.4. Técnicas de manipulación del ADN	127
a. Reacciones enzimáticas	127
b. Análisis y purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	127
c. Amplificación de secuencias de ADN por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	129
d. PCR Cuantitativa.....	130
e. Mutagénesis al azar	130
f. Mutagénesis dirigida	131
g. Secuenciación de ADN	131
h. Oligonucleótidos empleados en distintas reacciones de PCR y secuenciación del ADN	132
3.5. Técnicas de manipulación y análisis del ARN	132
a. Extracción de ARN total de células de <i>S. cerevisiae</i>	132
b. Electroforesis de ARN en geles capilares	132
c. Hibridación de ARN	132
d. Ensayos de <i>Primer Extension</i>	135
3.6. Marcado de Pulso y Caza de rRNAs precursores y maduros con [5,6- ³ H].....	136
3.7. Fraccionamiento y obtención de perfiles de polisomas	136
3.8. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas.....	137
a. Obtención de extractos proteicos	137
b. Determinación de la cantidad de proteína	137
c. Detección de proteínas	138
d. Purificación por afinidad de pre-partículas ribonucleoproteicas usando microesferas conjugas con anticuerpo anti-FLAG.....	138

Índice

e. Purificación por afinidad de pre-partículas ribonucleoproteicas usando microesferas magnéticas conjugadas con IgG.....	139
f. Análisis comparativos MALDI TOF/TOF (iTRAQ™).....	139
g. Medida de la actividad β -galactosidasa de proteínas de fusión.....	140
BIBLIOGRAFÍA	142
ANEXOS	162
ABREVIATURAS	162

Introducción

1. EL RIBOSOMA

Los ribosomas son los orgánulos celulares que realizan la síntesis de proteínas en todos los organismos, traduciendo los RNA mensajeros (mRNAs) en los que se transmite la información contenida en el código genético. La traducción de los mRNAs constituye una de las últimas etapas de la expresión génica y su regulación determina en gran medida el crecimiento, desarrollo y la diferenciación celular en las diferentes especies.

En todos los organismos, los ribosomas están compuestos por dos subunidades; grande (large subunit, LSU) y pequeña (small subunit, SSU), presentando la mayor un tamaño dos veces superior a la menor. Las subunidades ribosómicas se designan por sus coeficientes de sedimentación: en procariotas, se denominan subunidad 50S y 30S respectivamente, y juntas forman el ribosoma 70S, y en eucariotas 60S y 40S respectivamente, y al unirse conforman el ribosoma maduro 80S. En todos los casos, los ribosomas están compuestos por RNAs ribosómicos (rRNAs) y por proteínas ribosómicas (RPs). En la levadura *Saccharomyce cerevisiae*, el organismo empleado para nuestro estudio, los ribosomas tienen la siguiente composición:

- La subunidad LSU o 60S está constituida por tres rRNA, 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 se compone del rRNA 18S (1.800 nucleótidos) y de 33 proteínas ribosómicas (RPS). En esta subunidad reside la función descodificadora del mensaje genético transmitido en el mRNA y mediada por los RNAs de transferencia (tRNAs) aminoacilados (aminoacil-tRNAs). En eucariotas, la subunidad 40S se une a varios factores de inicio de la traducción (eIF1, eIF1A, eIF3, eIF4, eIF5) formando junto con el complejo ternario (compuesto por eIF2, GTP y el tRNA iniciador de metionina [$\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$]) el complejo de preiniciación 43S, que se une al extremo 5' de los mRNAs y es capaz de rastrear y de reconocer los codones de inicio de la traducción.

Además, en los ribosomas maduros existen tres “sitios” o centros funcionales constituidos por regiones de las dos subunidades y que interaccionan con los tRNAs: el sitio A, o aceptor, al que se unen las moléculas de aminoacil-tRNA, portadoras del aminoácido entrante durante la síntesis de proteínas; el sitio P, o donador, que es el que ocupa el $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ y al que se trasloca la cadena polipeptídica nascente (peptidil-tRNA); y el sitio E, o de salida de los tRNAs una vez han descargado el aminoácido correspondiente en el péptido en formación. También se considera la existencia de otros centros funcionales en las dos subunidades, en la SSU el centro

Introducción

de descodificación y el túnel de entrada y de salida del mRNA y en la LSU el centro peptidil transferasa, el túnel de salida del polipéptido y el sitio de unión a GTPasas y factores de traducción (Melnikov *et al.*, 2012; Woolford y Baserga 2013).

Recientemente, se han obtenido tanto reconstrucciones de criomicroscopía electrónica como estructuras cristalográficas de alta resolución a nivel atómico del ribosoma de *S. cerevisiae* (3Å) (Fig.1) y de otros organismos, como el del protozoo *Tetrahymena thermophila* o del ribosoma humano (Ben-Shem *et al.*, 2010; Klinge *et al.*, 2011; Anger *et al.*, 2014). Estas estructuras aportan abundante información sobre las nuevas interacciones moleculares que se establecen entre proteínas y/o con el rRNA en eucariotas y que no existen en el ribosoma de procariotas. De esta manera, permiten aumentar la capacidad para diseñar e interpretar los experimentos, para comprender el ensamblaje y la función de los ribosoma eucariotas. Las estructuras proporcionan un marco molecular idóneo para predecir qué efectos moleculares pueden tener determinadas mutaciones sobre la integridad del ribosoma o sobre la actividad bioquímica de algunos de sus centros funcionales. Además, las estructuras contribuyen al diseño y obtención de mutaciones concretas en organismos modelo eucarióticos, que afecten bien a proteínas ribosómicas o a los rRNA para estudiar sus efectos fenotípicos en la biogénesis de los ribosomas o en la traducción de distintos mRNAs.

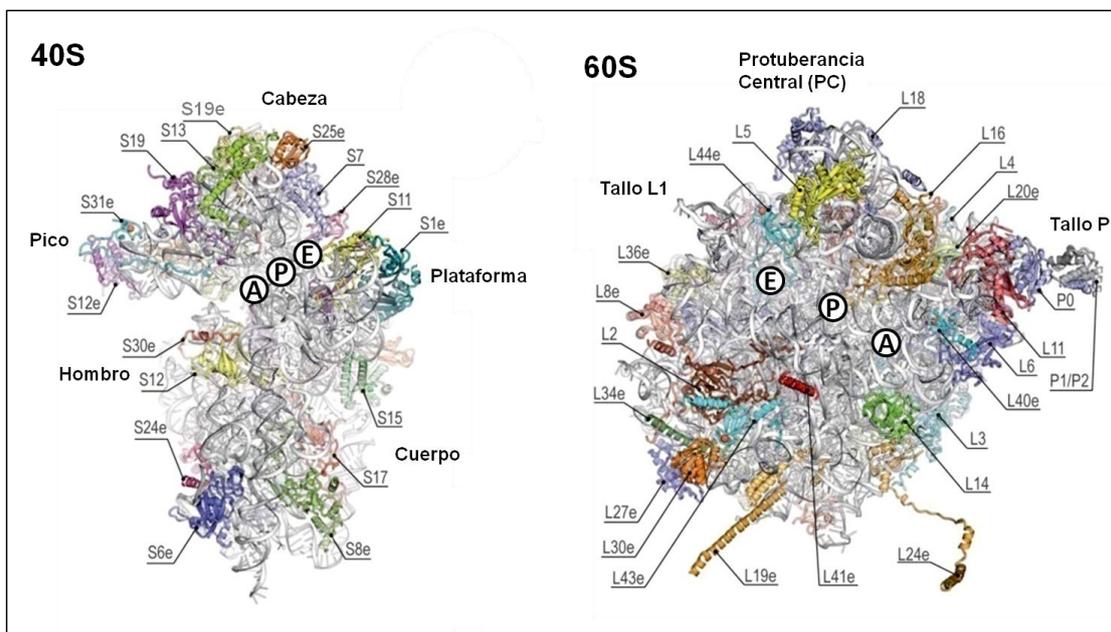


Figura 1. Estructura de las subunidades 40S y 60S del ribosoma de *S. cerevisiae* vistas desde la zona de contacto entre ambas. Se indican las regiones características de ambas subunidades y la posición de varias proteínas de 40S (S) y de 60S (L). Con un círculo blanco se indican los sitios que ocupan los tRNA_e de elongación (A), de iniciación tRNA_i^{Met} (P) y el sitio de salida de cada tRNA descargado del aminoácido (E) (Modificado de Ben-Shem *et al.*, 2011).

En la siguiente figura se representan los cuatro dominios estructurales del rRNA 18S que están conservados filogenéticamente: 5', central, 3' mayor y 3' menor. Estos dominios se pliegan en estructuras terciarias junto con las proteínas ribosómicas (RPS) y forman las regiones características de la SSU denominadas cuerpo, hombro, plataforma y pico (Ben-Shem *et al.*; 2011; Melnikow *et al.*, 2012 (Fig. 1). De forma similar, los rRNAs 5.8S y 25S de la LSU se organizan en seis dominios conservados de estructura secundaria (I-VI), que al plegarse con las RPL y el rRNA 5S conforman las estructuras terciarias características de la LSU: protuberancia central, tallo ácido (tallo P) y tallo L1 (Ben-Shem *et al.*; 2011; Melnikow *et al.*, 2012; Woolford y Baserga, 2013) (Fig. 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 rRNA, comenzando por la región que se orienta hacia el lado del solvente, 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).

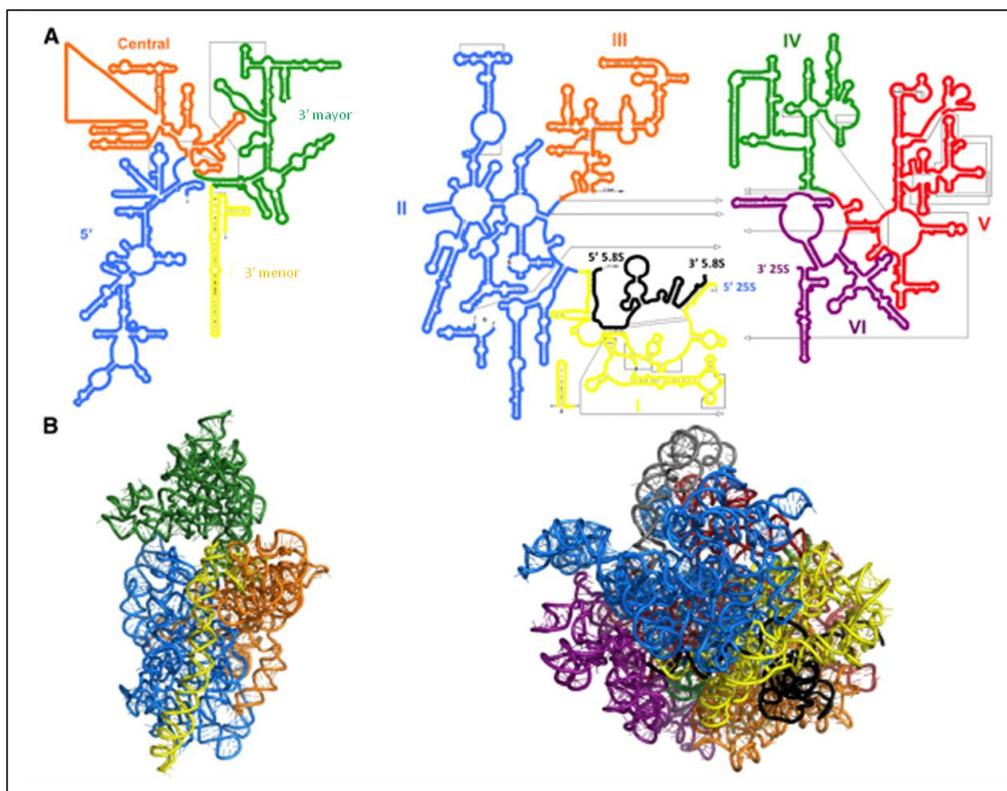


Figura 2. Estructuras secundaria y terciaria de los rRNAs maduros de *S. cerevisiae* 18S, 5.8S y 25S. A) En el panel de la izquierda se muestra la estructura secundaria del rRNA 18S con sus dominios indicados con diferentes colores y en la derecha la estructura secundaria del rRNA 25S con sus seis dominios (I-VI) y el rRNA 5.8S en negro emparejado con el dominio I. B) Imagen de las estructuras terciarias de los rRNAs 18S (izquierda) y 25S junto con el 5.8S (derecha), siguiendo el esquema de colores de la parte superior (Woolford y Baserga, 2013).

Introducción

Cuando se comparan las estructuras del ribosoma eucariota con el bacteriano o el de arqueobacterias, se observa un núcleo estructural universalmente conservado que comprende los sitios funcionales del ribosoma como el centro de descodificación, el sitio peptidil transferasa o los sitios de unión a tRNA. Sobre este núcleo, en el ribosoma eucariota se han producido modificaciones en la longitud y la secuencia de los componentes ribosómicos, añadiéndose segmentos de expansión del rRNA y extensiones amino o carboxi-terminales en muchas proteínas ribosómicas (Fig. 3).

La mayoría de estos nuevos residuos de rRNA y de proteínas se sitúan alrededor del núcleo conservado hacia el lado del solvente, de manera que van a ser accesibles para potenciales interacciones moleculares con chaperonas, factores implicados en la biogénesis de ribosomas o factores de traducción, procesos que presentan bastantes diferencias en bacterias, arqueobacterias y eucariotas (Dinman JD, 2009).

Además, se ha propuesto que estos nuevos elementos eucariotas servirían para transmitir señales alostéricas desde el citoplasma al núcleo conservado del ribosoma, provocando cambios que permitirían regular la traducción en diferentes condiciones fisiológicas, ambientales o tipos celulares (Ben-Shem *et al.*, 2011; Jenner *et al.*, 2012). Por tanto, estas diferencias en la estructura del ribosoma 80S frente al bacteriano, se pueden correlacionar con el aumento en la complejidad de la traducción eucariótica y de su regulación (Menikov *et al.*, 2012).

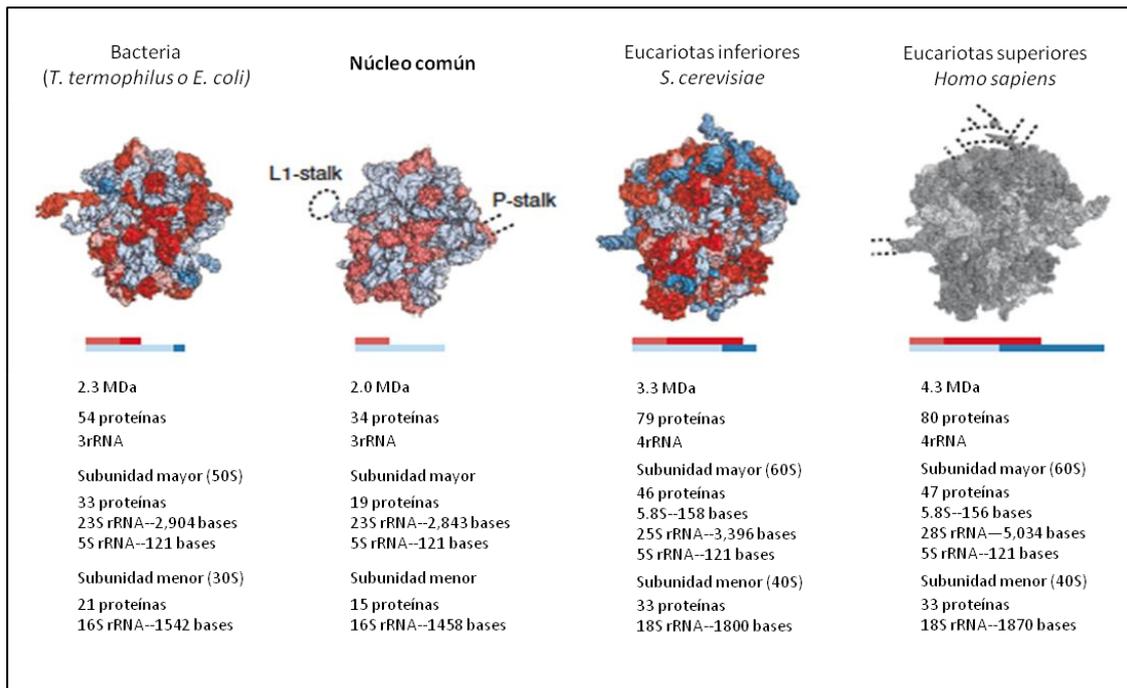


Figura 3. Composición de los ribosomas bacteriano y eucariota y del núcleo común a ambos. El núcleo conservado está compuesto por rRNA (azul claro) y RPs (rojo claro). Los elementos específicos de eucariotas y procariotas se muestran en rojo y las extensiones del rRNA en azul, las líneas de puntos corresponden a los tallos flexibles y a las expansiones del rRNA de eucariotas superiores (Adaptada de Melnikov *et al.*, 2012).

Tradicionalmente se ha considerado al ribosoma como un orgánulo celular invariable y sólo recientemente se ha empezado a investigar el papel regulador que desempeña durante la traducción en eucariotas. Un número creciente de evidencias experimentales indican que el ribosoma eucariota media interacciones específicas entre mRNAs particulares y algunos componentes de la maquinaria traduccional regulando diferencialmente la síntesis de proteínas en distintos tipos celulares o en diversas situaciones fisiológicas y patológicas (Mauro y Edelman, 2002; 2007). Además, las células producen subpoblaciones de ribosomas distintas en su composición bajo diferentes condiciones de crecimiento y estrés; de manera que se postula que estas subpoblaciones traducirían diferencialmente varios subconjuntos de mRNAs. Se ha demostrado que en células silvestres tanto de levadura como en fibroblastos de ratón, existen ribosomas con diferente composición de RPs y función fisiológica (Slavlov *et al.*, 2015). Esta heterogeneidad en los ribosomas surge principalmente de variaciones en el rRNA, en la composición de las proteínas ribosómicas o de cambios en las interacciones con varios factores de traducción asociados (Gilbert, 2011; Xue y Barna, 2012; Bauer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

1.1 Características de los rRNAs de *S. cerevisiae*

Los rRNAs de *S. cerevisiae* están codificados en aproximadamente 150 repeticiones en tándem de rDNA localizadas en el cromosoma XII (Petes y Botstein, 1977). Estas repeticiones representan un 10% del genoma de esta levadura, constituyendo el rRNA el 80% del total celular (siendo el 15% el tRNA y el 5% el mRNA). De las 150 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 rDNA al favorecer su reparación por recombinación homóloga (Ide *et al.*, 2010). Cada unidad transcripcional codifica el precursor 35S y el rRNA maduro 5S. El primero es transcrito por la RNA polimerasa I en el nucléolo y es procesado para dar lugar a los rRNAs maduros de la LSU (25S y 5.8S) y de la SSU (18S). El rRNA 5S es transcrito por la RNA polimerasa III en una forma casi madura y se incorpora a la subunidad 60S durante su biogénesis (Zhang *et al.*, 2007) (Fig. 4).

Los rRNAs maduros 18S-5.8S-25S codificados en el precursor 35S (6.6 Kb) están separados por secuencias espaciadoras de rRNA que se transcriben pero que no forman parte de los transcritos maduros, sino que se eliminan por procesamiento endo y exonucleolítico, denominadas ITS1 e ITS2 (*Internal transcribed spacer*). Además, existen dos regiones externas en los extremos de cada precursor 35S denominadas 5' ETS y 3' ETS (*External transcribed spacer*) que también son eliminadas por procesamiento endo y exonucleolítico. Se ha descrito que estas secuencias espaciadoras podrían evitar un plegamiento incorrecto o prematuro del pre-rRNA tras su síntesis y durante su procesamiento (Van Nues *et al.*, 1995; Lamanna y Karbstein, 2011). Asimismo, existen otras dos regiones que no se transcriben denominadas NTS1 y NTS2 (*Non transcribed spacer*), que se encuentran entre las secuencias que codifican el precursor 35S y las que codifican el rRNA 5S (Fig. 4).

Tan pronto como el precursor 35S es transcrito, sufre la modificación de varios nucleótidos específicos, principalmente la conversión de uridinas en pseudo-uridinas (ψ) y la metilación de grupos 2' hidroxilos de las ribosas de las bases nitrogenadas (Kiss *et al.*, 2010; Watkins y Bohnsack, 2012). Estas modificaciones son esenciales para la función del ribosoma, de manera que su ausencia en humanos está ligada a varias enfermedades (Decatur y Fournier 2002; ver ribosomopatías).

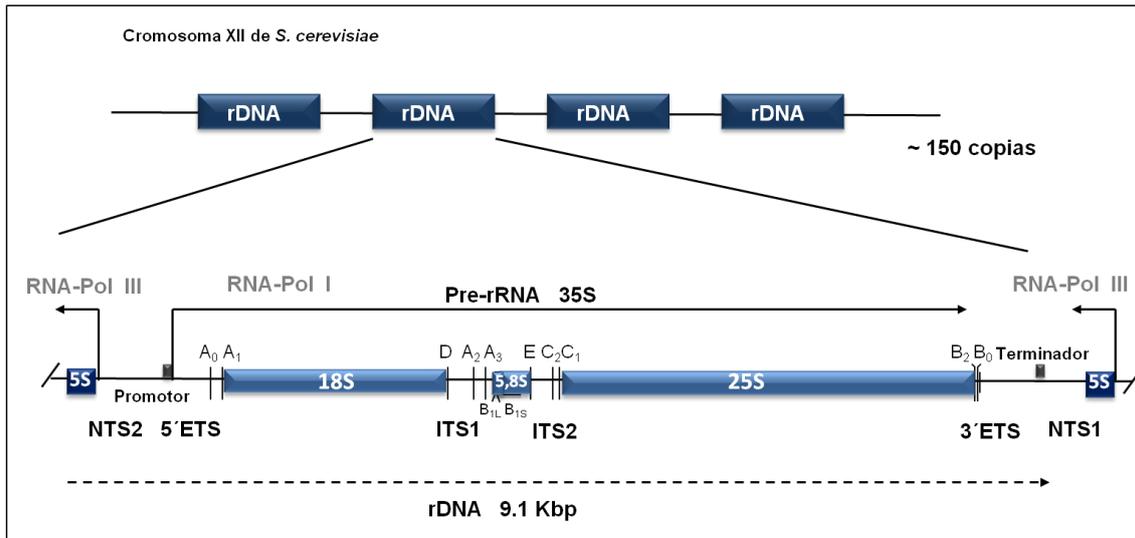


Figura 4. Organización de los loci del rDNA en *S. cerevisiae*. Existen sobre 150 repeticiones en tándem en el cromosoma XII. Cada unidad contiene la secuencia del pre-rRNA 35S, que codifica los rRNAs 18S, 5.8S y 25S y es transcrito por la RNA Pol I y la secuencia del precursor del rRNA 5S, transcrito por la RNA Pol III. En el precursor 35S los rRNAs maduros están flanqueados en 5' y 3' por los espaciadores externos (5'-ETS y 3'ETS) y separados por los espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2).

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

En el ribosoma de *S. cerevisiae* existen 79 proteínas ribosómicas (RPs) codificadas por 138 genes (*Ribosomal Protein Genes*, RPG) que se transcriben muy activamente, requiriendo aproximadamente el 50% de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa II, ya que un tercio de los mRNAs totales de la célula codifican las RPs (Wang *et al.*, 2002). Los 138 RPG representan el 2% del genoma de *S. cerevisiae* y 102 de ellos contienen un intrón. Teniendo en cuenta que sólo 280 de sus 6.600 genes contienen intrones, la mayor parte del “*splicing*” en *S. cerevisiae* se dedica al procesamiento de los mRNAs de las RPs (Warner, 1999).

Tanto la transcripción de los RPG como la síntesis de las RPs están reguladas de manera coordinada, de modo que todas las RPs se sintetizan en cantidades estequiométricas, ya que se ensambla una proteína de cada tipo por cada ribosoma maduro (Pearson *et al.*, 1982; Gomez-Herreros *et al.*, 2013).

Las proteínas ribosómicas son pequeñas y básicas, por lo que tienen la capacidad de interactuar con los rRNAs cargados negativamente (con la excepción de las proteínas ácidas del tallo ribosómico P1 α , P1 β , P2 α , P2 β) (Spahn *et al.*, 2004; Cardenas *et al.*, 2012). En cuanto a su estructura, muchas RPs constan de un dominio globular que suele localizarse hacia el exterior del ribosoma, partiendo de él una serie de prolongaciones que se introducen entre los rRNAs. De esta manera, se piensa que durante las primeras etapas de la biogénesis de ribosomas, las

Introducción

RPs usan los dominios globulares para reconocer regiones específicas del rRNA, mientras que las prolongaciones permiten el plegamiento del rRNA neutralizando la carga negativa de los fosfatos del RNA y mediando interacciones RNA-RNA (Klein *et al.*, 2004). Al afectar al plegamiento tanto proximal como distal del rRNA, las RPs podrían ayudar a crear sitios de unión para otras proteínas o a desencadenar cambios conformacionales en el pre-rRNA necesarios para eliminar las secuencias espaciadoras (Spahn *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2009; Armache *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2012; Rabl *et al.*, 2011). Además, como muchas RPs están expuestas en la superficie del ribosoma, pueden servir como sitios de unión directa para factores de ensamblaje o interactuar con factores de traducción.

Las distintas RPs son consideradas factores de biogénesis de ribosomas porque intervienen en el procesamiento, plegamiento y maduración del rRNA (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Ferreira-Cerca *et al.*, 2007; Pöll *et al.*, 2009), participan en el correcto ensamblaje de los pre-ribosomas (Martin-Marcos *et al.*, 2007; Babiano y de la Cruz, 2010; Fernandez-Pevida *et al.*, 2012; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2013; Ohmayer *et al.*, 2013), median en las interacciones de los pre-ribosomas con factores de biogénesis (Granneman *et al.*, 2011; Dembowski *et al.*, 2013; Stelter *et al.*, 2015; Wan *et al.*, 2015), facilitan el transporte de las subunidades durante su maduración del nucléolo al núcleo y al citoplasma (Bassler *et al.*, 2001; Gadal *et al.*, 2001; Tschoschner y Hurt, 2003) y están implicadas en la unión entre las subunidades 60S y 40S durante la síntesis de proteínas o en la interacción con factores de traducción (Eisinger *et al.*, 1997; Spahn *et al.*, 2001; DeLabre *et al.*, 2002; Ben-Shem *et al.*, 2011; Rhodin *et al.*, 2011). Asimismo, al formar parte del ribosoma maduro, pueden desempeñar funciones esenciales o específicas en el proceso de traducción. Se ha descrito que algunas RPs se requieren para mantener la fidelidad traduccional, como L5, L11 y L39 (Dresios *et al.*, 2000; Meskauskas y Dinman, 2001; Rhodin *et al.*, 2010); también algunas están implicadas en la cinética de la traducción, ya que mutaciones en algunas RPs pueden causar defectos en la actividad peptidil transferasa de la subunidad 60S (Dresios *et al.*, 2003). También se ha descrito que determinadas RPs son indispensables para traducir específicamente ciertos mRNAs en momentos concretos del desarrollo celular o bajo circunstancias de estrés (Kondrashov *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013). Por tanto, es predecible que alteraciones en la integridad de algunas RPs o de su cantidad, puedan 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.

En *S. cerevisiae*, 59 de las 79 RPs están codificadas por dos genes parálogos, posiblemente debido a una antigua duplicación del genoma precedida de la hibridación de dos especies de levadura (Marcet-Houben y Gabaldón, 2015). En algunos casos estas RPs parálogas son idénticas y en otros presentan ligeras diferencias en su secuencia aminoacídica. En cambio,

las secuencias reguladoras como los intrones, promotores y terminadores son completamente diferentes entre los genes parálogos, de manera que determinan cambios en la expresión génica de los distintos parálogos bajo múltiples condiciones fisiológicas (Bergkessel *et al.*, 2011; Parenteau *et al.*, 2011; Garre *et al.*, 2013). El estudio sistemático de mutantes de delección simple de uno de los dos genes parálogos en *S. cerevisiae* ha puesto de manifiesto que, aunque en muchos casos ambos comparten rasgos fenotípicos, no siempre las dos proteínas son funcionalmente equivalentes. Así, el perfil transcripcional de células que carecen de uno u otro parálogo es en muchos casos muy diferente (Komili *et al.*, 2007). Además, se han observado diferencias en el tamaño celular y en la selección del sitio de gemación (Ni y Snyder, 2001), en la organización de la actina (Haarer *et al.*, 2007), en la esporulación (Enyenihi y Saunders, 2003) y en la sensibilidad a drogas (Komili *et al.*, 2007; Parenteau *et al.*, 2011). La presencia de RPs parálogas favorece la existencia de subpoblaciones de ribosomas diferentes en su composición, ayudando a su especialización en la traducción de distintos mRNAs en determinadas condiciones fisiológicas (García-Marcos *et al.*, 2008; Filipovska *et al.*, 2013; Sauert *et al.*, 2015). A esta heterogeneidad en la composición de los ribosomas, contribuyen además tanto las modificaciones post-transcripcionales del rRNA, como las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las RPs, como la fosforilación, metilación, acetilación o ubiquitinación, las cuales además, pueden afectar diferencialmente a las dos proteínas parálogas (Kruiswijk *et al.*, 1978; Chow *et al.*, 2007; Panasenko *et al.*, 2011).

También se ha descrito que algunas RPs desempeñan funciones adicionales extra-ribosómicas, principalmente en organismos pluricelulares pero también en levaduras (Wool, 1996; Warner y McIntosh, 2009; Lindstrom, 2009). En general, estas funciones están relacionadas con el control del equilibrio entre elementos de la maquinaria ribosómica y el estrés nucleolar o la síntesis aberrante de ribosomas que lleva a la parada del ciclo celular y a apoptosis en organismos pluricelulares. Así, por ejemplo L2, L9, L30, S13 o S14 participan en la regulación de su propia expresión (Eng y Warner, 1991; Dabeva y Warner, 1993; Fewell y Woolford; 1999; Mitrovich y Anderson 2000; Malygin *et al.*, 2007). Proteínas como, L23, L26 o L11 pueden interactuar con la E3 ubiquitina-ligasa MDM2 impidiendo la degradación del supresor tumoral p53, dando lugar a una parada en el ciclo celular (Jin *et al.*, 2004; Ofir-Rosenfeld *et al.*, 2008; Goudarzi *et al.*, 2014). Sin embargo, se han descrito otros casos en el que RPs participan en otros procesos no relacionados con la maquinaria ribosómica. Así, S3 en mamíferos interviene en la reparación del DNA e interacciona con el factor de transcripción NFκB, o L10 en *Arabidopsis thaliana*, que participa en la defensa frente a infecciones víricas (Wan *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

Introducción

Cada vez se están descubriendo más casos de enfermedades humanas asociadas con defectos en la biogénesis de ribosomas, lo cual refleja la importancia de producir ribosomas correctamente competentes para la traducción. Dentro de estas enfermedades que se denominan **ribosomopatías**, destaca la anemia *Diamond-Blackfan (DBA)*, una enfermedad congénita rara que produce aplasia de células rojas. Más del 50% de los casos de DBA se producen por mutaciones en genes RPG, originando haploinsuficiencia de algunas RPs (Ball *et al.*, 2011; Gazda *et al.*, 2012; Horos y von Lindern, 2012; Aspesi *et al.*, 2014). Otras ribosomopatías cada vez mejor caracterizadas son el síndrome de *Shwachman-Diamond* que se origina por defectos en la liberación de Tif6 (Burroughs *et al.*, 2009; Finch *et al.*, 2011), la disqueratosis congénita en la que está afectada a la enzima Dkc1, encargada de la pseudouridilación del rRNA (Heiss *et al.*, 1998; Ruggero *et al.*, 2003), el síndrome de Treacher-Collins que se debe a mutaciones que afectan a la transcripción del rDNA (Dauwerse *et al.*, 2011) y la hipoplasia de pelo congénita que se produce por mutaciones que afectan a la RNAasa MRP, encargada de un paso concreto del procesamiento del pre-rRNA (Thiel y Rauch, 2011). Además, un aumento o una disminución en la cantidad de determinadas RPs está relacionado con la susceptibilidad a varios tipos de cáncer, como el cáncer hepático, de colon o gastrointestinal (Kondoh *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012; de Las Heras-Rubio *et al.*, 2013).

2. LA PROTEÍNA RIBOSÓMICA L16

L16 es una proteína ribosómica de la subunidad mayor del ribosoma que se encuentra conservada tanto en la subunidad 50S de bacterias y arqueobacterias como en la 60S eucariota. Sin embargo, la proteína eucariota tiene dos largas α -hélices en su extremo C-terminal que no aparecen ni en bacterias ni en arqueobacterias. De acuerdo con la nueva nomenclatura establecida para las proteínas ribosómicas en Ban *et al.*, 2014, L16 se designa como uL13, sin embargo, a lo largo de toda la memoria se le denominará como L16, de acuerdo a la nomenclatura anterior.

En *S. cerevisiae* L16 es esencial y como la mayoría de proteínas ribosómicas está codificada por dos genes parálogos, *RPL16A (YIL133c)* y *RPL16B (YNL069c)*, que tienen una similitud del 87% en su secuencia de nucleótidos. Ambos difieren tanto en la secuencia como en el tamaño de sus intrones y de las secuencias promotora y terminadora.

El gen *RPL16A* se localiza en el cromosoma IX y tiene una ORF codificadora de proteína L16A de 600 bp y un intrón de 290 bp; mientras que el gen *RPL16B* está localizado en el cromosoma XIV y su secuencia tiene 1046 bp, de las cuales 597 bp corresponden a la secuencia ORF codificadora de L16B y 449 bp al intrón (Fig. 5).

Aunque se ha descrito que algunos intrones de los RPG pueden intervenir en la regulación de la expresión del propio gen y del parálogo, parece que en el caso de los genes *RPL16A* y *RPL16B*, sus intrones no tienen un papel regulador en su transcripción (Parenteau *et al.*, 2011).

Los genes *RPL16A* y *RPL16B* de *S. cerevisiae* codifican dos proteínas que difieren en 19 aminoácidos, un número bastante elevado, ya que por lo general los genes parálogos RPG codifican proteínas idénticas o que presentan entre 1 y 3 aminoácidos diferentes. Ambas proteínas se caracterizan por la presencia de numerosos aminoácidos básicos y además, en ambas se han predicho distintas modificaciones post-traduccionales en varios residuos. La estructura secundaria y terciaria de ambas proteínas es idéntica. Esta estructura consta de dos zonas: dos largas α -hélices del extremo C-terminal, exclusivamente eucariotas, que comprenden casi un tercio de la proteína; y la zona conservada, formada por varias láminas beta y α -hélices que se pliegan adoptando una forma más o menos globular.

L16 forma parte del grupo de proteínas tempranas que se ensamblan en la primeras etapas de la maduración de las pre-partículas ribosómicas en el nucléolo (Pöll *et al.*, 2009; Gamalinda *et al.*, 2014; Ohmayer *et al.*, 2015).

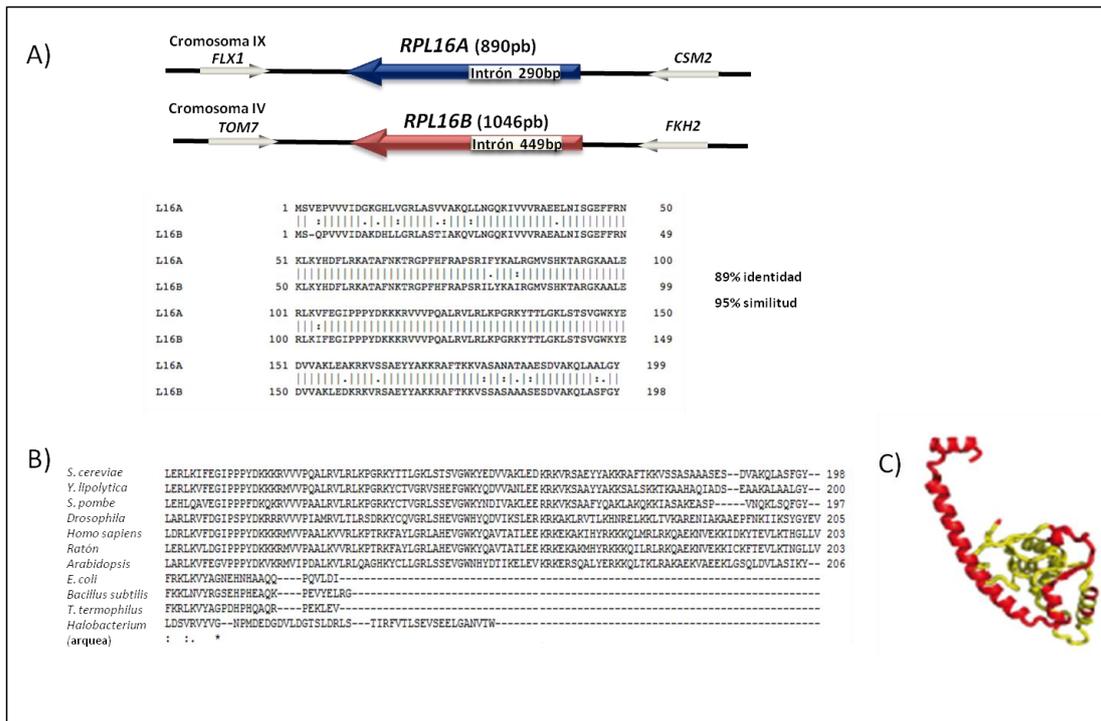


Figura 5. Representación esquemática de los genes RPL16A y RPL16B y comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas L16 que codifican. A) Se indican la localización en el genoma y el tamaño de los genes RPL16A y RPL16B, así como de sus intrones. Alineamiento de las proteínas que codifican ambos genes, señalándose los aminoácidos en que difieren. B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de proteínas L16 en distintas especies. C) Estructura de la proteína L16. El extremo C-terminal (rojo) es exclusivamente eucariota.

2.1 Localización y contactos de L16 en el ribosoma eucariota

Gracias a la reciente obtención de la estructura cristalográfica con alta resolución atómica de varios ribosomas eucariotas se ha podido determinar la localización de la proteína L16 (Armache *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Klinge *et al.*, 2011; Anger *et al.*, 2013; Voorhees *et al.*, 2014).

L16 se localiza en el ribosoma eucariota junto al segmento de expansión del rRNA 25S ES39L, en una zona expuesta al solvente, que se caracteriza por la presencia de numerosos elementos exclusivamente eucariotas, tanto en el rRNA como en las RPs. Esta zona del ribosoma se encuentra próxima al tallo P, que se ha descrito como sitio de unión de GTPasas y de factores de traducción (Spahn *et al.*, 2004). En la proximidad de este segmento de expansión ES39L, L16 contacta con las proteínas ribosómicas L14, L33 y L20, las cuales no tienen homólogos bacterianos y presentan varias extensiones específicas de eucariotas. Además el extremo C-terminal de L16 se encuentra entre los dominios II y VI del rRNA 25S junto a la región 5' del rRNA 5.8S, de manera que, esta parte de la proteína podría ser importante para cohesionar estos dominios en colaboración con las proteínas ribosómicas mencionadas anteriormente, y permitir la correcta formación del extremo 5' del rRNA 5.8S. Esta región del

rRNA 25S con la que interacciona L16 comprende las hélices H25 y H42 en el dominio II, H72 y H73 en el dominio V y H94 y H97 en el dominio VI (Klein *et al.*, 2004). Tanto la localización como los contactos de L16 se encuentran conservados en la evolución, pero además, en el ribosoma eucariota, su nuevo extremo C-terminal le va a permitir interactuar con nuevos elementos eucariotas, como proteínas ribosómicas, el rRNA 5.8S o el segmento de expansión ES39L (Fig. 6).

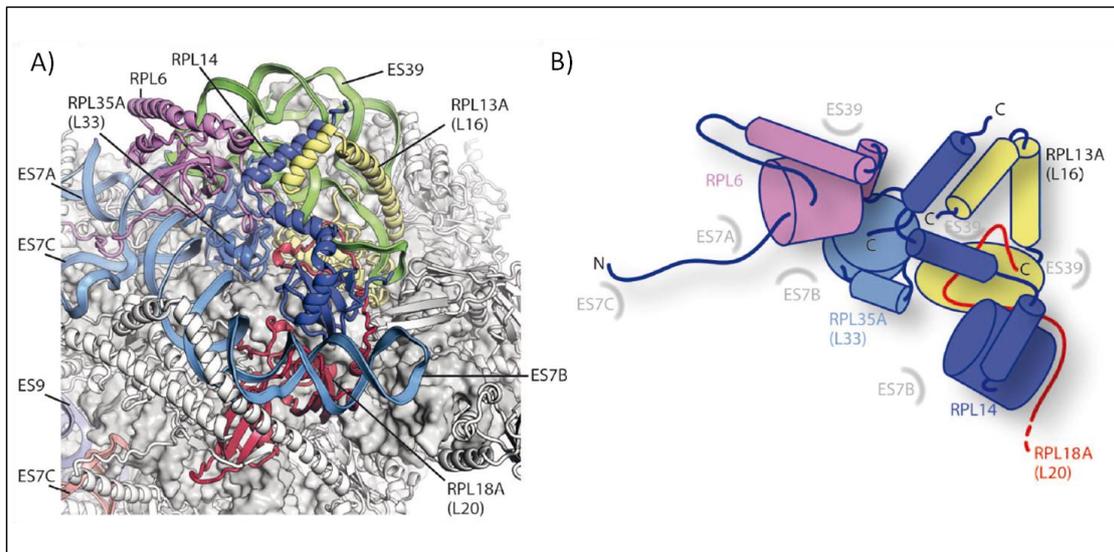


Figura 6. Localización de L16 en la subunidad 60S y sus contactos con otras RPs y segmentos de expansión del rRNA (ES). A) Región de la subunidad 60S de *Tetrahymena thermophila* próxima al ES39 y ES7 donde se localizan L16 y otras proteínas específicamente eucariotas. Entre paréntesis se indica el nombre de estas RPs en *S. cerevisiae*. B) Representación esquemática de las interacciones entre las RPs ilustradas en A) (Klinge *et al.*, 2011).

2.2 Funciones extra-ribosómicas de la ortóloga humana L13a

La proteína humana homóloga de L16 se denomina L13a y a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en células humanas parece que esta proteína no es esencial y que su ausencia no tiene efectos sobre la traducción global, el procesamiento del rRNA, la formación de polisomas o la fidelidad de la traducción (Chaudhuri *et al.*, 2007). Sin embargo, en macrófagos lleva a cabo una función extra-ribosómica que es esencial para resolver procesos inflamatorios tras la activación por Interferón- γ (IFN- γ). Tras la activación de la respuesta inflamatoria, L13a es fosforilada en su serina 77, lo que hace que sea liberada del ribosoma y pase a formar parte de un complejo denominado GAIT (*Gamma interferon-Activated Inhibitor of Translation*) que va ejercer un control traduccional de la expresión génica al impedir la traducción de numerosos mRNAs que codifican proteínas implicadas en la inflamación como el factor angiogénico VEGF-A, citoquinas y sus receptores (Mukhopadhyay *et al.*, 2008; Vyas *et al.*, 2009). De esta manera se regulan los procesos inflamatorios, impidiendo su activación continuada con los

Introducción

problemas que ello conllevaría. El complejo GAIT reconoce un “*hairpin*” en la región 3’ UTR de sus mRNAs diana y L13a dentro de este complejo interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4G en el sitio de unión de eIF3, impidiendo el reclutamiento del complejo de iniciación 43S y por tanto bloqueando el inicio de la traducción (Kapasi *et al.*, 2007) (Fig. 7). El descubrimiento de esta función extra-ribosómica implicada en el control traduccional ha sido muy importante para poner de manifiesto la importancia de las regiones 3’UTR en la regulación de la traducción, así como la posibilidad de que complejos macromoleculares puedan actuar como reservorios de proteínas que pueden ser liberadas por señales regulatorias y desarrollar funciones no canónicas fuera de ellos sin relación con su actividad original, en lo que se denominó “*depot hypothesis*” (Ray *et al.*, 2007). Se ha comprobado que en ratones tratados con lipopolisacárido bacteriano para inducir inflamación, la ausencia de L13a impide la resolución de estos procesos inflamatorios, manteniendo elevada la cantidad de citoquinas pro-inflamatorias (Poddar *et al.*, 2013). De igual modo, la ausencia de L13a tiene un severo efecto negativo en ratones con enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios como la aterosclerosis o la colitis ulcerosa (Basu *et al.*, 2014; Poddar *et al.*, 2015).

Aparte de su función en el control traduccional de mRNAs implicados en inflamación, L13a tiene un papel en la defensa antiviral formando parte de un complejo similar al GAIT que es capaz de bloquear la traducción de ciertos mRNAs virales. Así, en respuesta al virus respiratorio sincitial (RSV) L13a es fosforilada y se une a un complejo que reconoce la región 3’ UTR del mRNA que codifica la proteína de la cápsida del virus, impidiendo su traducción (Mazumder *et al.*, 2014). Asimismo, existe un motivo similar al presente en el 3’ UTR anterior, en el RNA genómico del coronavirus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) que es reconocido *in vitro* por el complejo GAIT y cuya presencia en un mRNA quimérico hace que este complejo inhiba su traducción (Marquez-Jurado *et al.*, 2015).

Por último, también se ha descrito que la ausencia de la L13a reduce significativamente la metilación del rRNA (Chaudhuri *et al.*, 2007). La interacción de L13a con la metil-transferasa fibrilarina podría causar este defecto en la metilación del rRNA, que además parece afectar a la traducción desde IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) de varios mRNAs celulares (Basu *et al.*, 2011). Existen estudios en los que se demuestra que defectos en modificaciones del rRNA afectan a la traducción global, al procesamiento del pre-RNA y a la fidelidad de la traducción (Baxter-Rosheck *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2009; Baudin-Baillieu *et al.*, 2009; Gigova *et al.*, 2014). Además, también se ha observado que una metilación defectiva del rRNA 18S es una de las causas del síndrome de Bowen-Conradi (Wurm *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2011).

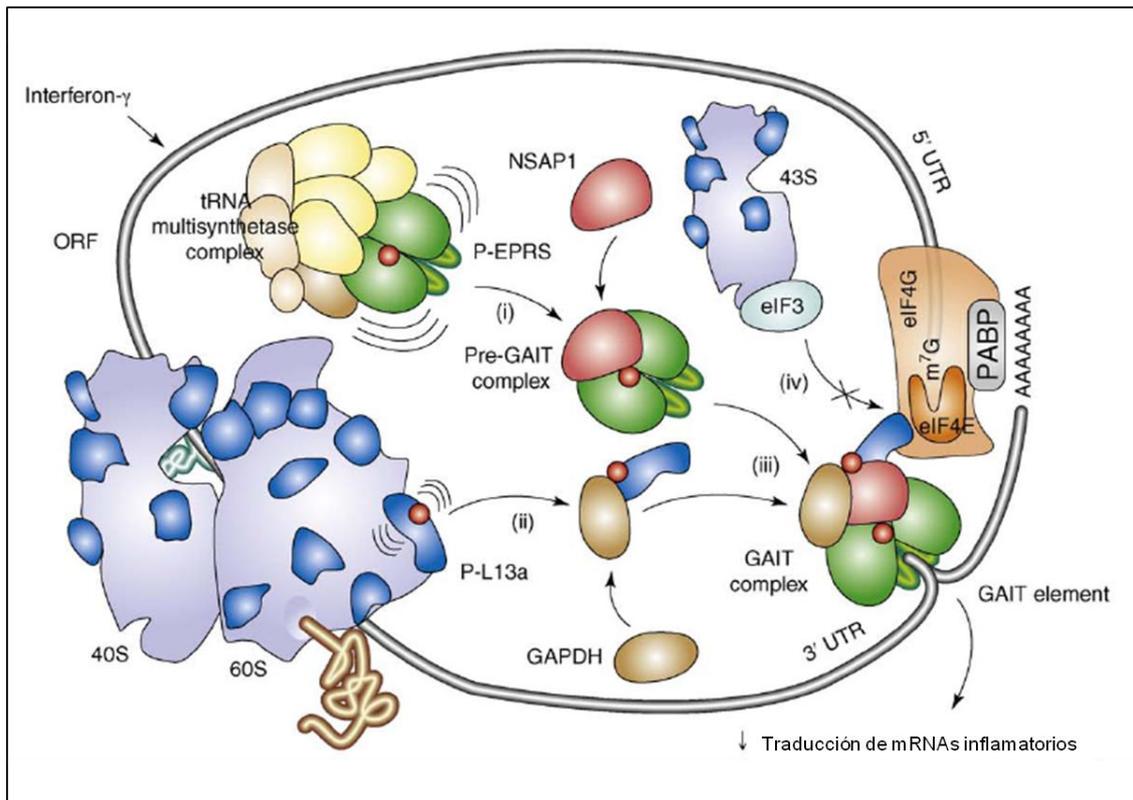


Figura 7. Control traduccional mediado por la respuesta GAIT. El tratamiento con IFN- γ desencadena una compleja ruta reguladora en la que el complejo GAIT modula la expresión de sus mRNAs diana. (i) IFN- γ induce la fosforilación y liberación de EPRS (glutamil-prolil tRNA sintetasa en verde) del complejo tRNA multisintetasa (amarillo). Este EPRS fosforilado interactúa con NSAP1 (“NS1-associated protein” en rojo claro) y forma un complejo pre-GAIT inactivo. (ii) L13a (azul oscuro) es fosforilada y liberada de la subunidad 60S y junto con GAPDH (marrón), se une al complejo pre-GAIT para formar el complejo GAIT funcional. (iii) Este complejo se une al elemento GAIT del 3’ UTR de sus transcritos diana circularizados por la interacción simultánea de la PABP (“poly(A)-binding protein” en gris) con eIF4G (naranja) y la cola poliA. (iv) P-L13a interactúa con eIF4G bloqueando el reclutamiento del complejo de preiniciación 43S unido a eIF3 (azul claro) y reprimiendo la traducción. eIF4E se muestra en naranja (Mukhopadhyay et al., 2009).

3. BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

Los ribosomas desempeñan un papel clave en el crecimiento celular en *S. cerevisiae*. Un crecimiento activo demanda gran número de ribosomas cuando existen nutrientes disponibles. La biogénesis de ribosomas es un proceso que comienza en el nucléolo y que requiere la transcripción del pre-rRNA, la síntesis de las RPs y la intervención de más de 200 factores de ensamblaje, como endo y exonucleasas, RNA helicasas, chaperonas, GTPasas, AAA-ATPasas y pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleolares (snoRNPs) para llevar a cabo conjuntamente el procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de las RPs. En este proceso se generan diferentes pre-partículas ribosómicas que, conforme van madurando, se desplazan a través del nucléolo al nucleoplasma y de éste son transportadas al citoplasma, donde desempeñan su función. Todo este itinerario es enormemente dinámico, ya que multitud de

Introducción

factores se asocian y se disocian una vez realizada su función, se originan gran cantidad de reordenamientos estructurales y se producen intercambios de proteínas que facilitan el tránsito de las pre-partículas ribosómicas y/o sirven como control de que el ensamblaje se está llevando a cabo correctamente. Cada vez hay más evidencias que sugieren que la mayor parte de las RPs pueden asociarse ya con los precursores del pre-rRNA más tempranos, aunque de manera débil. Estas interacciones débiles serán más fuertes a medida que los pre-ribosomas se van sintetizando progresivamente, hasta llegar a las que se observan en las subunidades maduras. El momento en el que las interacciones de las distintas RPs con las pre-partículas ribosómicas se estabilizan, permite su clasificación en tempranas, intermedias y tardías (Gamalinda *et al.*, 2014). Además, un retraso en el ensamblaje de la mayoría de las RPs altera la maduración del pre-rRNA, desencadenando la eliminación de las partículas incompletas.

La biogénesis de ribosomas supone un gran gasto energético para las células, ya que requiere una gran fracción de los recursos celulares destinados a la síntesis y al tráfico de macromoléculas. En este proceso participan las tres RNA polimerasas: las RNA-pol I y III transcriben los rRNAs y la RNA-pol II los mRNAs que codifican las RPs y los factores de biogénesis, lo que supone aproximadamente el 60% de su actividad. Asimismo, más de la mitad de los intrones de *S. cerevisiae* están en las RPs, por lo que también hay un gran requerimiento de la maquinaria del *splicing* (Warner, 1999). Uno de los principales sustratos del importe y exporte nuclear son las RPs y los factores de ensamblaje al entrar al núcleo y los pre-ribosomas al transportarse hacia el citoplasma. Además, no es sólo el gran consumo energético que supone, sino que tiene que realizarse numerosas veces y en poco tiempo en función de las condiciones fisiológicas, nutricionales o ambientales. En eucariotas la biogénesis de ribosomas está regulada principalmente por la disponibilidad de nutrientes a través de la ruta de transducción de señales TOR (*target of rapamycin*) (Mayer y Grummt, 2006; Kennedy y Kaeberlein, 2009; Spriggs *et al.*, 2010; Pestov y Shcherbik 2012), pero también en función de cambios en la temperatura y en el estrés osmótico (Bergkessel *et al.*, 2011; Garre *et al.*, 2013; Shalgi *et al.*, 2013), así como la carencia de algún aminoácido inhibiendo la transcripción de los genes que codifican para las RPs vía Gcn4 (Hinnebusch y Natarajan, 2002; Pleiss *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2011)

Importación de las RPs del citoplasma al nucléolo

Aunque la mayoría de las RPs son suficientemente pequeñas para entrar al núcleo por difusión, debido a la gran demanda celular de ribosomas, su importación nuclear está facilitada por transportadores que identifican las señales de localización nuclear (NLS) de las mismas (Bange *et al.*, 2013). Estas señales son reconocidas por una familia de proteínas denominadas β -importinas o carioferinas (Kap), que interaccionan con las nucleoporinas y con RAN-GTPasas, para mediar su translocación al interior del núcleo. En *S. cerevisiae* la mayoría de las RP son

reconocidas e importadas por la carioferina Kap123, aunque también existen otras con un papel redundante como Kap108 o Kap121 (Rout *et al.*, 1997; Sydorsky *et al.*, 2003).

Además de este mecanismo general, existen RPs que requieren de sistemas específicos para ser transportadas al núcleo. Por ejemplo, L5 y L11 necesitan la acción de la simportina Syo1 y Kap104, la proteína L3 requiere Rrb1 y la proteína S3 a la chaperona Yar1 (Iouk *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2012; Kressler *et al.*, 2012).

3.1 Procesamiento de los precursores del RNA ribosómico

La biogénesis de ribosomas comienza en el nucléolo con la transcripción a partir del DNA ribosomal (rDNA) del precursor primario 35S por la RNA-pol I y del rRNA 5S por la RNA-pol III. Los transcritos primarios nacientes se asocian co-transcripcionalmente con algunas RPs, numerosos factores pre-ribosómicos y con snoRNPs para formar grandes complejos ribonucleoproteicos denominados partículas pre-ribosómicas, en los que el pre-rRNA va a ser procesado, plegado junto con el ensamblaje de RPs y va a sufrir modificaciones covalentes (Venema y Tollervey, 1995) (Para revisiones ver Fernandez-Pevida *et al.*, 2014; Henras *et al.*, 2015). Estas modificaciones son básicamente 2' O metilaciones y pseudouridilaciones guiadas por snoRNAs de la familia C/D-box y H/ACA-box respectivamente (Balakin *et al.*, 1996; Badis *et al.*, 2003) y tienen lugar en regiones funcionalmente importantes del rRNA como el centro peptidil transferasa (Dez *et al.*, 2003; Fromont-Racine *et al.*, 2003).

La eliminación de las regiones espaciadoras del pre-rRNA es un proceso que consta de varias etapas (Fig. 8). El procesamiento se inicia con un corte en el sitio B₀, situado en la región 3' ETS del precursor 35S, llevado a cabo por la endonucleasa Rnt1 (Kufel *et al.*, 1999). Después, se producen de manera sucesiva los cortes tempranos en los sitios A₀ y A₁ de la región 5' ETS, produciendo los precursores 33S y 32S (Hughes y Ares, 1991; Beltrame *et al.* 1994). A continuación, la endonucleasa Rcl1 produce la escisión en el sitio A₂ dentro del ITS1 (Osheim *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2011), generando los pre-rRNAs 20S y 27SA₂ y así separando la maduración de las subunidades pre-40S y pre-60S (Veldman *et al.*, 1980; Hughes y Ares, 1991). Además de este procesamiento del precursor 35S, un gran porcentaje de los transcritos nacientes pre-rRNA sufre procesamiento co-transcripcional en el sitio A₂ (Kos y Tollervey, 2010).

El procesamiento del precursor 20S lo realiza la endonucleasa Nob1 (Fatica *et al.*, 2003) en el citoplasma, la cual produce un corte en el sitio D que origina el rRNA maduro 18S. Mientras, la maduración del pre-rRNA 27SA₂ continúa en el núcleo por dos vías alternativas:

Introducción

- Aproximadamente el 85% de los precursores 27SA₂ sufre un corte en el sitio A₃ por la RNasa MRP (Lindahl *et al.*, 2009), dando lugar al pre-rRNA 27SA₃ (Schmitt y Clayton, 1993; Chu *et al.*, 1994; Lygerou *et al.*, 1996). Seguidamente, la secuencia restante de ITS1 se elimina del 27SA₃ por la acción de las exonucleasas Rat1, Rrp17 y Xrn1, que digieren este precursor hasta el sitio B_{1S}, formando el pre-rRNA 27SB_S (Henry *et al.*, 1994; Oeffinger *et al.*, 2009).

- El 15% restante de pre-rRNA 27SA₂ es procesado directamente en el sitio B_{1L} por una endonucleasa desconocida para originar el precursor 27SB_L.

En ambos casos, el extremo 3' del rRNA 25S se forma por digestión exonucleolítica de la enzima Rex1 desde el sitio B₀ al sitio B₂, y que se produce al mismo tiempo que el corte B₁.

A partir de los precursores 27SBL y 27SBS, la ruta de procesamiento es idéntica y va a dar lugar a los rRNAs maduros 25S, 5.8S_L y 5.8S_B. Inicialmente se produce el corte en el sitio C₂ del ITS2, generándose los precursores 25.5S y 7_S y 7_L. A continuación, el extremo 5' del 25.5S es procesado por las exonucleasas Rat1, Rrp17 y Xrn1, eliminándose el fragmento restante del ITS2 y formándose el rRNA maduro 25S (Geerlings *et al.*, 2000). Finalmente los extremos 3' de los pre-rRNA 7S son procesados por la acción conjunta del exosoma (Allmang *et al.*, 1999), las exonucleasas Rex1, Rex2, Rex 3 (van Hoof *et al.*, 2000) y la nucleasa Ngl2 (Faber *et al.*, 2002), dando lugar a los rRNAs maduros 5.8S_L y 5.8S_S (Thomson y Tollervey, 2010). La diferencia del extremo 5' de estos rRNAs maduros se mantiene en eucariotas y ambas formas son funcionales, aunque la razón de la existencia de las dos no está muy clara (Mitchell *et al.*, 1996).

Por otra parte, el transcrito primario de rRNA 5S va a ser procesado en el extremo 3' por la exonucleasa Rex1 para dar lugar al rRNA maduro (van Hoof *et al.*, 2000).

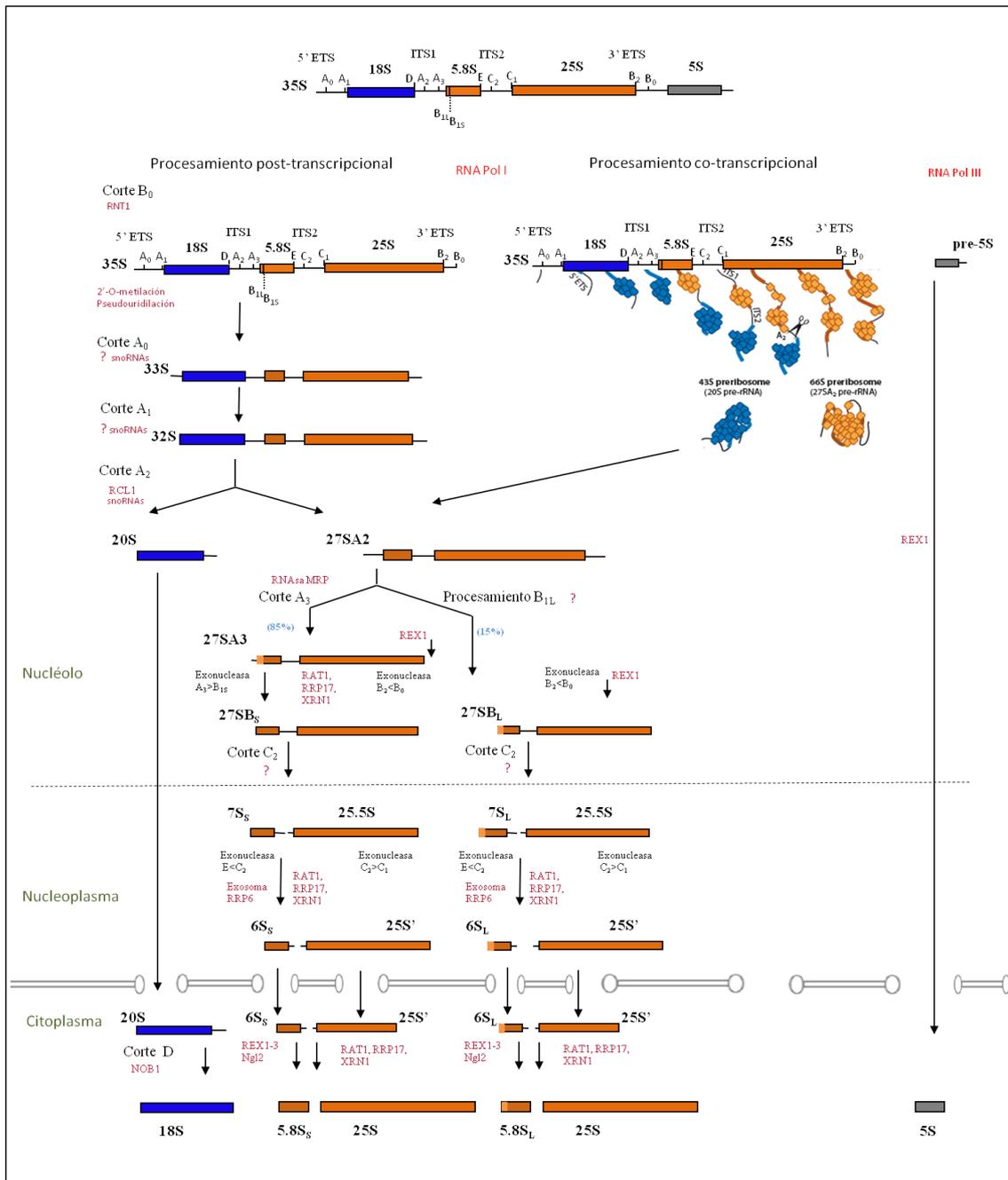


Figura 8. Esquema de la ruta del procesamiento de los precursores del rRNA en *S. cerevisiae*. Se muestra la estructura del precursor 35S y la ubicación de los sitios de procesamiento. El precursor 35S se va procesando por cortes exo y endonucleolíticos que se marcan con pequeñas flechas negras. El corte en el sitio A₂ separa los precursores de la subunidad 40S y 60S. Alternativamente el precursor 35S se puede procesar co-transcripcionalmente en los sitios A₀, A₁ y A₂. Las nucleasas responsables del procesamiento se muestran en rojo, indicándose aquellas todavía no identificadas con este símbolo (?).

3.2 Ensamblaje de las subunidades ribosómicas

El trabajo pionero de los laboratorios de Planta y Warner durante los años 70, permitió la caracterización de un complejo denominado pre-partícula 90S, en la que se consideraba que el pre-rRNA 35S se procesaba a la vez que se iban acoplando las proteínas ribosómicas, el rRNA 5S y factores de ensamblaje (Trapman *et al.*, 1975; Udem y Warner, 1972). Después de producirse el corte en el sitio A₂, la pre-partícula 90S se escinde en otras dos, los pre-ribosomas 60S (pre-66S) y 40S (pre-43S), precursores de las subunidades maduras 60S y 40S respectivamente (). Posteriormente, se descubrió que en la mayoría de las ocasiones, el procesamiento en el sitio A₂ ocurre co-transcripcionalmente, liberándose inmediatamente las partículas pre-40S y formándose las partículas pre-60S al ensamblarse las RPs y los factores de ensamblaje de la LSU en los transcritos nacientes 27S pre-rRNA (Osheim *et al.*, 2004; Kos y Tollervey, 2010; Horn *et al.*, 2011). Durante la última década las purificaciones de pre-partículas usando factores de ensamblaje unidos al epítipo TAP (“*Tandem affinity purification*”) y el desarrollo de la espectrometría de masas han permitido aislar y analizar la composición de distintas partículas pre-ribosómicas (Bassler *et al.*, 2001; Harnpicharnchai *et al.*, 2001; Fatica *et al.*, 2002). Estas aproximaciones han facilitado el ordenamiento de los eventos de ensamblaje en las rutas de maduración de las subunidades 60S y 40S permitiendo indagar molecularmente los pasos de este proceso tan dinámico (Grandi *et al.*, 2002; Nissan *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2003).

a) Pre-partículas ribosómicas 90S

En *S. cerevisiae* la formación de este precursor inicial denominado “pre-ribosoma 90S” ocurre al asociarse co-transcripcionalmente varias snoRNPs, numerosas RPs y factores de ensamblaje de la subunidad 40S al transcrito primario del rRNA 35S (Dragon *et al.*, 2002). Por el contrario, carece de la mayoría de los factores necesarios para la biosíntesis de la subunidad 60S (Grandi *et al.*, 2002). La formación de estos pre-ribosomas 90S o SSU procesoma (*small subunit processome*) ocurre al ensamblarse de una forma jerárquica subcomplejos proteicos pre-formados (Perez-Fernandez *et al.*, 2007). La composición de estos subcomplejos denominados UTP fue descrita por Krogan *et al.*, 2004, definiéndose posteriormente el orden jerárquico, según el cual la asociación del complejo UTP-A/tUTP con el pre-rRNA es necesaria para el posterior ensamblaje de los complejos snoRNP U3/UTP-B y Rrp5/UTP-C. Este ensamblaje está estrechamente unido a la modificación y el plegamiento del pre-rRNA y posiblemente dirige la compactación del pre-ribosoma 90S (Perez-Fernandez *et al.* 2011). Muchas de las proteínas que componen el subcomplejo tUTP intervienen no sólo en el procesamiento del pre-rRNA, sino también en la transcripción del rDNA (Gallagher *et al.*, 2004) (Fig. 9).

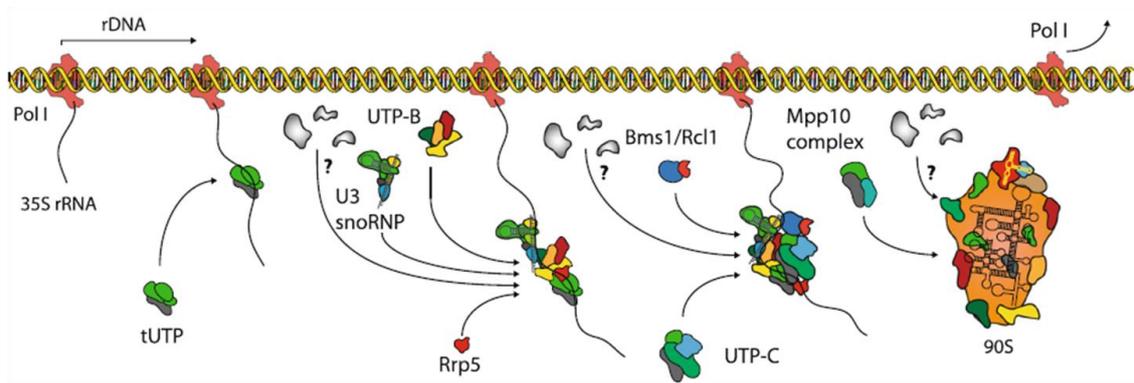


Figura 9. Modelo de la formación de la partícula pre-ribosómica 90S. El ensamblaje del subcomplejo tUTP con el pre-rRNA 35S inicia la asociación jerárquica de los complejos indicados para formar la partícula pre-ribosómica 90S, donde comienza la compactación y el procesamiento del pre-rRNA (Gerhardy *et al.*, 2014).

b) Pre-partículas ribosómicas 40S

La maduración de la subunidad 40S es un proceso relativamente simple que implica sólo a unos pocos factores ribosómicos, los cuales participan principalmente en el transporte núcleo-citoplasma y las etapas finales de maduración (Fig. 10). Tras el procesamiento en el sitio A₂ la mayoría de los factores unidos a la partícula 90S son liberados, aunque algunos permanecen como Enp1, Pno1, Dim1 y Hrr25 y además se asocian otros como Rio2 o Ltv1. Estos factores son necesarios para su transporte al citoplasma y para la incorporación de S3 (Schafer *et al.*, 2003; Gerbasi *et al.*, 2004; Schafer *et al.*, 2006). En estas pre-partículas también se encuentran las snoRNPs U14, snR10 y snR30 que intervienen en la producción del rRNA maduro 18S (Morrisey y Tollervey, 1997; Lemay *et al.*, 2011).

La presencia de la proteína S15 en las partículas pre-40S es necesaria para que sean exportadas al citoplasma. Este transporte está mediado por el factor Xpo1/Crm1 y el heterodímero Mex67-Mtr2 (Segref *et al.*, 1997; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Leger-Silvestre *et al.*, 2004). Se desconoce la identidad de la proteína adaptadora que se requiere para la interacción con Xpo1, pero se han propuesto varios factores como Ltv1, Dim2 y Rio2 (Seiser *et al.*, 2006; Vanrobays *et al.*, 2008; Zemp *et al.*, 2009).

En el citoplasma la partículas pre-40S carecen aún de las RPs S10 y S26 y contienen varios factores de ensamblaje asociados que previenen un inicio de la traducción prematuro, como Pno1, Rio2, Nob1 o Tsr1 que se encuentran en los sitios de unión de factores de inicio de la traducción (eIF1, eIF1A y eIF3), de las proteínas S10 y S26 y además ocluyen el canal de entrada del mRNA. La disociación citoplasmática de estos factores de ensamblaje es necesaria para que finalice la maduración de la subunidad 40S (Strunk *et al.*, 2011; Karbstein, 2011; Karbstein, 2013).

Introducción

El paso final de maduración de la partícula pre-40S es la dimetilación por Dim1 en el pre-rRNA 20S y el procesamiento en el sitio D por la endonucleasa Nob1 para originar el rRNA maduro 18S (Lafontaine *et al.*, 1994; Lamanna y Karbstein, 2009). Según varios autores para que esto ocurra es necesario que la pre-partícula 40S se una a través del factor eIF5B a subunidades maduras 60S formando una partícula denominada “80S-like particle” (Lebaron *et al.*, 2012; Strunk *et al.*, 2012; Garcia-Gomez *et al.*, 2014).

c) Pre-partículas ribosómicas 60S

A diferencia de la maduración de las pre-partículas 40S, la maduración de las pre-partículas 60S es mucho más compleja y se puede dividir en las siguientes etapas: una etapa temprana, en la que se forma un complejo temprano estable pre-60S tras la síntesis del precursor 27SA₂, hasta la formación de los pre-rRNA 27SA₃, 27SB_S o 27SB_L; una etapa intermedia, en la que ocurre el corte en el sitio C₂ y se elimina el ITS2, formándose los pre-rRNAs 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 (Fig. 10).

La pre-partícula 60S más temprana está asociada a numerosos factores de ensamblaje que van a ser liberados durante su maduración a lo largo del nucleoplasma por la acción de enzimas dependientes de energía como helicasas, ATPasas y GTPasas, lo que les permite participar en nuevas rondas de biogénesis. De esta manera, la complejidad de las partículas precursoras es cada vez menor.

- Etapa temprana

Durante esta etapa el precursor 27SA₂ es procesado para dar lugar al 27SA₃, el cual a su vez sufre la eliminación de la región ITS1 por medio de la acción de 12 “factores A₃” entre los que se encuentran Ebp2, Nop7, Erb1, Ytm1, Rlp7, Nop15 y Cic1 (Miles *et al.*, 2004; Jakovljevic *et al.*, 2012; Shimoji *et al.*, 2012). Estos factores se ensamblan de forma jerárquica siendo todos ellos interdependientes para su incorporación y necesarios para la posterior asociación de Drs1 y Has1 (Sahasranaman *et al.*, 2011; Dembowski *et al.*, 2013). En esta etapa suceden varios cambios en la composición de los factores ribosómicos, como la asociación de la AAA-ATPasa Rix7 que se necesitará para la liberación de Nsa1 previa a la transición del nucléolo al nucleoplasma (Kressler *et al.*, 2008). Mak5 está asociada con estas pre-partículas que contienen Nsa1 y parece interactuar con una serie de factores como Ebp2, Nop16 o Nop4 en lo que se ha denominado “cluster de Mak5”, organizando una serie de reordenamientos estructurales en la región de la subunidad 60S en la que se encuentra L16, L6, L14 y los segmentos de expansión ES7L y ES39L (Pratte *et al.*, 2013).

Otro evento importante que ocurre durante esta etapa temprana es la incorporación del rRNA maduro 5S en un complejo con las proteínas ribosómicas L5 y L11 y el adaptador Syo1 (Ciganda y Williams, 2011; Kressler *et al.*, 2012).

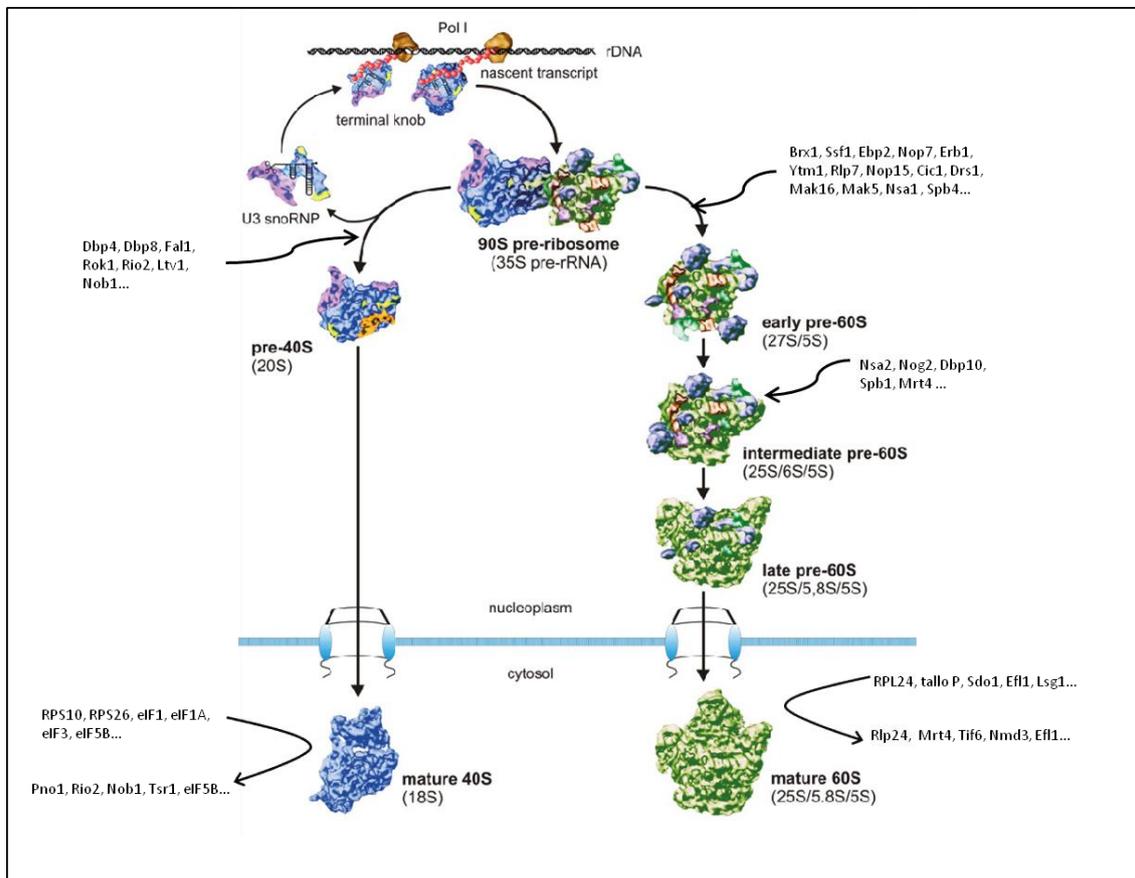


Figura 10. Representación esquemática de la maduración de las subunidades ribosómicas 60S y 40S en *S. cerevisiae*. El reclutamiento co-transcripcional de RPs y de factores de ensamblaje (procesoma) al pre-rRNA 35S origina el precursor ribosómico más temprano, la partícula 90S. El corte en el sitio A₂ separa estos pre-ribosomas 90S en las partículas pre-40S y pre-60S, cuya maduración es independiente. La asociación transitoria de factores de ensamblaje dirige esta maduración a lo largo de varias pre-partículas desde el nucleoplasma hasta el citoplasma, donde finalmente se formarán las subunidades ribosómicas 40S y 60S competentes para la traducción. Se indica la asociación y disociación de algunos factores, así como los pre-rRNAs más abundantes en las diferentes pre-partículas entre paréntesis (Adaptada de M. Bonshack).

- Etapa intermedia

Durante esta etapa, ya en el nucleoplasma, tiene lugar el procesamiento del pre-rRNA 27SB, eliminándose la secuencia ITS2 por el corte en C₂ que origina los precursores 25.5S y 7S. Para ello son necesarios 14 factores de ensamblaje denominados factores B (Talkish *et al.*, 2012), entre los que se encuentran Nsa2, Rlp24, Nip7, las helicasas Has1, Spb4, Drs1 y Dbp10 y las GTPasas Nog1 y Nog2. La mayoría de los factores A₃ y de los factores B se asocian en los pre-ribosomas tempranos, sin embargo Nsa2 y Nog2 se unen más tarde, antes de la escisión del

Introducción

ITS2 (Saveanu *et al.*, 2001; Lebreton *et al.*, 2006; Sahasranaman *et al.*, 2011; Talkish *et al.*, 2012).

- Etapa tardía

En esta etapa ocurren los últimos reordenamientos nucleares, que provocan la disociación de la mayoría de factores ribosómicos junto con el transporte de las pre-partículas al citoplasma. Además, en esta etapa finaliza el procesamiento del pre-rRNA 25.5S al rRNA maduro 25S y el del extremo 3' del precursor 7S, el cual comienza en el núcleo por la acción del exosoma originando el precursor 6S, que finalmente será procesado en el citoplasma dando lugar al rRNA maduro 5.8S (van Hoof *et al.*, 2000).

Una vez que las pre-partículas 60S han adquirido la competencia para ser exportadas, atraviesan los complejos de poro nuclear gracias a la acción de varios adaptadores como Mex67-Mtr2, Nmd3-Xpo1, Arx1-Alb1, Ecm1 y Bud20 que interactúan con las repeticiones de fenilalanina-glicina (FG) de las nucleoporinas permitiendo a las pre-partículas 60S casi maduras alcanzar el citoplasma (Santos-Rosa *et al.*, 1998; Gadgil *et al.*, 2001; Hedges *et al.*, 2005; Bradatsch *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008; Bradatsch *et al.*, 2012; Bassler *et al.*, 2012). Por otra parte, Nmd3 y Tif6 permanecen unidos en la zona de las pre-partículas 60S donde contacta la subunidad 40S, evitando asociaciones prematuras de ambas subunidades (Gartmann *et al.*, 2010; Sengupta *et al.*, 2010).

La maduración final de las pre-partículas 60S ocurre ya en el citoplasma e incluye la disociación de los factores de biogénesis, la incorporación de las últimas RPs y los eventos finales del procesamiento del rRNA. Estas etapas, van a ser cruciales para completar la maduración de las subunidades 60S, pero también para las siguientes rondas de biogénesis, ya que los factores de ensamblaje y transporte deben disociarse y reciclarse correctamente.

El primer paso de la maduración citoplasmática es la disociación de Rlp24 (“ribosomal like protein”) por la acción de la AAA-ATPasa Drg1, que implica al mismo tiempo el ensamblaje de la proteína ribosómica L24. Esto desencadena un mecanismo de “dominó” que provoca que el resto de factores se disocien de una manera secuencial y ordenada (Lo *et al.*, 2010; Kappel *et al.*, 2012). Paralelamente, la proteína L12 recluta al factor Yvh1, que cataliza la sustitución de Mrt4 por la proteína ribosómica 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 de la subunidad 60S, donde ocurre la disociación de Nmd3 por la GTPasa Lsg1 (Kallstrom *et al.*, 2003; Hedges *et al.*, 2005).

3.3 Mecanismos de vigilancia en la biogénesis de ribosomas

Durante la biogénesis de ribosomas pueden formarse ribosomas aberrantes con RPs o el rRNA alterados provocando variaciones en la estructura y en la funcionalidad del ribosoma. Sin embargo, existen mecanismos de vigilancia que detectan errores graves no tolerables y que pueden actuar incluso co-transcripcionalmente en la transcripción del rDNA (Wery et al., 2009).

En el núcleo, el complejo TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4 Polyadenylation Complex) marca a los precursores de rRNA que se han procesado o ensamblado erróneamente mediante la adición de residuos de adenina en su extremo 3', provocando su degradación por el exosoma (Allmang et al., 2000; LaCava et al., 2005; Dez et al., 2006; Houseley y Tollervey, 2006). Se ha sugerido que la mayoría de los complejos TRAMP-exosoma se concentrarían en un compartimento nucleolar denominado "No-body". Los pre-ribosomas ensamblados incorrectamente que escapen a este mecanismo de vigilancia nuclear se marcan para degradación en el citoplasma por la ruta "non-functional RNA decay" (NRD) (LaRiviere et al., 2006; Cole et al., 2009; Graille y Seraphin, 2012). Cada subunidad tiene su propia ruta independiente de vigilancia NRD. Las subunidades 60S sujetas al 25S NRD son degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) en focos perinucleares, mientras que las subunidades 40S se acumulan en unos gránulos citoplásmicos denominados "P-bodies" y en su degradación intervienen componentes de la maquinaria del mRNA "no-go decay" (NGD).

En el citoplasma, el principal mecanismo de control depende de factores que previenen uniones prematuras de los pre-ribosomas a los mRNAs y el inicio de la traducción temprano. Como se ha descrito anteriormente, existen una serie de factores como Pno1 o Rio2 que se localizan en las pre-partículas 40S en los sitios de unión de factores de inicio de la traducción, impidiendo que éstas participen en este proceso. En el caso de las pre-partículas 60S existen proteínas muy similares en estructura a RPs como Rlp7, Rlp24 o Mrt4 (*Ribosomal like proteins*), que ocupan el sitio de auténticas RPs hasta las últimas etapas de maduración, (Saveanu et al., 2003; Harnpicharnchai et al., 2001; Dunbar et al., 2000; Rodriguez-Mateos et al., 2009). En las pre-partículas 40S también se ha descrito la homología entre las RPs S1, S9 y S26 y los factores de ensamblaje Rrp5, Imp3 y Nob1 respectivamente (Venema y Tollervey, 1996; Lee y Baserga, 1999).

Además, también se ha propuesto que en el citoplasma las pre-partículas pre-40S pueden interaccionar con subunidades 60S maduras formando un partícula "80S like" (Lebaron et al., 2012) que analizaría su capacidad de unión a 60S y la capacidad de descodificación, enviándose a degradación aquellas pre-40S que no son funcionales.

Introducción

Por último, en condiciones de estrés o en condiciones que no requieran una gran demanda de ribosomas, como en fase estacionaria, las células tienen mecanismos para reciclar el exceso de ribosomas y de pre-partículas ribosómicas. Estos procesos son la ribofagia de las subunidades 60S maduras y la microautofagia en el núcleo de pre-partículas ribosómicas (“*piecemeal microautophagy of the nucleus*”, PMN) (Lafontaine, 2010).

4. TRADUCCIÓN

Los ribosomas maduros 80S, junto con los tRNAs y un elevado número de factores, constituyen la maquinaria traduccional, encargada de traducir la información genética contenida en los mRNA 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; para revisión ver Aitken y Lorsch, 2012). Durante esta etapa intervienen hasta 12 eIFs, que interaccionan entre sí, con el mRNA, con el tRNA y con los ribosomas (Dever, 2002; Jackson et al., 2010; Voigts-Hoffmann et al., 2012). En la Tabla 1 se enumeran los eIFs en *S. cerevisiae*, así como la función que desempeñan.

En la primera fase de la iniciación, la subunidad ribosómica 40S recluta el complejo ternario (CT) formado por el tRNA iniciador de metionina (Met-tRNA_i) el factor de inicio de la traducción eIF2 y una molécula de GTP, en una reacción estimulada por los eIFs 1, 1A, 3 y 5 (Asano *et al.*, 2000). El complejo de preiniciación (PIC) 43S resultante, se une primero al extremo 5' del mRNA gracias al complejo eIF4F compuesto por la RNA helicasa eIF4A, la proteína de unión al cap eIF4E y la proteína adaptadora eIF4G. A continuación, el PIC 43S rastrea la región líder del mRNA base por base buscando un codón de inicio AUG en un contexto favorable (“scanning”), usando la complementariedad con el anticodón del Met-tRNA_i.

eIF1 y eIF1A estabilizan una “conformación abierta” del PIC 43S que es capaz de llevar a cabo el “scanning” con el tRNA_i unido de tal manera, que le permite inspeccionar los tripletes sucesivos según van entrando en el sitio P del ribosoma (“P_{OUT}”). La proteína activadora de GTP, eIF5, estimula la hidrólisis del GTP unido a eIF2, sin embargo, la disociación del Pi de eIF2·GDP está bloqueada por la presencia de eIF1 en el complejo.

El apareamiento del tRNA_i con un codón AUG, provoca un reordenamiento de los factores en el complejo, que incluye el desplazamiento de eIF1 y la cola C-terminal de eIF1A de sus respectivas localizaciones cerca del sitio P y el movimiento de esta última hacia el dominio GAP de eIF5, permitiendo la disociación de eIF1 y la consiguiente liberación del Pi. Estos eventos desencadenan la transición del PIC hacia una “conformación cerrada” con el tRNA_i perfectamente acomodado en el sitio P (“P_{IN}”), lo que finalmente detiene el “scanning” (para revisión ver Hinnebusch 2011; Aitken y Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2014).

En este punto se liberan eIF2·GDP y eIF5. Una segunda GTPasa, eIF5B, media la unión de la subunidad 60S y el ensamblaje del complejo de iniciación 80S, con la colaboración de eIF1A. Esta unión de la subunidad 60S produce la hidrólisis de GTP por eIF5B, originando un cambio conformacional en el complejo y su liberación. Finalmente, la disociación de eIF1A deja libre el sitio A del ribosoma, con lo que puede unirse el primer tRNA de elongación, lo que supone la entrada del ribosoma en la fase de elongación de la síntesis proteica (Acker *et al.*, 2006).

Para que pueda tener lugar una nueva ronda de inicio de la traducción el CT debe formarse de nuevo, siendo para ello necesaria la sustitución del GDP unido a eIF2 inactivo por una molécula de GTP. Este reciclaje de eIF2·GDP a la forma activa eIF2·GTP, es realizado por el factor eIF2B. Este 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. Así, la fosforilación de la subunidad α de eIF2 impide este intercambio de GDP a GTP, disminuyendo la cantidad de CT en diferentes situaciones que inhiben la iniciación, como la carencia de aminoácidos.

Factor de iniciación	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 CT a la subunidad 40S y coopera con eIF1 en la selección del codón de inicio de la traducción
eIF2	GTPasa que junto al tRNA _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 nucleótidos de guanina para convertir el GDP a GTP unido a eIF2
eIF3	Promueve la unión del CT a la subunidad 40S y de ésta al mRNA, 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 mRNA
eIF4F	Complejo de unión al "cap" formado por eIF4A, eIF4E y eIF4G; desenrolla la región 5' del mRNA y media la unión del complejo 43S
eIF4G	Proteína adaptadora que interacciona con eIF3, eIF4A, eIF4E, PABP y con el mRNA 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 1. Factores de inicio de la traducción y funciones que desempeñan en *S. cerevisiae*

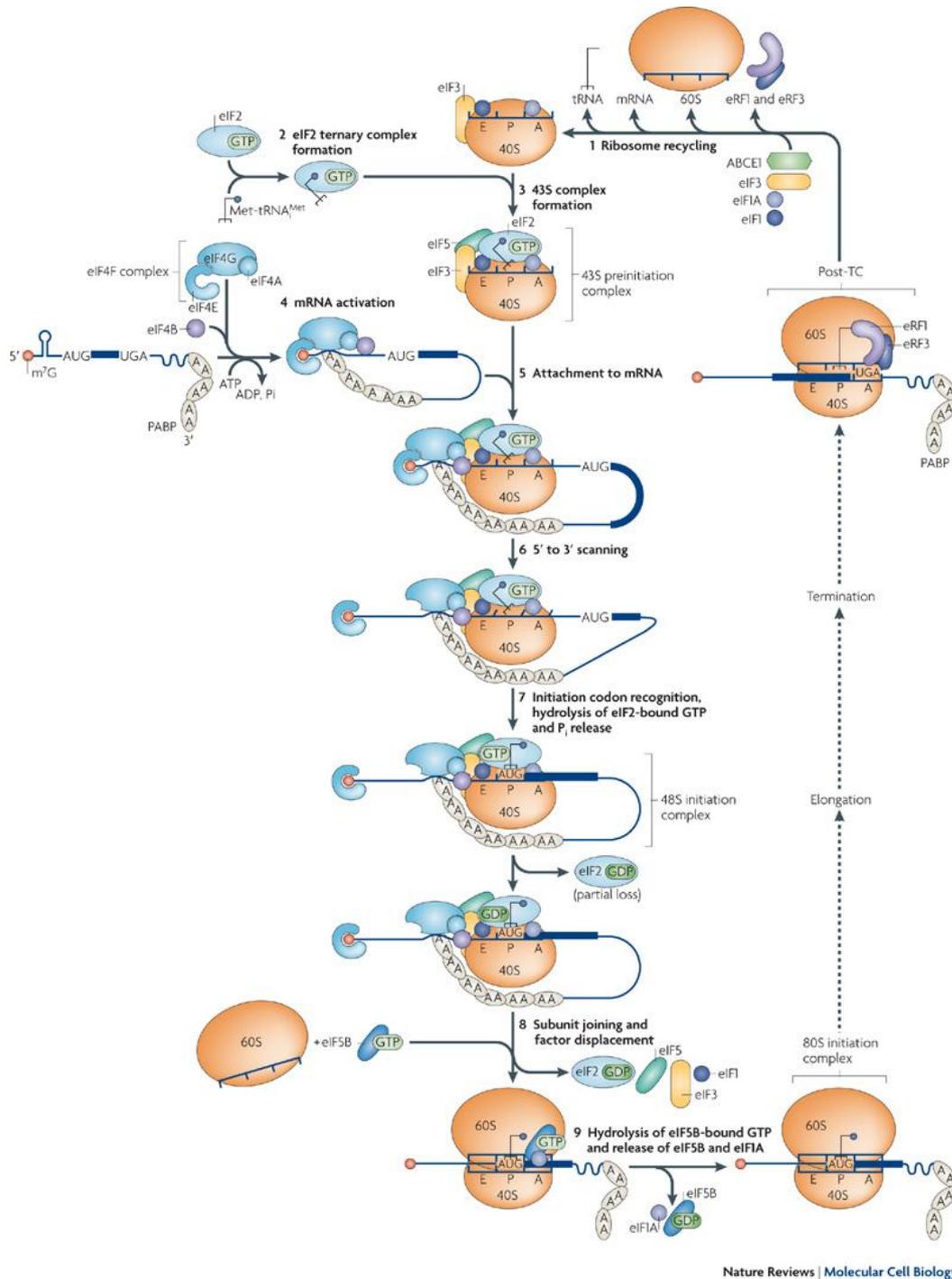


Figura 11. Modelo de iniciación de la traducción en eucariotas. El inicio de la traducción comienza con el reclutamiento del complejo ternario (TC) a la subunidad 40S con la ayuda de eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 para la formación del PIC43S, que se asocia entonces al mRNA activo cerca del extremo 5' con la ayuda de eIF4 y comienza el *scanning* en busca del codón de inicio (conformación "abierta", P_{IN}). Al reconocer el AUG correcto se cambia la conformación a "cerrada" (P_{OUT}), se disocia eIF1 y se libera el P_i y eIF2-GDP. Se une la subunidad 60S con la ayuda de eIF5B, que se liberará junto con eIF1A tras la formación del complejo de iniciación 80S (IC). En este momento el ribosoma comienza la elongación. Cuando se encuentra un codón sin sentido la cadena polipeptídica naciente se libera por los factores de terminación y el mRNA y las subunidades se disocian, reciclandose para una nueva ronda de traducción (Jackson *et al.* 2010).

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 mRNA. Se divide en 3 etapas: (i) Unión del tRNA 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).

Tras la iniciación, el ribosoma 80S está preparado en el mRNA con el anticodón del tRNA_i^{Met} emparejado con el codón de inicio y el segundo codón de la ORF en el sitio A esperando la unión del aminoacil-tRNA correspondiente. El factor de elongación eEF1A une este aminoacil-tRNA de manera dependiente de GTP y lo dirige al sitio A. El reconocimiento del codón por el tRNA hace que eEF1A hidrolice GTP y se libere, acomodando el aminoacil-tRNA en el sitio A. El factor eEF1B va a reciclar el eEF1A-GDP liberado a eEF1A-GTP. A continuación tiene lugar la formación del enlace peptídico acompañada de una transición de los tRNAs a un estado híbrido con los extremos aceptores moviéndose hacia los sitios P y E. Posteriormente, eEF2-GTP promueve la translocación final de los tRNAs a los sitios P y E, liberándose tras la hidrólisis de GTP. El ribosoma queda preparado para un nuevo ciclo de elongación con el tRNA deaminoacilado en el sitio E, el péptido en formación unido al tRNA en sitio P y un nuevo eEF1A-aminoacil-tRNA-GTP uniéndose al sitio A (para revisión ver Dever y Green, 2012).

Además de los factores de elongación canónicos eEF1 y eEF2, en levaduras y otros hongos superiores se requiere el factor eEF3, pero no así en mamíferos. Se ha propuesto que eEF3 podría facilitar la liberación del tRNA deaminoacilado del sitio E tras la translocación (Andersen *et al.*, 2006).

4.3 Terminación de la traducción en *S. cerevisiae*

La terminación de la traducción tiene lugar cuando uno de los tres codones sin sentido o de parada (UAA, UAG, UGA), que indican el final de la ORF codificada en el mensajero, entra en el sitio A del ribosoma. La terminación en eucariotas está catalizada por 2 factores de terminación eRFs: eRF1 y eRF3 (Zhouravleva *et al.*, 1995; Alkalaeva *et al.*, 2006). El factor eRF1 es el responsable del reconocimiento con alta fidelidad de los codones sin sentido y de la hidrólisis del peptidil-tRNA y eRF3 acelera la liberación del péptido e incrementa la eficiencia de terminación de una manera dependiente de GTP (Eyler y Green, 2011). Además, la ATPasa ABCE1 (Rli1 en levaduras) va a desempeñar un importante papel en esta hidrólisis y liberación de la cadena peptídica, así como en el reciclaje de los distintos factores una vez terminada la traducción (Pisarev et al., 2010; Barthelme *et al.*, 2011; Shoemaker y Green, 2011; Young *et al.*, 2015).

Cuando un codón de parada entra en el sitio A, el complejo eRF1-eRF3-GTP lo reconoce y tras la hidrólisis de GTP se libera eRF3. Posteriormente se une el factor ABCE facilitando la acomodación de eRF1 en una configuración activa y se produce la liberación de la cadena peptídica por la hidrólisis del enlace con el tRNA, finalizando así la traducción. En este punto las subunidad ribosómicas tienen que dissociarse y el mRNA y el tRNA deacilado liberarse para permitir nuevas rondas de traducción.

La disociación de las subunidades ribosómicas tiene lugar por la acción del complejo Dom34-Hbs1, estimulado por la hidrólisis de ATP que realiza Rli1 (Pisareva *et al.*, 2011; Shoemaker y Green, 2011; Becker *et al.*, 2012; Guydosh y Green, 2014). No obstante, existen casos en los que el complejo se separa sólo parcialmente para permitir una clase de eventos denominados como “reiniciación”.

4.4 Regulación de la traducción en *S. cerevisiae*

Los mecanismos de regulación traduccional son críticos en la regulación global de la expresión génica en eucariotas. Generalmente, la regulación traduccional puede ejercerse bien de manera general reduciendo la traducción global de los mRNAs celulares, o bien de manera específica, a través de sofisticados mecanismos que dependen de elementos *cis* y *trans* particulares para regular la síntesis de proteínas determinadas.

- Regulación global de la síntesis de proteínas

En condiciones adversas para el crecimiento celular, como son la carencia de nutrientes o diversos tipos de estrés, se produce la inhibición temporal y reversible de la síntesis general de proteínas, por medio de la fosforilación de la serina 51 de la subunidad α de eIF2 (Matts *et al.*, 1983; Dever *et al.*, 1992; Ashe *et al.*, 2000; Shenton *et al.*, 2006; Spriggs *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Shalgi *et al.*, 2013). Esta fosforilación reduce la actividad de eIF2B para el reciclaje de eIF2-GDP a eIF2-GTP, por lo que disminuye la cinética de formación del CT y de la síntesis de proteínas (Rowlands *et al.*, 1988; Dever *et al.*, 1995).

En *S. cerevisiae*, existe una sola proteína-quinasa de eIF2 α , Gcn2, que lo fosforila cuando las células carecen de algún aminoácido o purina (Dever *et al.*, 1992; Hinnebusch, 1994), o por limitación de glucosa (Ashe *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). En mamíferos, además de la ortóloga de Gcn2 (Harding *et al.*, 2000; Sood *et al.*, 2000), 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 y London, 1995), Perk se activa en respuesta a la alta concentración de proteínas sin plegar en el retículo endoplásmico (Harding et

Introducción

al., 1999), Pkr se induce por interferón o por RNA de doble cadena (Hovanessian, 1991; Samuel, 1993; Lemaire *et al.*, 2008).

- Regulación de la síntesis de proteínas específicas por uORFs

Uno de los mecanismos específicos de regulación traduccional es la “**reiniciación de la traducción**”, que se basa en la presencia de pequeñas fases de lectura abierta (uORFs, de upstream *Open Reading Frames*) en la secuencia líder de algunos mRNAs. La reiniciación se caracteriza por la capacidad de los uORFs para retener subunidades 40S (o PIC 43S) en la misma molécula de mRNA después de haber sido ellos traducidos por el ribosoma 80S y de que la subunidad 60S esté de nuevo disponible gracias a los mecanismos de reciclaje de ribosomas (Jackson *et al.*, 2012; Valasek, 2012).

Generalmente, la presencia de uORFs impone una barrera funcional a la expresión de la ORF principal, resultando en bajas cantidades de la proteína que codifica. Sin embargo, este efecto represor puede ser revertido bajo determinadas condiciones o tipos de estrés, en las que la presencia de uORFs promueve o incrementa la expresión de ORFs que permanecen silenciadas en condiciones fisiológicamente normales. El ejemplo mejor estudiado hasta la fecha es el del mRNA *GCN4*, en el que el control traduccional mediado por uORFs permite una respuesta celular rápida al estrés nutricional en *S. cerevisiae* ya que es muy sensible a las cantidades de CT, de varios factores eIF y de subunidades ribosómicas (Hinnebusch, 2005; Valasek, 2012). *GCN4* es un factor que activa la transcripción de más de 500 genes entre los que se encuentran los que codifican enzimas de las distintas rutas de la biosíntesis de aminoácidos en respuesta a la carencia de alguno de los mismos (Natarajan *et al.*, 2001; para revisión, ver Hinnebusch, 2005).

4.4 Regulación traduccional de *GCN4*

La expresión del gen *GCN4* está regulada traduccionalmente en función de la disponibilidad de aminoácidos, por un mecanismo de “reiniciación de la traducción” que depende de 4 cortas fases de lectura (uORFs 1-4) en la región líder del mRNA-*GCN4* (Hinnebusch, 1996) y por una serie de efectores positivos (GCN) y negativos (GCD).

- Elementos reguladores en *cis*:

Las 4 uORFs son elementos reguladores en *cis* que contienen 3 ó 4 codones codificantes y están situados entre -150 y -360 nucleótidos en posición 5' con respecto al codón de iniciación AUG de *GCN4*. La eliminación de las 4 uORFs por delección (Hinnebusch, 1984) o por mutaciones puntuales en sus codones de iniciación (Mueller y Hinnebusch, 1986) provoca la síntesis de Gcn4 constitutivamente, tanto en condiciones normales como de carencia de

aminoácidos. Por tanto las 4 uORFs regulan la traducción de *GCN4*. Sin embargo, no todas ellas contribuyen del mismo modo a la regulación traduccional. Se ha establecido que las uORF1 y uORF2 son elementos positivos que estimulan la expresión de *GCN4*, aunque en mayor medida la primera. Mientras que las uORF3 y uORF4 muestran un marcado efecto negativo, aunque mayor en el caso de la uORF4 (Mueller y Hinebusch, 1986).

La uORF1 tiene un efecto positivo sobre la reiniciación, ya que el 50% de subunidades ribosómicas permanecerán asociadas al mRNA de *GCN4* después de traducirla. Por el contrario, el efecto negativo de la uORF4 hace que la mayoría de los ribosomas se disocien del mensajero tras traducirla, de modo que no llegarán más que el 1% hasta el AUG de *GCN4* (Miller y Hinnebusch, 1989; Abastado et al., 1991).

- Elementos reguladores en *trans*:

La regulación traduccional de *GCN4* también depende de una serie de efectores que actúan en *trans*, denominados **GCN** y **GCD** (Harashima y Hinnebusch, 1986). Estos factores se identificaron mediante mutaciones que alteran la síntesis de *GCN4*. Según el fenotipo que causan, estas mutaciones se pueden agrupar en dos clases:

- Mutaciones recesivas en genes *GCN* (“**General Control Non-derepressible**”) mantienen reprimido a *GCN4* constitutivamente, 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, 1992). La incapacidad de mutantes *gcn* para desreprimir el *GCN4* y por tanto los genes de biosíntesis de aminoácidos controlados por él, hace que sean más sensibles que las cepas silvestres a diversos compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos como el sulfometuron metilo (SMM), un inhibidor de la biosíntesis de isoleucina y valina (LaRossa y Scholss, 1984; Falco y Dumas, 1985; Jia *et al.*, 2000).

- Mutaciones en genes *GCD* (**General Control Derepressed**) causan desrepresión constitutiva de la traducción de *GCN4* y de los genes regulados por él. El estudio de mutantes con fenotipo Gcd^- permitió identificar a las proteínas GCD como reguladores negativos de la síntesis de *Gcn4*, ya que reprimen su traducción en condiciones de suficiencia de aminoácidos (Hinnebusch, 1985; Harashima y Hinnebusch, 1986; Mueller *et al.*, 1987). Los mutantes Gcd^- , al contrario de los Gcn^- , son resistentes a compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos.

Además, las mutaciones *gcd* suprimen el efecto de las mutaciones *gcn*, indicando que las funciones de los genes *GCD* son posteriores a las de los *GCN* en la regulación traduccional

Introducción

de *GCN4* (Hinnebusch y Fink, 1983; Harashima y Hinnebusch, 1986; Hinnebusch 1992; Hinnebusch 1996).

El modelo de regulación traduccional de *GCN4* propone que:

A) En condiciones de **suficiencia de aminoácidos (Figura 12 A)** los ribosomas se unen a la secuencia líder del mRNA de *GCN4* y traducen la uORF1, tras lo cual aproximadamente el 50% de las subunidades 40S continúan asociados al mRNA, reiniciando el rastreo cadena abajo a lo largo del líder (Abastado *et al.*, 1991). En estas condiciones, la cinética de reciclaje de eIF2·GDP a su forma activa eIF2·GTP y la síntesis del CT es rápida, por lo que las subunidades 40S adquieren “a tiempo” los factores de iniciación y una subunidad 60S, para reiniciar la traducción en alguno de los restantes uORFs (uORF2, 3 y 4). La traducción de los uORF 3 y 4 provoca la disociación con alta frecuencia de subunidades ribosómicas y esto impide que un alto porcentaje de ellos alcance el codón de iniciación de *GCN4*. En consecuencia, **la traducción de *GCN4* está reprimida**.

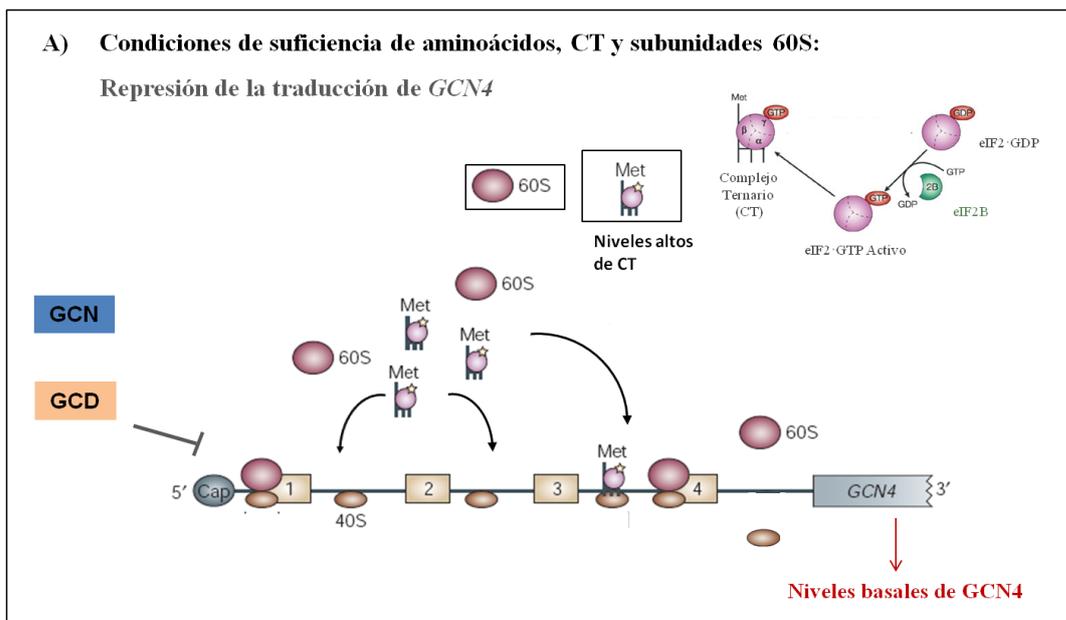


Figura 12A. Regulación de la traducción del mRNA *GCN4* en condiciones de suficiencia de aminoácidos y de complejo ternario (CT). Los factores GCD median la represión traduccional a través de las cuatro uORFs de la secuencia líder del mRNA *GCN4*. Después de traducirse la uORF 1, la subunidad 40S adquiere rápidamente el TC y reinicia la traducción en la uORF 2, uORF 3 o uORF 4. El ribosoma 80S se disocia del mRNA con alta frecuencia después de terminar la uORF 4, dejando la uORF auténtica de *GCN4* sin traducir (Adaptado de Gebauer y Hentze, 2004).

B) En condiciones de **carencia de aminoácidos (Figura 12 B)** existen altas concentraciones de tRNA descargados que estimulan la actividad quinasa de Gcn2. La unión de tRNAs no aminoacilados al dominio HisRS (histidil-tRNA-sintetasa) provoca un cambio en la conformación de Gcn2, activando su actividad quinasa, que produce la fosforilación de eIF2 α

(Wek *et al.*, 1989; Lageix *et al.*, 2014). En este proceso intervienen Gcn1 y Gcn20 (Vazquez de Aldana *et al.*, 1995; Garcia-Barrio *et al.*, 2000; Garcia-Barrio *et al.*, 2002; Sattlegger y Hinnebusch, 2005). El complejo Gcn1-Gcn20 facilita la unión del tRNA descargado al sitio A del ribosoma, o su transferencia desde el sitio A al dominio HisRS de GCN2, para su activación (Hinnebusch y Natarajan, 2002; Hinnebusch, 2005).

Cuando hay insuficiencia de algún aminoácido la cinética de formación del complejo ternario es más lenta debido a la fosforilación de eIF2 α por Gcn2. Los ribosomas que han traducido la uORF1 no adquieren complejo ternario “a tiempo” para traducir las otras uORFs y continúan el rastreo hacia el AUG auténtico de *GCN4* en un proceso denominado *leaky scanning* (Abastado *et al.*, 1991). El modelo se basa en evidencias experimentales que indican que las subunidades 40S han recorrido un espacio suficiente y ha transcurrido el tiempo necesario para que se recicle el CT cuando alcanzan el AUG de *GCN4*, (Dever *et al.*, 1992). De este modo, la fosforilación de eIF2 α favorece la traducción de *GCN4*, que activa la transcripción entre otros, de múltiples genes de las diferentes rutas de biosíntesis de aminoácidos.

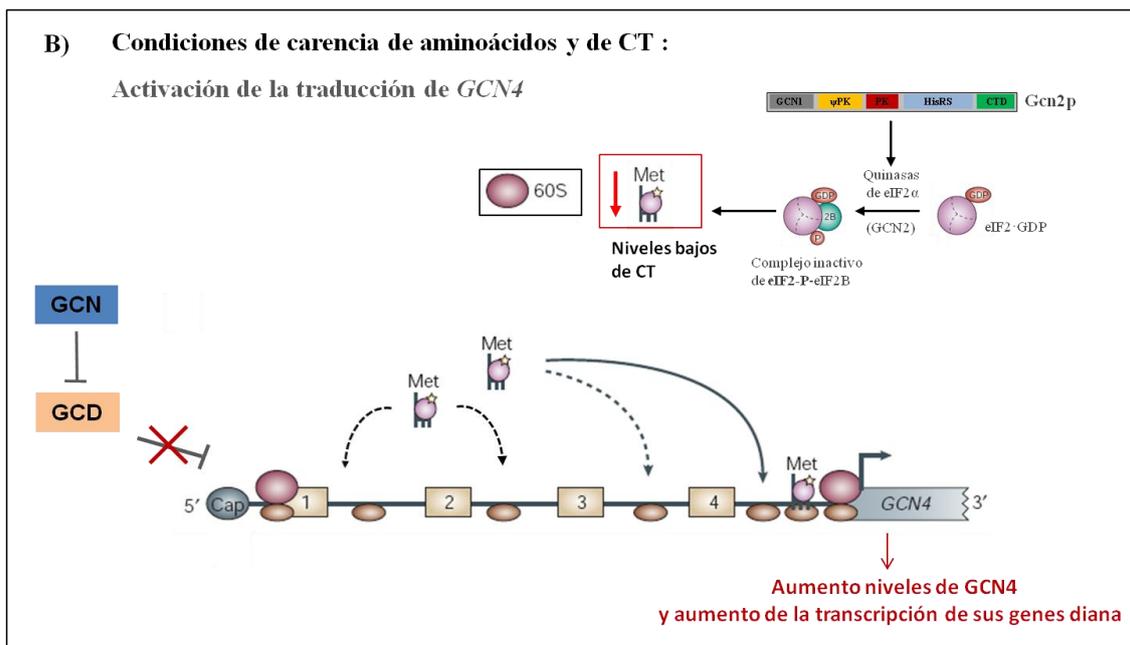


Figura 12B. Regulación de la traducción del mRNA *GCN4* en condiciones de carencia de aminoácidos y de complejo ternario. En situaciones de carencia de aminoácidos Gcn2 fosforila a eIF2 α , disminuyendo la cinética de formación del CT y su concentración, por lo que muchos ribosomas 40S lo adquieren una vez que han sobrepasado la uORF 4. De este modo la reiniciación de la traducción ocurre en la ORF real de *GCN4*, aumentando su síntesis.

C) La traducción del mRNA *GCN4* está regulada además por la integridad y disponibilidad de subunidades 60S. Así, mutaciones que afectan a proteínas RPL o la delección de uno de los parálogos que la codifican inducen la expresión de *GCN4* (Foiani *et al.*, 1991; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Steffen *et al.*, 2008). En estos mutantes, las subunidades 40S que

Introducción

hayan traducido la uORF1 contienen ya los eIFs necesarios y vuelven a ser “equipadas para reiniciar” al adquirir pronto el CT, pero si no unen subunidad 60S “a tiempo”, o éstas tienen defectos para unirse a ellas o los ribosomas no son completamente funcionales, realizarán “leaky scanning” o rastreo sin lectura de algunos o todos los siguientes uORFs. Por lo que se incrementará el flujo de subunidades 40S reiniciadoras en dirección 3’, aumentando el número de los que alcanzarán la ORF de *GCN4*, traduciéndola (**Figura 12 C**).

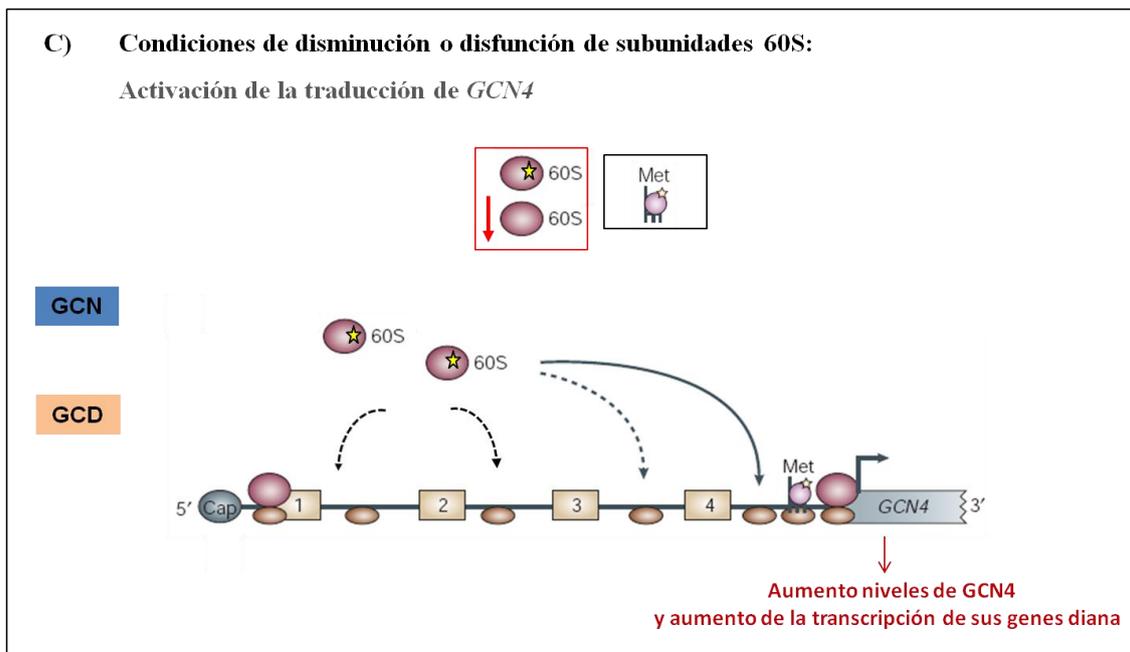


Figura 12C. Regulación de la traducción del mRNA *GCN4* en “mutantes 60S”. En aquellas condiciones en las que la cantidad o la funcionalidad de subunidades 60S se encuentre disminuida, la mayoría de subunidades 40S que tras la traducción de la uORF 1 continúan el rastreo, no van a unir a tiempo subunidades 60S para traducir las siguientes uORFs. Por tanto, se favorece que la adquieran para la traducción de la ORF de *GCN4* (fenotipo *Gcd*). Sin embargo, si los defectos en las subunidades 60S impiden la traducción efectiva de la uORF1 no tendría lugar la activación de la síntesis de *GCN4* (fenotipo *Gcn*).

Antecedentes y fundamento

Un objetivo de nuestro grupo es identificar nuevas funciones biológicas esenciales para la iniciación de la traducción eucariótica o su regulación. Para ello, empleamos como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el sistema de regulación traduccional de *GCN4*.

Debido a las características peculiares de su secuencia líder, la traducción del mRNA *GCN4* es altamente sensible a mutaciones que alteran la cantidad o la funcionalidad de componentes esenciales de la maquinaria traduccional. Así, la regulación traduccional de *GCN4* ha permitido identificar nuevos factores que intervienen en la traducción general de mensajeros (proteínas ribosómicas, factores de inicio de la traducción, proteínas implicadas en la síntesis o procesamiento del tRNA iniciador, la biosíntesis del GTP, la formación del complejo ternario etc.). Además, es posible valorar el efecto que tienen sobre su traducción mutaciones sintéticas en genes que codifican componentes esenciales de la maquinaria de síntesis de proteínas.

La caracterización de mutantes espontáneos *gcd* de *S. cerevisiae* en los que la traducción del mRNA *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. Entre ellos, *GCD17* codifica la proteína esencial L33A, un componente de la subunidad ribosómica 60S. La proteína L33A es indispensable para la maduración de precursores específicos de los RNA 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 analizar las funciones precisas que pueden tener otras proteínas ribosómicas en la biogénesis de los ribosomas y en la iniciación o la regulación de la traducción.

El ribosoma eucariota ha adquirido un renovado interés debido al creciente número de evidencias experimentales que le confieren un papel regulatorio en el control de la expresión génica (Xue y Barna, 2012). Asimismo, las estructuras de alta resolución del ribosoma de *S. cerevisiae* y de otros organismos eucariotas publicadas recientemente, permiten predecir e identificar nuevas interacciones moleculares entre los rRNA y las proteínas ribosómicas, o de esos componentes con factores de traducción, que contribuyan a entender más acerca de este proceso y su regulación

En la levadura *S. cerevisiae*, X de las 79 proteínas ribosómicas (RP) son esenciales para la viabilidad celular, ya que participan en el procesamiento de los precursores y el plegamiento secuencial de los rRNA y en la formación de las sucesivas pre-partículas ribosómicas durante la biogénesis de los mismos. Las RPs contribuyen a la estabilidad y la funcionalidad del ribosoma maduro y a la regulación de la expresión génica, ya que interactúan específicamente con factores solubles de traducción, o con regiones concretas del mRNA o los tRNAs durante la

Antecedentes y fundamento

síntesis de proteínas en los eucariotas. A pesar de que la secuencia de aminoácidos y la estructura de las RPs están bastante conservadas evolutivamente en los tres dominios de la vida, poco se sabe de la función precisa que desempeñan muchas de ellas en los ribosomas maduros, particularmente, aquellas que son nuevas o exclusivas del ribosoma eucariota o aquellas que, estando ya presentes en bacterias y arqueobacterias, poseen extensiones aminoacídicas nuevas.

Cuando una RP esencial no se ensambla a tiempo o no lo hace adecuadamente durante la biogénesis de los ribosomas, se interrumpe la ruta de procesamiento de ciertos precursores de los rRNAs (pre-rRNA) en sitios concretos de los transcritos y la maduración de partículas precursoras de las subunidades ribosómicas 60S y/o 40S, que si son muy defectuosas son eliminadas generalmente por distintos sistemas de vigilancia celulares. En la mayoría de los estudios recientes acerca de las funciones de las RP esenciales en *S. cerevisiae* se han descubierto los efectos que produce una reducción de su dosis en la biogénesis de los ribosomas (bien eliminando uno de los dos genes parálogos que las codifican, en su caso, o bien usando promotores reprimibles) (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Poll *et al.*, 2009; Gamalinda *et al.*, 2013; Fernandez-Pevida *et al.*, 2014). Sin embargo, se desconoce el papel exacto que desempeñan la mayoría de las RPs, así como sus diferentes dominios estructurales, en la síntesis de proteínas que efectúa el ribosoma maduro.

Para identificar los aminoácidos o los dominios estructurales, conservados o específicos de las RP eucarióticas que determinan algunas de sus funciones esenciales en los procesos mencionados, particularmente en la traducción, es necesario disponer de versiones mutadas o alteradas que se incorporen en los ribosomas y caracterizar los fenotipos de los mutantes viables correspondientes. Para estudiar dichos procesos, se pueden aprovechar las ventajas que ofrece el análisis mutacional y las numerosas herramientas moleculares y aproximaciones experimentales que se han desarrollado en el organismo modelo *S. cerevisiae*. Estos estudios aportarán información sobre las funciones fisiológicas de las RP, ya que se podrá correlacionar el fenotipo de los mutantes con las interacciones que puedan alterar las respectivas mutaciones en la estructura de alta resolución del ribosoma 80S de la levadura.

Objetivo

El **objetivo** de este trabajo ha sido investigar las funciones primarias de la proteína ribosómica eucariótica L16/uL13 en la biogénesis de ribosomas y en la traducción de *S. cerevisiae*. Para ello, se realizó mutagénesis al azar y dirigida de *RPL16B*, uno de los dos genes parálogos que codifican esta proteína esencial componente de la subunidad 60S del ribosoma en *S. cerevisiae*, tratando de obtener **mutantes hipomórficos**, o de pérdida parcial de función.

En la primera parte de esta memoria se describe la caracterización genotípica y fenotípica de varios mutantes hipomórficos (*rpl16b**) obtenidos por mutagénesis al azar y en la segunda la caracterización de dos mutantes (*rpl16bΔCT*) que codifican proteínas truncadas carentes de parte del extremo carboxilo terminal exclusivamente eucariótico de L16 y que fueron obtenidos por mutagénesis dirigida.

Resultados

Capítulo 1

1. MUTAGÉNESIS ALEATORIA DEL ALELO *RPL16B Δ _i*

Como se ha mencionado en la Introducción, de acuerdo con la nueva nomenclatura establecida para las proteínas ribosómicas en Ban *et al.*, 2014, L16 se designa como uL13, sin embargo, a lo largo de toda la memoria se le denominará como L16, de acuerdo a la nomenclatura anterior.

Nuestro objetivo era generar mutaciones en la fase de lectura abierta (ORF) de *RPL16B* que afectasen a la secuencia de aminoácidos de la proteína L16 y que no alterasen (potencialmente) la regulación de la expresión de dicho gen. Dado que *RPL16B* posee un intrón de 449 bp que es de tamaño similar al de la ORF (598 bp), construimos un alelo carente de intrón sobre el que se realizaría la mutagénesis aleatoria. Con esta finalidad se construyeron los plásmidos pAGH1 y pAGH2, los cuales portan un alelo funcional *RPL16B Δ _i* que consta del promotor natural, la ORF y la región 3' UTR del gen *RPL16B* clonado en los vectores centroméricos YCplac111 (*CEN4, LEU2*) e YCplac33 (*CEN4, URA3*) respectivamente (Ver Materiales y Métodos).

El alelo *RPL16B Δ _i* clonado en el plásmido pAGH1 se sometió a mutagénesis al azar *in vitro* con el kit “GeneMorph II EZ-Clone Domain Mutagenesis Kit” de Agilent (Materiales y Métodos y Fig. 13), que permite generar transiciones y transversiones de las diferentes bases nitrogenadas del DNA con una frecuencia similar. Se llevó a cabo una primera reacción de PCR para la amplificación del molde *RPL16B Δ _i* con una DNA polimerasa de baja fidelidad (*Mutazyme II*) y después, la colección de moléculas mutadas se usó como cebador o “megaprimer” para amplificar todo el plásmido pAGH1 usando una polimerasa de alta fidelidad (Materiales y Métodos). A continuación, se transformó con los plásmidos amplificados células ultracompetentes de *E. coli*, se recogieron conjuntamente las colonias de 2200 transformantes individuales y se purificó a partir de ellas DNA plasmídico, obteniéndose una genoteca de plásmidos con alelos mutados *rpl16b Δ _i**.

Se transformó con la genoteca obtenida la cepa de levadura haploide Hm699 (*Arpl16a Arpl16b ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 [RPL16B CEN4 URA3]*), que deriva de la cepa TY931 (Pöll *et al.*, 2009) y se seleccionaron aproximadamente 5.000 transformantes capaces de crecer en medio sin leucina (Leu⁺), que se extendieron en placas de medio mínimo SD sin uracilo (-ura) ni leucina (-leu), de modo que mantuvieran a la vez el plásmido silvestre (*URA3*) y los posibles plásmidos mutados (*LEU2*). Estas placas se replicaron a medio SD con ácido 5-fluororótico (5-FOA) (Boeke *et al.* 1984) y se incubaron a 28°C. En este medio se seleccionaron aquellos transformantes que pudieran perder el gen silvestre clonado en el vector *URA3* (Ura⁻) y que portaran los alelos con mutaciones viables en el plásmido con el marcador *LEU2* (*rpl16b Δ _i** *CEN4 LEU2*) (Ver Figura 13B). Posteriormente, se analizó mediante réplica en placa el fenotipo

Resultados

de crecimiento de los transformantes viables en 5-FOA, para analizar si esos clones Ura⁻ mostraban crecimiento lento (*slg*) a una o varias temperaturas (18°C, 28°C y 37°C), indicativo de la pérdida parcial de función de la proteína esencial L16. De este modo, se seleccionaron 70 clones con marcado fenotipo *slg* y se recuperaron en *E. coli* los plásmidos con cada uno de los alelos *rpl16bΔ_i** mutantes (Filetici et al. 1985) (Materiales y métodos). Se transformó de nuevo con cada uno de ellos la cepa Hm699, para determinar en qué casos los fenotipos *slg* dependían de la presencia de un plásmido portador de un alelo *rpl16bΔ_i** y descartar aquellos en los que se debiera a la aparición de alguna mutación cromosómica espontánea.

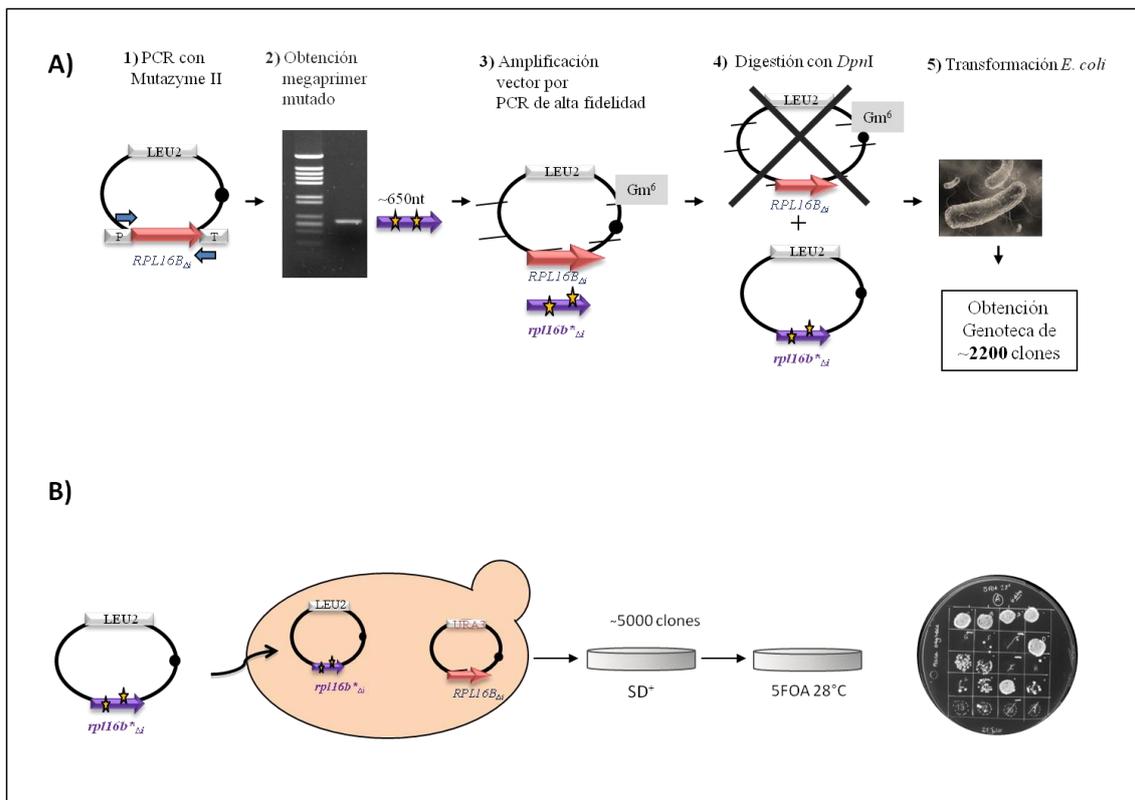


Figura 113. Esquema de la estrategia seguida para (A) la obtención de la genoteca de alelos mutantes *RPL16BΔ_i** en *E. coli* y (B) la selección de mutantes *rpl16bΔ_i** *ura⁻* de *S. cerevisiae*.

Finalmente, se secuenciaron 50 alelos mutantes *rpl16bΔ_i**, tanto la secuencia codificante como la región promotora y terminadora, utilizando los oligonucleótidos *L16BmutF* y *L16BmutR* (Materiales y Métodos, Tabla 3 Anexos). La gran mayoría de los alelos tenían una única mutación, aunque también se recobró alguno con varias mutaciones. En estos casos las mutaciones se generaron independientemente como se describe en Materiales y Métodos. Para ello, los alelos mutados se digirieron con endonucleasas de restricción con sitios de corte únicos (*Bgl*III, *Sac*I y *Acc*I), dando lugar a fragmentos que contenían una sola mutación o dos en algún

caso, los cuales se subclonaron posteriormente dentro de la secuencia codificante de la proteína, en el plásmido pAGH1 digerido con las mismas enzimas.

Se obtuvieron así, más de 40 mutantes con una única mutación, que en muchos casos provoca cambios en aminoácidos conservados evolutivamente en la estructura de L16, o en residuos que se predice de la estructura que interaccionan con determinados rRNAs o con otras RPs de la subunidad 60S.

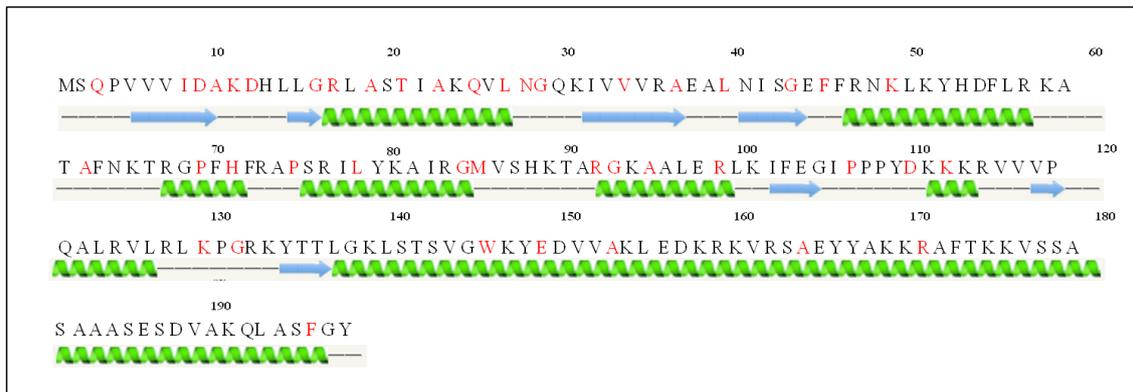


Figura 14. Aminoácidos de la proteína L16B sustituidos por las distintas mutaciones *rpl16bΔ** aisladas. Las α -hélices y las láminas β de la estructura secundaria de L16B se representan como hélices verdes y como flechas azules respectivamente. Los residuos sustituidos se muestran en rojo.

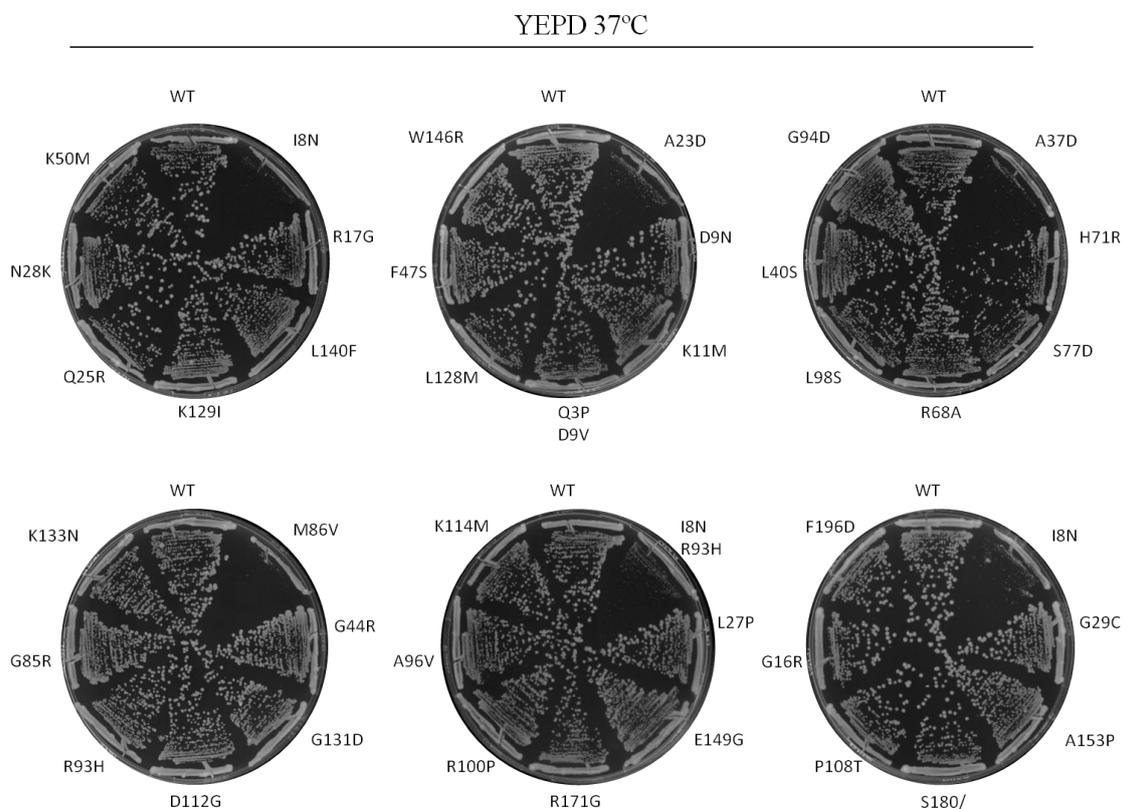


Figura 15. Fenotipo de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ que portan los alelos *RPL16B Δ* , que se indican. Células que portan los alelos *RPL16B Δ* , indicados se estiraron en placas de YEPD que se incubaron durante los días a 37°C.

Resultados

Finalmente, se volvió a comprobar el fenotipo de crecimiento lento *slg* de los mutantes *rpl16b* Δ_i^* seleccionados y se eligieron los cinco con un fenotipo más marcado, los cuales contienen los siguientes cambios de aminoácidos:

- ❖ I8N
- ❖ A23D
- ❖ A37D
- ❖ M86V
- ❖ I8N R93H

La caracterización fenotípica de los cinco mutantes correspondientes de *S. cerevisiae* se describe a continuación.

2. PREDICCIÓN DE LAS ALTERACIONES QUE CAUSARÍAN LAS VARIANTES DE L16B EN LA ESTRUCTURA DE ALTA RESOLUCIÓN DE LA SUBUNIDAD 60S

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 las variantes de L16B en la estructura del ribosoma. Usando dichas coordenadas 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 cambiados en L16B por las distintas mutaciones que se seleccionaron en este trabajo. En la figura 16 se representa la región de la subunidad 60S donde se ubica la proteína L16 y las posiciones que ocupan los aminoácidos que resultan sustituidos por otro como consecuencia de las mutaciones.

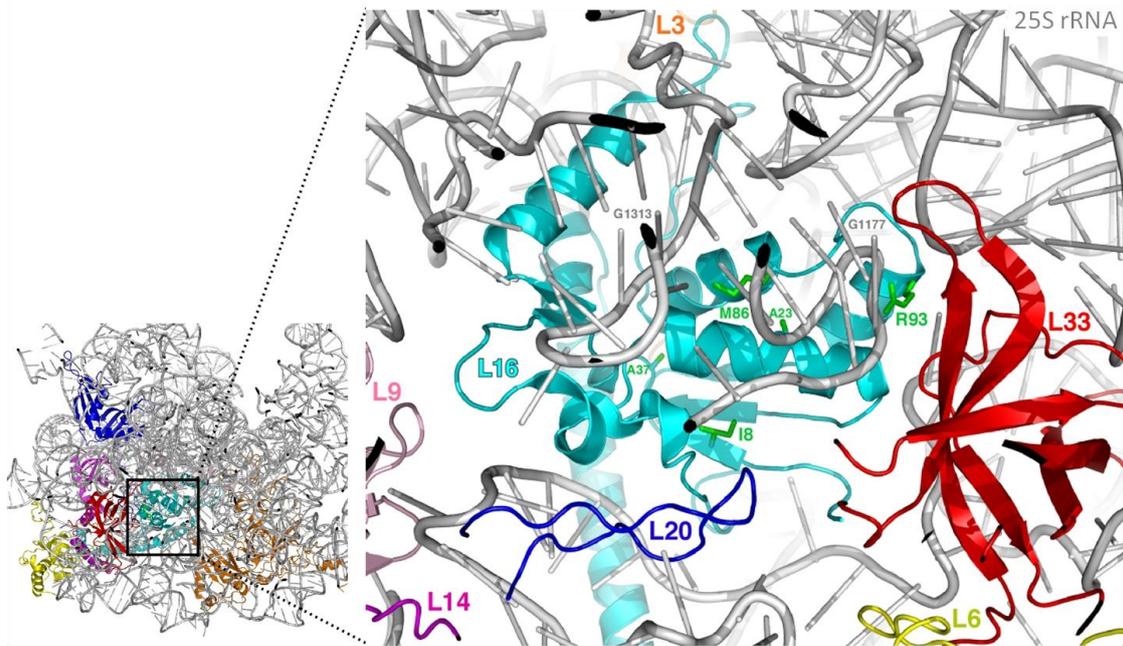


Figura 16. Representación en la estructura de la subunidad 60S de *S. cerevisiae* de la localización de los aminoácidos sustituidos en L16B. A) Representación de la estructura de la subunidad 60S de *S. cerevisiae* con las proteínas L16 (azul turquesa), L33 (rojo), L20 (azul oscuro), L9 (rosa), L14 (fucsia), L6 (amarillo) y L3 (naranja); el rRNA 25S se representa en gris. B) En verde se señalan las cadenas laterales de cada uno de los aminoácidos sustituidos como consecuencia de las 5 mutaciones *rpl16bΔ_i**. También se representa el rRNA 25S en gris, señalándose los nucleótidos G1177 y G1313 y las mismas RPs del apartado A).

Los aminoácidos Ile8, Ala23 y Ala37 de L16B serían necesarios para estabilizar el plegamiento de L16B, al formar parte del núcleo hidrofóbico en la estructura tridimensional de la proteína. Así, la sustitución de esos residuos por aminoácidos cargados negativamente, como es el caso del cambio a aspártico de las alaninas 23 y 37; o polares como es el cambio de la isoleucina 8 a asparagina, podrían desestabilizar la proteína, de modo que ésta sería más inestable a alta temperatura, siendo quizá la causa de la termosensibilidad observada en el crecimiento de los mutantes correspondientes.

El aminoácido Arg93 interacciona con el fosfato de la base G1177 del rRNA 25S, de manera que su sustitución a histidina convertiría este puente de hidrógeno en una interacción polar, mucho más débil. El residuo Met86 establece una interacción hidrofóbica con la ribosa del nucleótido G1313 del rRNA 25S, por lo que su cambio a un aminoácido más pequeño como es la valina aumentaría la distancia entre los átomos de carbono de esos residuos de la proteína y el RNA, impidiendo la interacción hidrofóbica o debilitándola.

3. FENOTIPO DE CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES *rpl16b* Δ_i *

En primer lugar se analizó el fenotipo de crecimiento en medio sólido de los cinco mutantes haploides seleccionados $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ (*rpl16b* Δ_i *, *CEN4 LEU2*), en relación al de la cepa isogénica en la que se expresa únicamente el alelo *RPL16B* Δ_i , que codifica la proteína silvestre L16B. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de células a partir de cultivos en fase exponencial y se aplicaron gotas con el mismo número de células en placas con medio sólido. El crecimiento se analizó tanto en placas de medio mínimo SD + ura, como de medio rico YEPD, que se incubaron a 18°C, 28°C y 37°C de 2 a 5 días, dependiendo del tipo de medio y de la temperatura.

Como se muestra en la figura 17, los cinco mutantes puntuales seleccionados tienen un crecimiento ligeramente más lento que la cepa WT a 18°C y 28°C, pero todos muestran un fenotipo *slg* muy acentuado a 37°C, que además está agravado en medio mínimo. Este defecto en el crecimiento a 37°C es especialmente acusado en el caso del mutante *rpl16b*-M86V, lo que sugiere que o bien esta proteína mutante es la más termosensible o que no se sintetiza en suficiente cantidad como para permitir el crecimiento normal de la cepa en esas condiciones de alta temperatura o ambas cosas. Para facilitar la lectura de esta Memoria, en adelante se denominará a cada uno de los mutantes en función de la mutación *rpl16b* Δ_i * que portan.

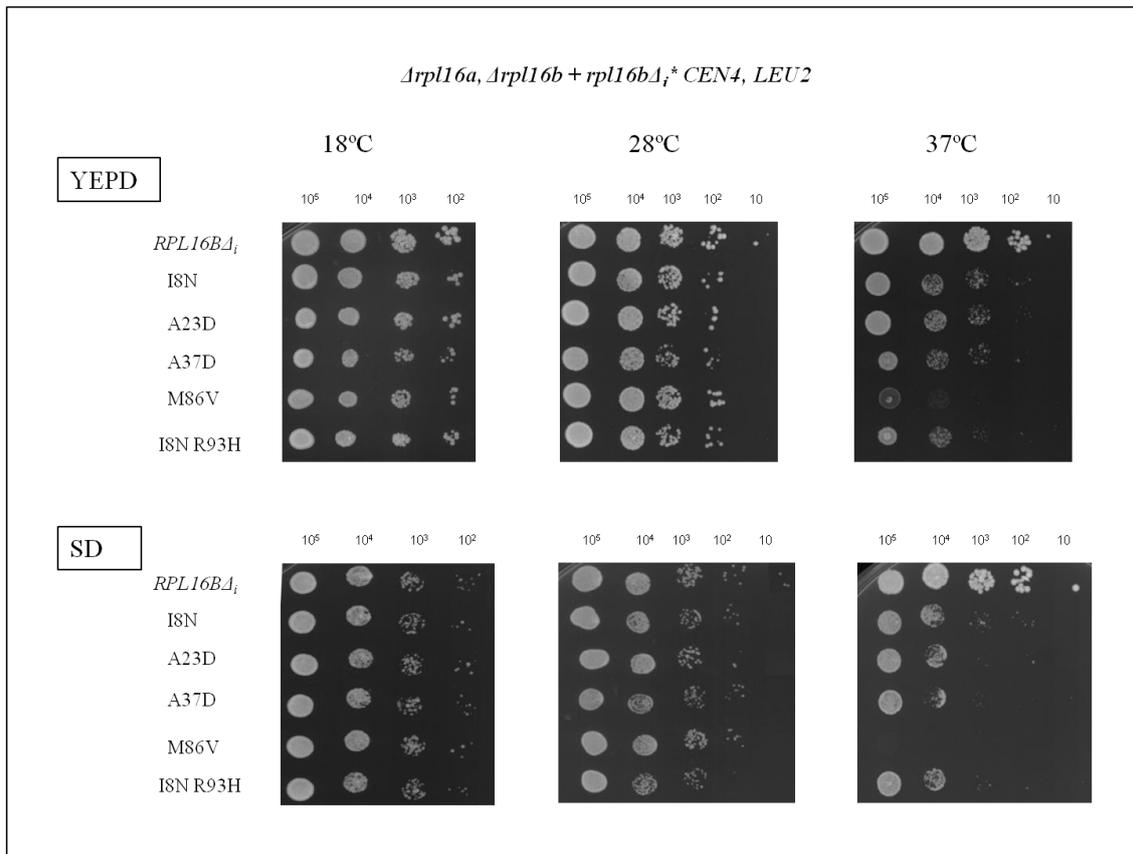


Figura 17. Fenotipo de crecimiento de cepas isogénicas *Δrpl16a Δrpl16b* que portan los alelos *RPL16BΔ_i* que se indican. Diluciones seriadas de células transformadas con los alelos *RPL16BΔ_i* indicados, cultivadas a 28°C en YEPD hasta fase exponencial, se aplicaron en placas de YEPD o SD que se incubaron durante 2 días a 28°C y 37°C o durante 4 días a 18°C.

A continuación, los mutantes *rpl16bΔ_i** y la cepa isogénica *RPL16BΔ_i* se cultivaron en medio líquido YEPD a 28°C y 37°C y se determinó su cinética de crecimiento midiendo periódicamente la turbidez de los cultivos (DO_{600 nm}). De la misma forma que ocurría en medio sólido, los mutantes crecen más lento que la cepa control en medio líquido a 28°C, especialmente el mutante sencillo A37D y el doble I8N R93H. Sin embargo, el fenotipo *slg* se exagera a 37°C en todos los mutantes, observándose un notable descenso en la tasa de crecimiento. En medio líquido, los mutantes A37D e I8N R93H crecen más lentamente que M86V, a diferencia de lo observado en medio sólido.

Resultados

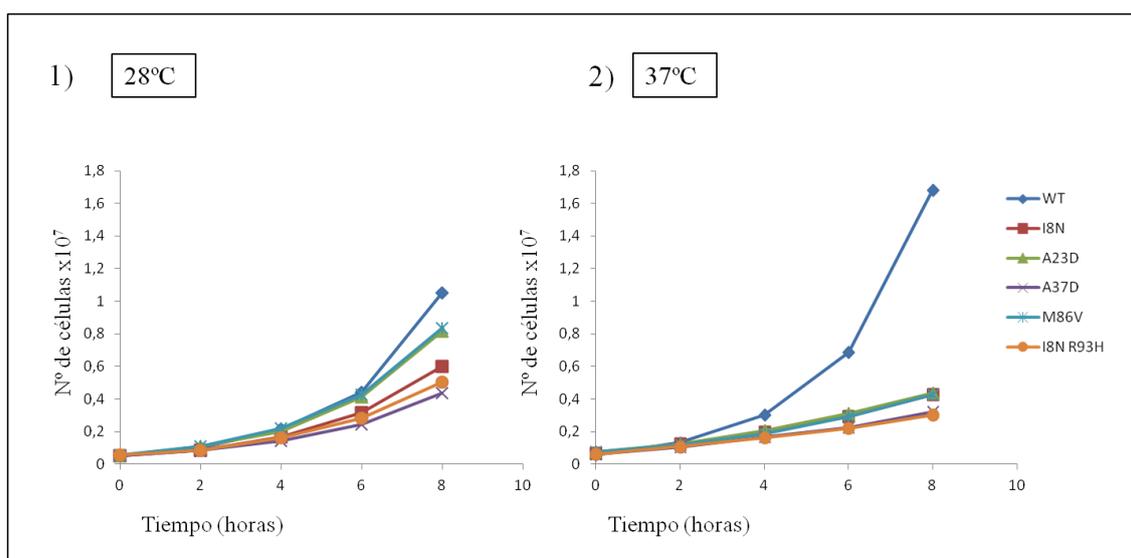


Figura 18. Curvas de crecimiento de cepas isogénicas $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ que portan los alelos $RPL16B\Delta_i$ que se indican. Las cepas que portan los alelos $RPL16B\Delta_i$ indicados, se incubaron a 28°C hasta fase exponencial en YEPD. Las células se recogieron por centrifugación y se transfirieron a YEPD a 28°C (1) o precalentado a 37°C (2). Los cultivos líquidos se incubaron a las correspondientes temperaturas y se tomaron muestras cada 2 horas, para determinar en cada caso tasa de crecimiento de las cepas.

4. DEFECTOS EN LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LOS MUTANTES $rpl16b\Delta_i$ *

Existen numerosos ejemplos en los que variantes mutadas de una proteína ribosómica o su ausencia afectan a la síntesis general de proteínas particularmente en la fase de iniciación (Martín-Marcos *et al.*, 2007; Meskauskas *et al.*, 2008; Babiano y de la Cruz, 2010; Sulima *et al.*, 2014). Para investigar si los mutantes $rpl16b\Delta_i$ * tienen defectos traduccionales se obtuvieron los perfiles de polisomas de células que se habían cultivado a 28°C y 37°C, ya que este tipo de análisis permite detectar anomalías en la maquinaria traduccional y defectos en las distintas fases de la síntesis proteica (Petersen y McLaughlin 1974, Masek *et al.*, 2011; Pospisek y Valasek, 2013).

Para ello, se obtuvieron extractos celulares totales, usando un tampón de lisis que contiene concentraciones de Mg^{2+} suficientes para impedir que los ribosomas unidos a mRNAs se disocien de ellos. Además, estos extractos se realizan en presencia de altas concentraciones de cicloheximida (125 $\mu\text{g/ml}$), que inhiben tanto la iniciación como la elongación de la síntesis proteica, 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). Las muestras se someten a centrifugación en gradientes de sacarosa continuos del 7% al 47%, lo que permite separar las distintas fracciones, de más ligeras a más pesadas, en las que sedimentan

primero las subunidades ribosómicas 40S y 60S, seguidas por los monosomas y los polisomas. Los perfiles se obtienen monitorizando los RNAs presentes en el gradiente (tanto los ribosómicos como los mensajeros a los que estarían unidos) con una lámpara UV (254 nm) acoplada a un registrador. El primer pico del perfil representa las subunidades 40S, el segundo las subunidades 60S y el tercero los monosomas (un ribosoma 80S unido al RNA mensajero). Los siguientes picos corresponden a los polisomas: disomas (dos ribosomas unidos al mRNA), trisomas (tres ribosomas unidos al mRNA), tetrasomas etc.

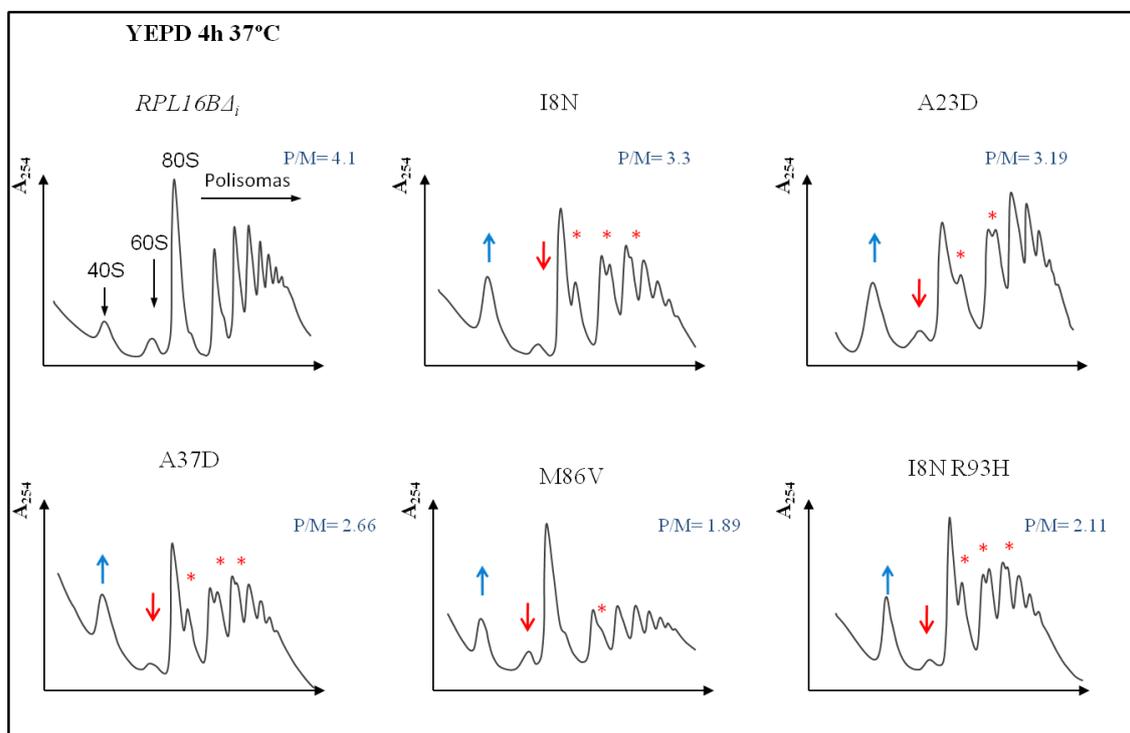
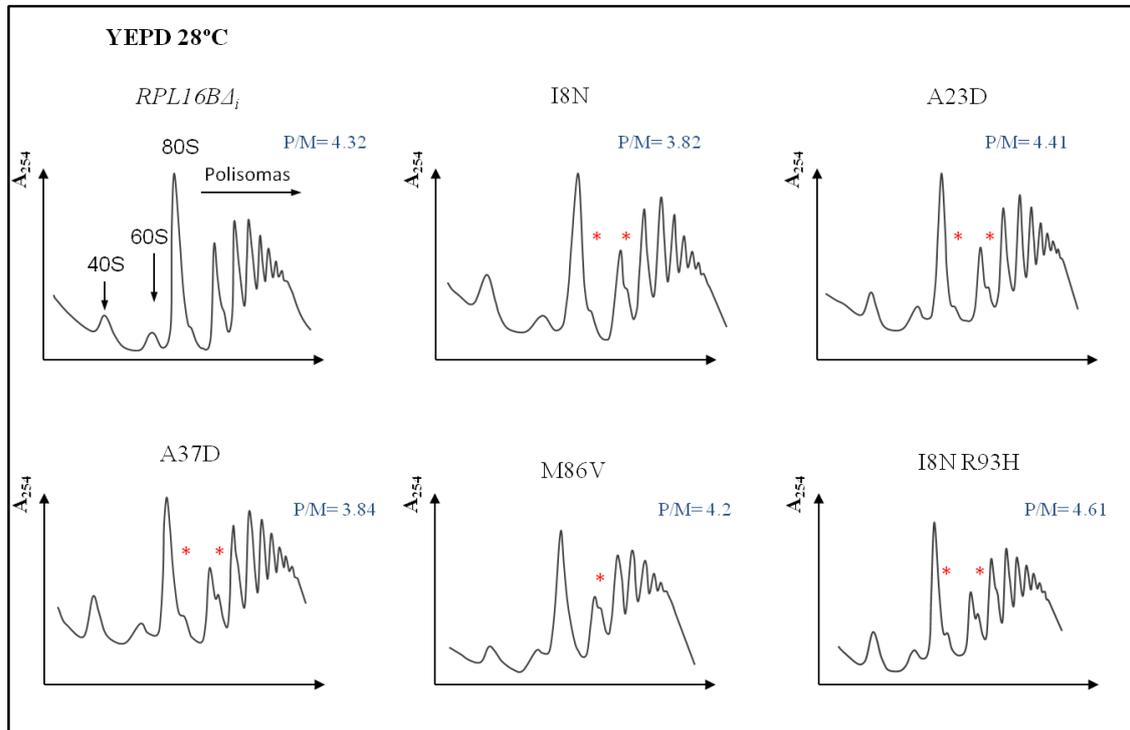
Cuando una cepa de *S. cerevisiae* tiene defectos en el inicio de la traducción, aumenta el número de monosomas 80S y disminuye la cantidad y, en algunos casos, también el tamaño medio de los polisomas, por lo que también se reduce el cociente polisomas/monosomas (P/M). Además, en ocasiones se observa la presencia de una especie de hombros en los picos del perfil que se denominan en inglés “*halfmers*” y que corresponden a complejos de preiniciación de la traducción, PIC 43S, unidos a los RNAs mensajeros, bien antes de llegar al AUG o bien detenidos en el mismo, a los que no se ha unido una subunidad 60S para terminar la iniciación y comenzar la elongación. Por tanto, la aparición de *halfmers* suele reflejar una reducción de la cantidad de subunidades 60S o de su funcionalidad para unirse a las subunidades 40S.

Se obtuvieron perfiles de polisomas de los mutantes *rpl16bΔ_i** y de la cepa isogénica *RPL16BΔ_i* empleando extractos celulares de cultivos creciendo activamente en YEPD (fase exponencial temprana) a 28°C, así como de extractos obtenidos después de transferir las células durante 4 u 8 horas a 37°C.

Como se observa en la figura 19, se detecta la presencia de algunos *halfmer* en los perfiles de la cepa *RPL16BΔ_i* a 28°C. Este resultado sugiere que en cepas cuyo fondo genético es la doble delección de los genes cromosomales parálogos $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$, cuando expresa únicamente uno de ellos *RPL16BΔ_i*, clonado en un plásmido centromérico, la cantidad de proteína L16B silvestre no sería completamente suficiente para la síntesis normal de subunidades 60S. Sin embargo, el cociente P/M se mantiene constante tras incubar las células varias horas a 37°C. En el caso de los cinco mutantes *rpl16bΔ_i** el cociente P/M no difiere significativamente del de la cepa control a 28°C, pero sí disminuye drásticamente a 37°C, especialmente en el mutante M86V. Además, en el perfil de polisomas de M86V se observa una menor reducción de subunidades 60S que en los otros cuatro mutantes, apenas se aprecian “*halfmers*” y hay una gran acumulación de monosomas, lo que determina que el cociente P/M disminuya drásticamente a 37°C. En los otros cuatro mutantes se aprecian reducciones importantes de la cantidad de subunidades 60S y de los monosomas 80S, así como del número y del tamaño medio de los polisomas en relación a la cepa control *RPL16BΔ_i*. Además, se acumulan subunidades 40S libres y se observa la presencia de “*halfmers*” asociados con

Resultados

monosomas y disomas, los cuales son especialmente abundantes en el mutante doble I8N R93H, observables incluso a 28°C (Fig. 19).



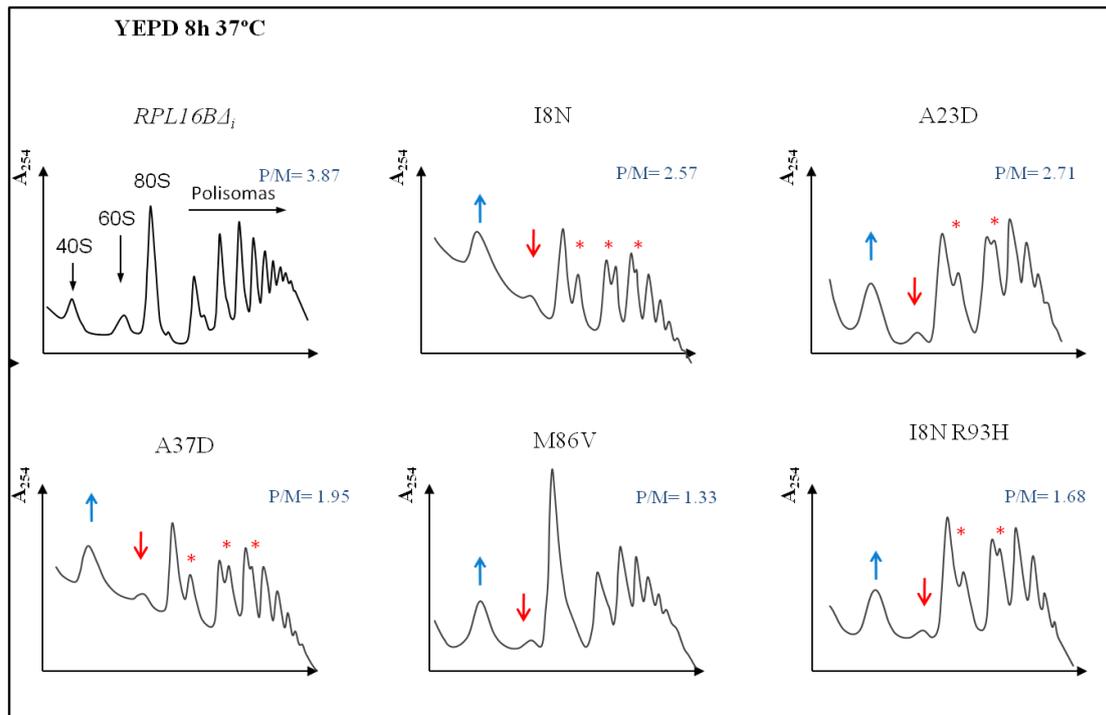


Figura 19. Perfiles de polisomas en cepas $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ que portan diferentes alelos $RPL16A_{\Delta}$. Se utilizaron extractos celulares preparados a partir de células incubadas en YEPD a 28°C y después de transferirlas 4 y 8 horas a 37°C. Los picos corresponden (de izquierda a derecha) a las subunidades 40S, 60S, a los ribosomas 80S y a los polisomas. En los perfiles de las cepas mutantes incubadas 4h a 37°C se señalan los “halfmers” con un asterisco y con las flechas rojas se señala la disminución de subunidades 60S y la acumulación de 40S. En cada perfil se indica el cociente polisomas/monosomas (P/M).

Los “halfmers” pueden aparecer por dos motivos principales:

- Por defectos en un paso tardío del inicio de la traducción, que de alguna manera impida la unión de las subunidades 40S y 60S.
- Por un déficit de subunidades 60S causado por algún defecto en su biogénesis, que ralentice su producción, transporte al citoplasma o que dé lugar a subunidades 60S maduras menos estables.

De la observación de los perfiles de polisomas anteriores se deduce que puede haber un defecto importante en la cantidad de subunidades 60S en todos los mutantes, con una acumulación concomitante de subunidades 40S, aunque en el caso de M86V estos defectos serían menos acentuados. Por tanto, es posible que en el caso de los mutantes I8N, A23D, A37D e I8N R93H, la aparición de “halfmers” se deba al déficit de 60S. Además en el caso de M86V también podría haber un defecto adicional en la última etapa del inicio de la traducción tras la unión de 60S a 40S, como sugiere la gran acumulación de monosomas 80S que se observan en los perfiles de este mutante a 37°C.

Resultados

Para comprobar si efectivamente en los mutantes *rpl16bΔ_i** existía una menor cantidad de subunidades 60S que en la cepa isogénica *RPL16BΔ_i*, se cuantificó el contenido de subunidades ribosómicas maduras 60S y 40S, teniendo en cuenta tanto subunidades libres como las involucradas en traducción unidas a RNAs mensajeros. Para ello, se prepararon extractos celulares de las distintas cepas en ausencia de cicloheximida y con baja concentración de Mg²⁺, condiciones que permiten la disociación en subunidades de los ribosomas libres y también de los unidos a mRNAs (Materiales y Métodos).

Como se muestra en la figura 20, el cociente entre la cantidad total de subunidades 40S y 60S de la cepa *RPL16BΔ_i* es muy similar a 28°C y tras cultivarla 4 y 8 horas a 37°C. En el caso de los mutantes *rpl16bΔ_i**, la cantidad de subunidades 60S disminuye levemente a 28°C y la reducción es mayor a medida que se incuban las células más horas a 37°C. Además, el cociente 60S/40S disminuye más drásticamente en el mutante doble I8N R93H que en los demás (~20% a las 8h de incubación en relación a la cepa control), mientras que la menor reducción 60/40 se observa en el mutante M86V.

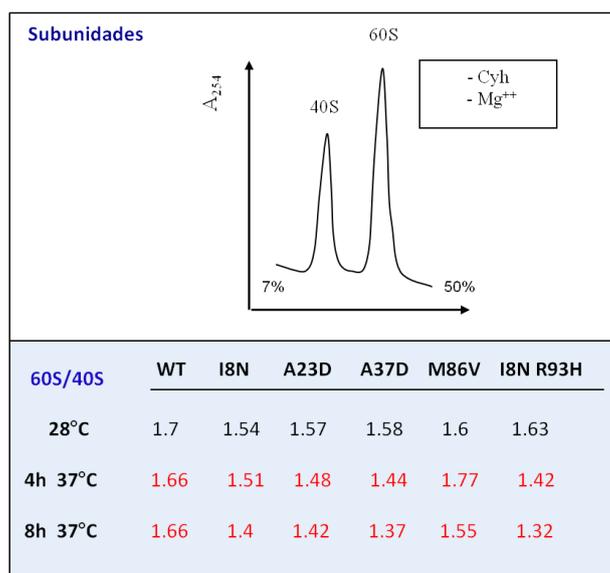


Figura 20. Cuantificación de subunidades ribosómicas 40S y 60S en cepas *Δrpl16a Δrpl16b* que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Se utilizaron extractos celulares preparados sin cicloheximida y con baja concentración de Mg²⁺, a partir de cultivos incubados en YEPD a 28°C y después de transferirlos 4 y 8 horas a 37°C. En el panel de arriba se muestra un ejemplo representativo de las gráficas que se obtienen en este tipo de experimentos. En el panel inferior se representan los valores obtenidos resultantes de la media aritmética de 3 experimentos independientes.

Los resultados de estos ensayos indican que la cantidad neta de subunidades maduras 60S se reduce entre un 15 y un 25% en los cinco mutantes *rpl16bΔ_i**. No obstante, como la cuantificación de subunidades ribosómicas mediante gradientes de sacarosa sin Mg²⁺ no es una técnica demasiado precisa, para estimar por otro procedimiento el defecto de subunidades 60S en los mutantes *rpl16bΔ_i** se cuantificaron las cantidades totales de rRNAs maduros 25S y 18S.

Para ello se obtuvieron RNAs totales de la cepa control *RPL16B Δ _i* y de los mutantes, tras cultivar las células hasta fase exponencial a 28°C y después de transferirlas durante 4 y 8 horas a 37°C. Estos RNAs se sometieron a electroforesis capilar y se cuantificaron con un bioanalizador (Materiales y Métodos).

La cuantificación de los rRNA 25S y 18S RNA mediante esta técnica confirma una reducción significativa de 25S en los mutantes y, por tanto, de subunidades 60S maduras respecto a 40S, que es más severa que la estimada a partir de los perfiles de separación de subunidades. En todas las cepas, tanto mutantes como la isogénica *RPL16B Δ _i*, se detectaron reducciones de la cantidad de 25S a 37°C. Sin embargo, esta reducción era ligera en la cepa control (15%) pero muy acusada, cercana al 40%, en los mutantes tras 8h a 37°C. Se observa también que el cociente 25S/18S se reduce en el mutante M86V. Además, la mayor reducción del cociente 25S/18S se observa en el doble mutante I8N R93H, tanto a 28°C como después de 8h de crecimiento a 37°C, en consonancia con lo observado en los perfiles de polisomas totales y de subunidades, respecto al resto de mutantes.

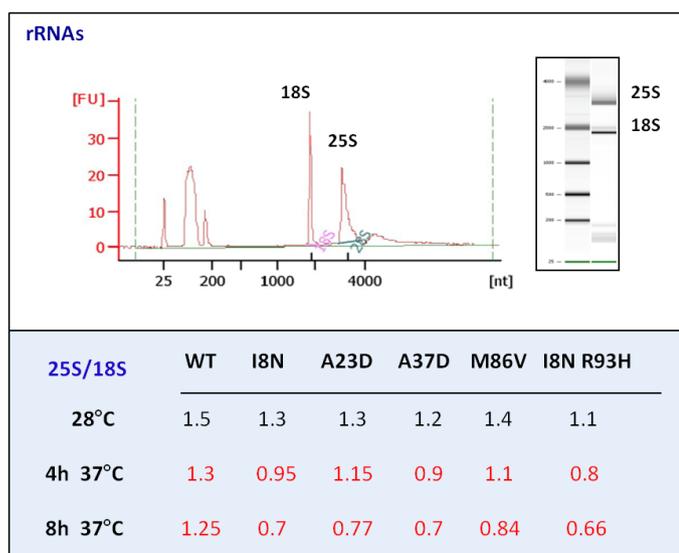


Figura 21. Análisis de la cantidad de los rRNAs maduros 25S y 18S en cepas $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ que portan diferentes alelos *RPL16B Δ _i*. Se separaron por electroforesis capilar 100 ng de RNA total obtenido de células cultivadas en YEPD a 28°C o transferidas durante 4 y 8 horas a 37°C. En el panel superior se muestra un ejemplo representativo de la resolución y cuantificación de los rRNAs maduros 25S y 18S que se consigue mediante un bioanalizador. En el panel inferior, se indica el cociente 25S/18S obtenido en cada caso.

Por tanto, en los cinco mutantes *rpl16b Δ _i** hay una reducción significativa en la proporción de subunidades maduras 60S frente a 40S, especialmente a 37°C, como se deduce de la notable disminución del cociente 25S/18S, entre un 20% y un 30 % dependiendo del mutante

considerado. Estos datos sugieren que los mutantes deben tener alteraciones en la biogénesis de ribosomas y/o en la exportación del núcleo al citoplasma de subunidades 60S maduras.

5. DEFECTOS EN LA BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN LOS MUTANTES *rpl16bΔi**

La biogénesis de ribosomas en *S. cerevisiae* es un proceso celular en el que tienen lugar de forma concomitante y coordinada el procesamiento de los pre-rRNA y el ensamblaje de proteínas ribosómicas, para generar los ribosomas maduros. Los rRNAs maduros 25S, 18S y 5.8S presente en los ribosomas 80S citoplasmáticos se generan a partir de un transcrito primario 35S sintetizado por la RNA polimerasa I, el cual sufre una serie de cortes endonucleolíticos y exonucleolíticos para formar varios precursores intermediarios a partir de los que finalmente se originan los tres rRNAs maduros. Además el rRNA maduro 5S es transcrito por la RNA polimerasa III y se ensambla en los pre-ribosomas 60S en una fase tardía del proceso (Calviño *et al.*, 2015). El ensamblaje de variantes de proteínas ribosómicas alteradas como consecuencia de mutaciones puede ocasionar defectos en el procesamiento de los rRNAs, reduciendo o ralentizando la producción de subunidades ribosómicas maduras 40S y/o 60S, o bien ocasionando un desequilibrio entre la cantidad relativa de las mismas.

Procesamiento de los precursores de los RNAs ribosómicos en mutantes *rpl16bΔi**

Para determinar si las 5 mutaciones en *RPL16BΔi* afectan al procesamiento de los RNAs ribosómicos y por tanto a la biogénesis de ribosomas llevamos a cabo ensayos de “**northern blot**” para cuantificar las cantidades netas (“steady state”) de cada rRNA maduro y de sus precursores, identificando cada transcrito por hibridación secuencial con oligonucleótidos específicos que permiten la detección de los distintos precursores y rRNAs maduros (Figura 22 y Tabla IV de los Anexos).

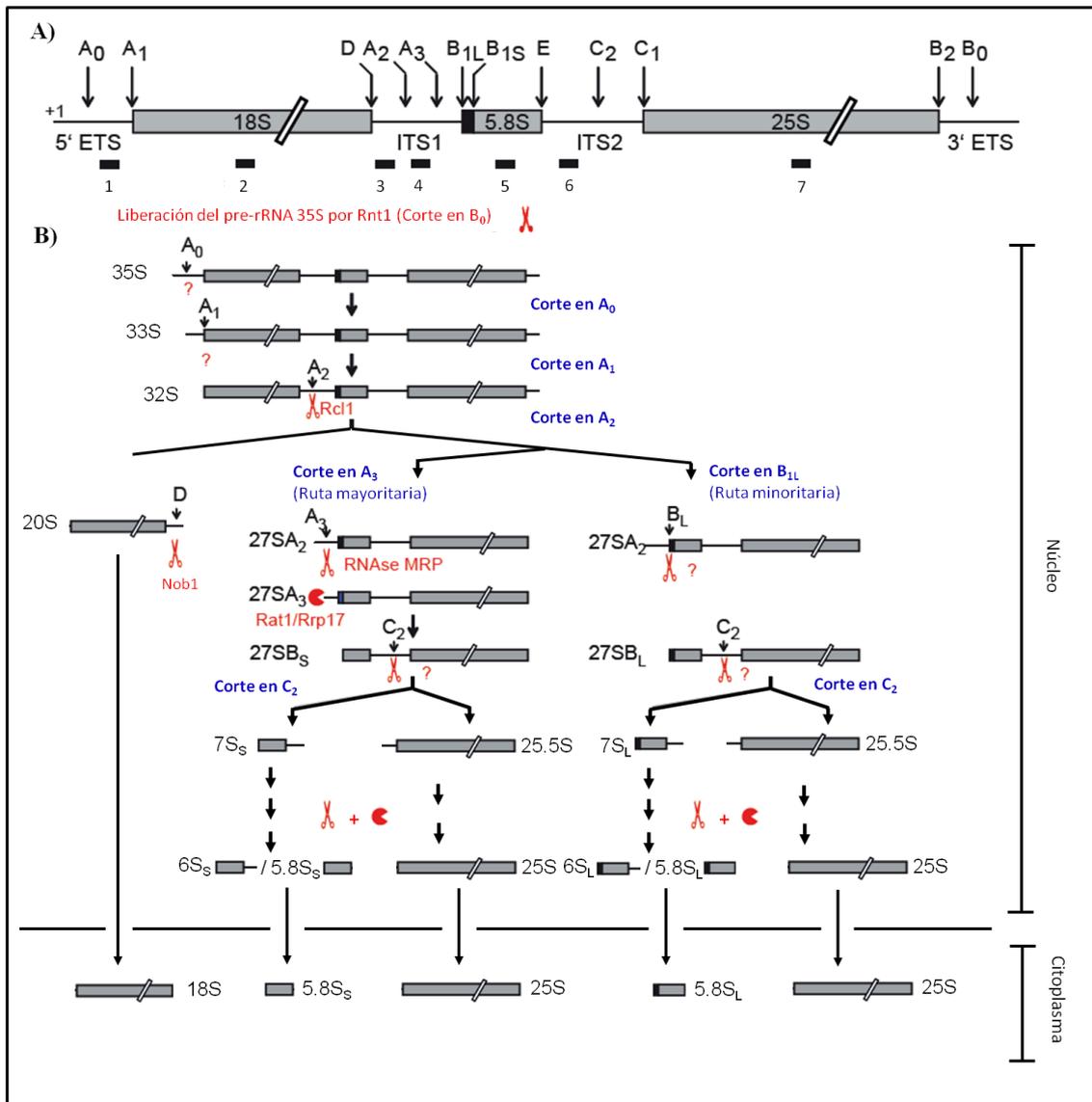


Figura 22. A) Esquema del precursor 35S de los rRNAs de *S. cerevisiae*. Se indican las regiones de los rRNAs a los que es complementaria la secuencia de cada oligonucleótido empleado en este análisis numerados del 1 al 7. **B) Esquema de la ruta de procesamiento de los precursores de los rRNAs en *S. cerevisiae*** (adaptado de Ohmayer *et al.*, 2015). Los símbolos de Pac-Man y las tijeras representan los eventos de procesamiento del pre-rRNA que son exonucleolíticos o endonucleolíticos respectivamente.

Se analizaron por "northern blot" muestras de ~10µg de RNA total de los mutantes *rpl16bΔ_i** y de la cepa isogénica *RPL16BΔ_i* tras ser cultivadas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial y después de transferirlas durante 4h y 8h a 37°C. La carga se normalizó en relación a la señal de hibridación del RNA SCR1 (Signal Cytoplasmic Recognition Particle) y del snoRNA U3. SCR1 es un transcrito de la RNA polimerasa III que representa aproximadamente el 2% del RNA celular en levaduras y muestra una gran estabilidad (Felici *et al.* 1989). Por su parte, el snoRNA U3, es también un transcrito de la RNA polimerasa III y una

Resultados

de las moléculas más abundantes en *S. cerevisiae*, existiendo entre 400 y 1000 copias por célula (Hughes *et al.*, 1987).

En primer lugar, se hibridaron los RNAs con los oligonucleótidos 2 y 7, que detectan específicamente los rRNAs maduros 18S y 25S (Ver figura 23). En la cepa control las cantidades de los rRNAs maduros 25S y 18S disminuyen ligeramente durante la incubación a 37°C. Sin embargo, en el caso de los mutantes, durante esta incubación, los niveles del rRNA 25S se reducen significativamente, mientras que los del rRNA 18S levemente. Esto causa que finalmente el cociente 25S/18S disminuya en los mutantes a medida que crecen a 37°C, sobre todo en el caso del mutante doble I8N R93H (Tabla 2).

A continuación, para analizar en mayor detalle en los mutantes posibles defectos en la ruta del procesamiento de los diferentes precursores de los rRNAs, se hibridaron los mismos RNAs con los oligonucleótidos 4 y 6. La secuencia del oligonucleótido 4 es complementaria a una región entre los sitios de corte endonucleolítico A₂-A₃ de la región ITS1 del 35S (Figura X), por lo que permite detectar los precursores 35S, 33S/32S y 27SA₂. Cuando se cuantifican las cantidades de esos precursores en los mutantes (Tabla 2), se aprecia en todos un patrón similar, de manera que las 5 mutaciones que alteran L16 causan una gran acumulación del precursor primario 35S asociada con una notable reducción en la cantidad de los siguientes precursores 33/32S y 27SA₂ que derivan de su procesamiento en los sitios A₂ y A₃ del ITS1. En el caso de la cepa control también se observa una ligera acumulación del precursor 35S, y como consecuencia, una ligera reducción del precursor 27SA₂ cuando las células crecen a 37°C; sin embargo, este fenotipo es menos acusado que en los mutantes, en los cuales después de 8h de crecimiento a 37°C, el precursor 35S llega a acumularse hasta 3 veces más que en el control. Esto indicaría que los mutantes *rpl16bΔ_i** tienen un defecto severo en el procesamiento del precursor 35S en los sitios A₀-A₁-A₂.

El oligonucleótido 6 permite detectar todos los precursores 27S (27SA₂, 27SA₃ y 27SB) y analizar el procesamiento en el sitio C₂, que genera la molécula 7S a partir de la que se produce el rRNA maduro 5.8S. Se observó que en todos los mutantes *rpl16bΔ_i** disminuye notablemente la cantidad de todos los pre-rRNAs 27S y 7S. Esta reducción podría ser debida a la gran acumulación que hay de 35S, que causaría un retraso o una disminución de la producción de 27SA₂ y en consecuencia de 27SB y 7S. No obstante, en los mutantes el cociente 27SA₂/25S incrementa progresivamente durante la incubación a 37°C respecto al de la cepa control, lo que sugiere defectos en el procesamiento del precursor 27SA₂ en A₃ o en los sitios B_{1L} o B_{1S}. En cambio, el cociente entre 27SA₂/27S es similar en los mutantes y en la cepa control, lo que apuntaría a que el problema se encuentra en el procesamiento de los precursores 27SB en el sitio C₂. Esta idea concuerda con el hecho de que el cociente 27S/7S aumenta en los

mutantes a 37°C (Tabla 2). Todos estos datos indican que los mutantes *rpl16bΔ_i** analizados tienen defectos en el procesamiento del pre-rRNAs 27SB en el sitio C₂ del ITS2.

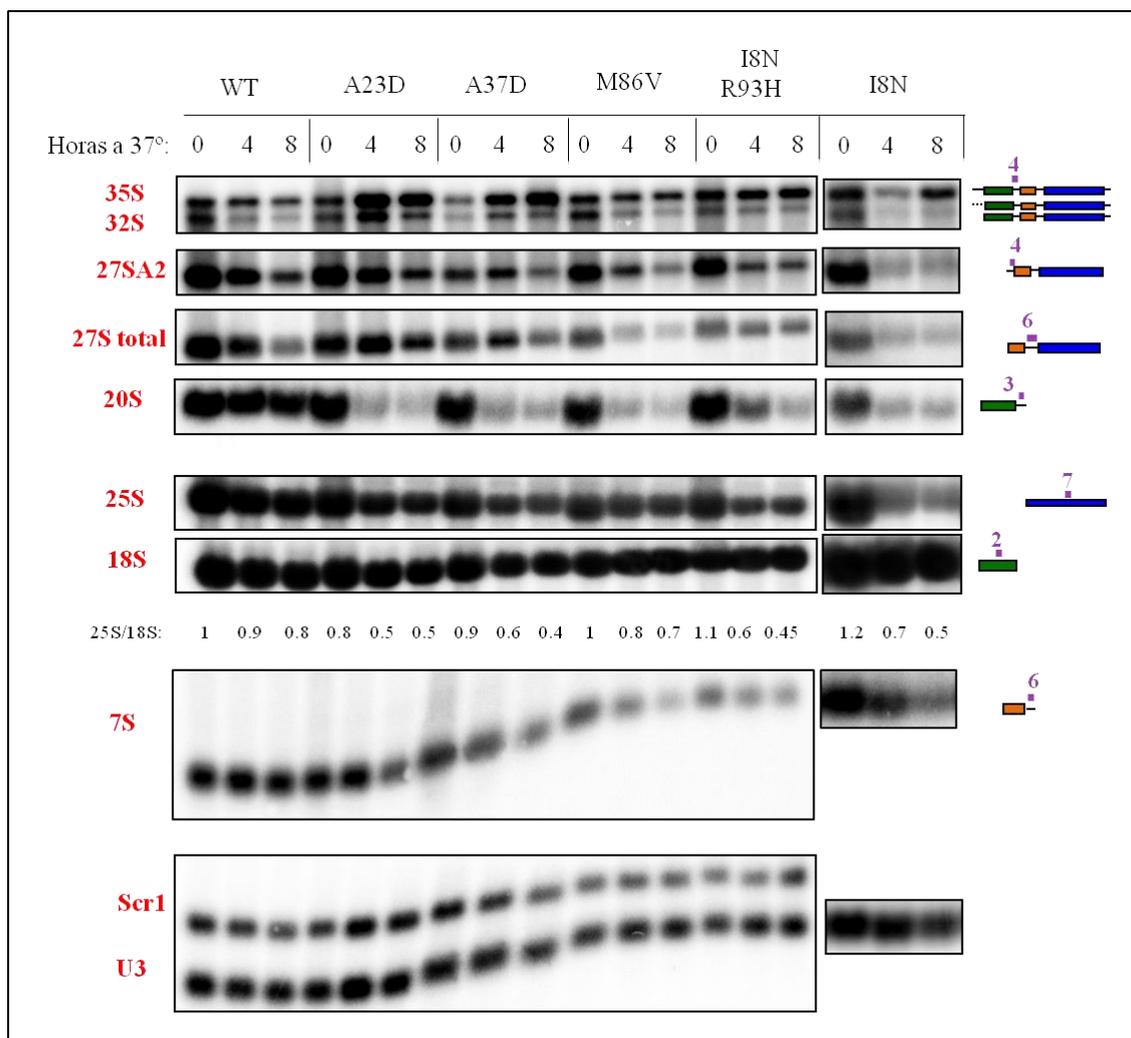


Figura 23. Defectos en el procesamiento y acumulación de los rRNAs en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. La cepa $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ transformada con los alelos control *RPL16BΔ_i* o mutantes *rpl16bΔ_i**, se cultivaron en YEPD hasta fase exponencial a 28°C y se transfirieron durante 4 y 8 horas a 37°C. Se obtuvieron RNAs totales y se sometieron a electroforesis desnaturalizante en geles de 1.2% agarosa y 4% formaldehído. Como sondas moleculares específicas se utilizaron los oligonucleótidos 2, 3, 4, 6 y 7, que anillan en las regiones señaladas en la figura anterior; y otras que detectan específicamente el RNA SCR1 y el snoRNA U3. Se indica el cociente 25S/18S en los distintos mutantes a lo largo de los tiempos de incubación a 37°C.

Posteriormente, se hibridaron los mismos RNAs con el oligonucleótido 3 que es complementario a la secuencia del pre-rRNA 35S localizada entre los sitios D-A₂, de manera que detecta el precursor 20S del rRNA maduro 18S. Las cantidades de 20S se reducen considerablemente en todos los mutantes *rpl16bΔ_i** a medida que aumenta el tiempo de incubación a 37°C (Tabla2), lo que concuerda con la acumulación progresiva del precursor 35S a esta temperatura. Además, las reducciones del precursor 20S, explicarían la ligera reducción del rRNA maduro 18S. Así, el cociente 20S/18S disminuye a lo largo del tiempo de incubación

Resultados

a 37°C en los mutantes respecto a la cepa silvestre, aunque este defecto podría atribuirse a la acumulación del precursor 35S y al defecto del procesamiento en el sitio A₂ y no a que los mutantes tuvieran problemas en el procesamiento del precursor 20S en el sitio D.

Finalmente, los rRNAs se hibridaron con la sonda 1, que es complementaria a la secuencia de la región denominada ETS-1 del precursor 35S (Figura X) y que también permite detectar eventualmente la presencia de algunas moléculas precursoras no canónicas como el pre-rRNA 23S (Granneman y Baserga, 2004). En los mutantes *rpl16bΔ_i** se observa mayor cantidad del precursor 23S que en la cepa control. Este precursor aparece cuando está inhibido el procesamiento endonucleolítico temprano del precursor primario 35S en A₀, A₁ y en A₂, de manera que se procesa directamente en A₃, en lugar de en A₂ (Venema and Tollervey, 1999; Allmang *et al.*, 2000). Por tanto, la mayor cantidad del precursor 23S en los mutantes *rpl16bΔ_i** que en la cepa control, está en consonancia con su acumulación del precursor 35S.

Por otro lado, para investigar si los mutantes tienen además defectos adicionales en el procesamiento de los precursores 27S en los sitios A₃ y B_{1L}-B_{1S}, se realizó un ensayo de “**primer extension**” usando como cebador el oligonucleótido 6 complementario a la región E-C₂ y RNAs totales de los mutantes obtenidos tras ser cultivados a 28°C y tras 8h a 37°C (Figura 24) (Materiales y Métodos).

Al analizar las cantidades de 27SA₂, 27SB_L y 27SB_S amplificadas mediante “primer extensión”, se observa que se acumula el precursor 27SA₂ en los mutantes con la excepción de A23D. Dentro de estos cuatro mutantes, la acumulación de 27SA₂ es mayor en I8N y en el mutante doble I8N R93H y menor en A37D y M86V. Estos resultados indican que al menos cuatro de los cinco mutantes *rpl16bΔ_i** analizados, tienen defectos adicionales en el procesamiento del precursor 27SA₂ en los sitios A₃ y B_{1L}.

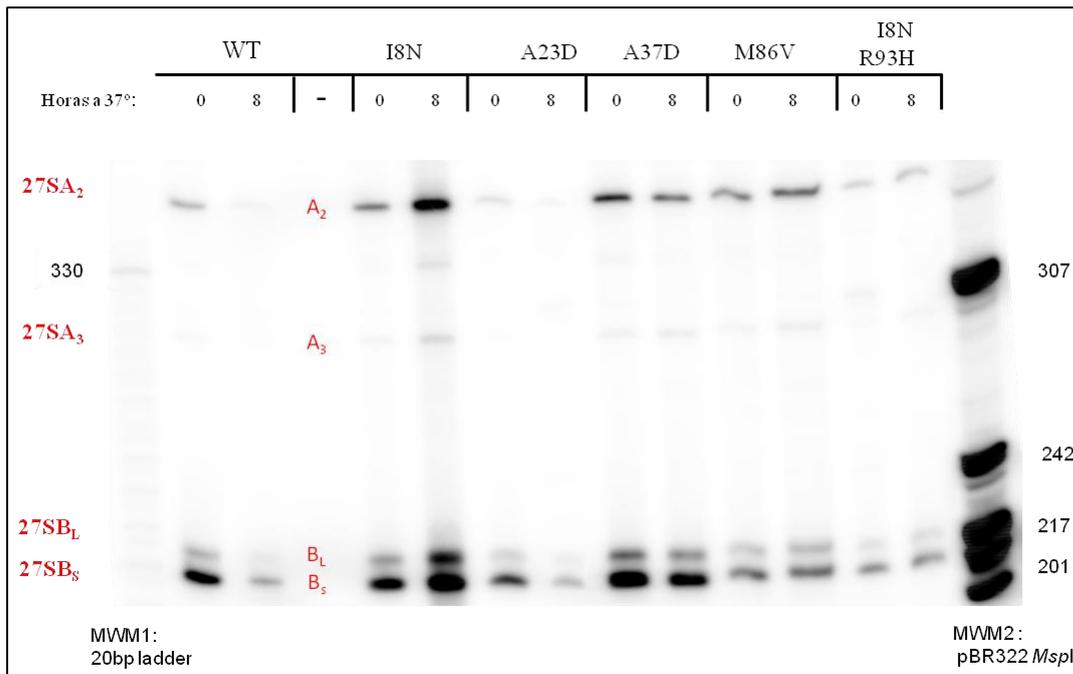


Figura 24. Defectos en el procesamiento de los pre-rRNAs 27S en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Ensayo de *primer extension* utilizando RNAs totales obtenidos tras cultivar células $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ transformadas con los alelos mutantes *rpl16bΔ_i** o control *RPL16BΔ_i*, a 28°C y después de 8h a 37°C. Como cebador se utilizó el oligonucleótido 6 marcado radiactivamente y como marcadores de masa molecular se utilizó el plásmido pBR322 digerido con la endonucleasa de restricción *MspI* y el marcador comercial 20bp (Gibco). De esta forma, se amplificaron los extremos 5' de los distintos precursores 27S, que posteriormente se resolvieron en gels de acrilamida al 6% y urea 8M.

Análisis de RNAs de pequeño tamaño molecular

También se analizaron por “northern blot” en los mutantes *rpl16bΔ_i** las cantidades de los rRNAs 5.8S y 5S. Para ello se cargaron ~ 5μg de los mismos RNAs totales que en el experimento anterior en gels de poliacrilamida al 6% y 8M de urea, que se resolvieron por electroforesis y se electro-transferieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Materiales y Métodos). La hibridación se realizó con los oligonucleótidos 5, 6 y 8 que detectan respectivamente los rRNAs 5.8S, el precursor 7S y el rRNA 5S, transcrito por la RNA polimerasa III. En este caso para normalizar la carga se usó la señal de hibridación del RNA U4, que es un componente del complejo molecular responsable del procesamiento y eliminación de los intrones de los RNAs mensajeros y que es un transcrito de la RNA polimerasa II en levaduras (Fournier y Maxwell, 1993).

Como se observa en la figura 25, las cantidades del precursor 7S son menores en los mutantes *rpl16bΔ_i** que en la cepa isogénica control y se reducen en mayor medida durante la incubación de los cultivos a 37°C. La disminución de 7S es concomitante y proporcional con una reducción en las cantidades del rRNA 5.8S. Sin embargo, en ningún caso parece haber defectos en el procesamiento del precursor 7S para originar el rRNA 5.8S ya que el cociente 7S/5.8S es

Resultados

similar en los cinco mutantes y en la cepa control (Figura 25 y Tabla 2). Además, las cantidades del rRNA 5S a 28°C y 37°C son similares en todas las cepas analizadas.

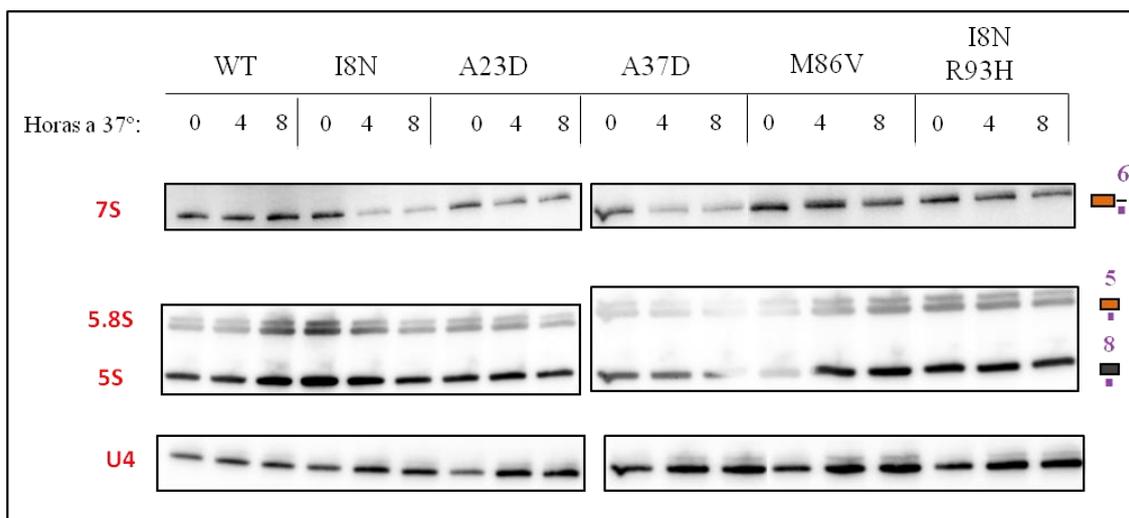


Figura 25. Análisis de los rRNAs de pequeño tamaño molecular en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ*. La cepa control *RPL16BΔ*, y los mutantes *rpl16bΔ_i** se cultivaron en YEPD hasta fase exponencial a 28°C y se transfirieron durante 4 y 8 horas a 37°C. Se obtuvieron RNAs totales y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 8% y urea 8M. Se utilizaron sondas moleculares que detectan específicamente los rRNAs 7S, 5.8S y 5S (oligonucleótidos 5, 6 y 8) y el snoRNA U4, que sirvió como control de carga.

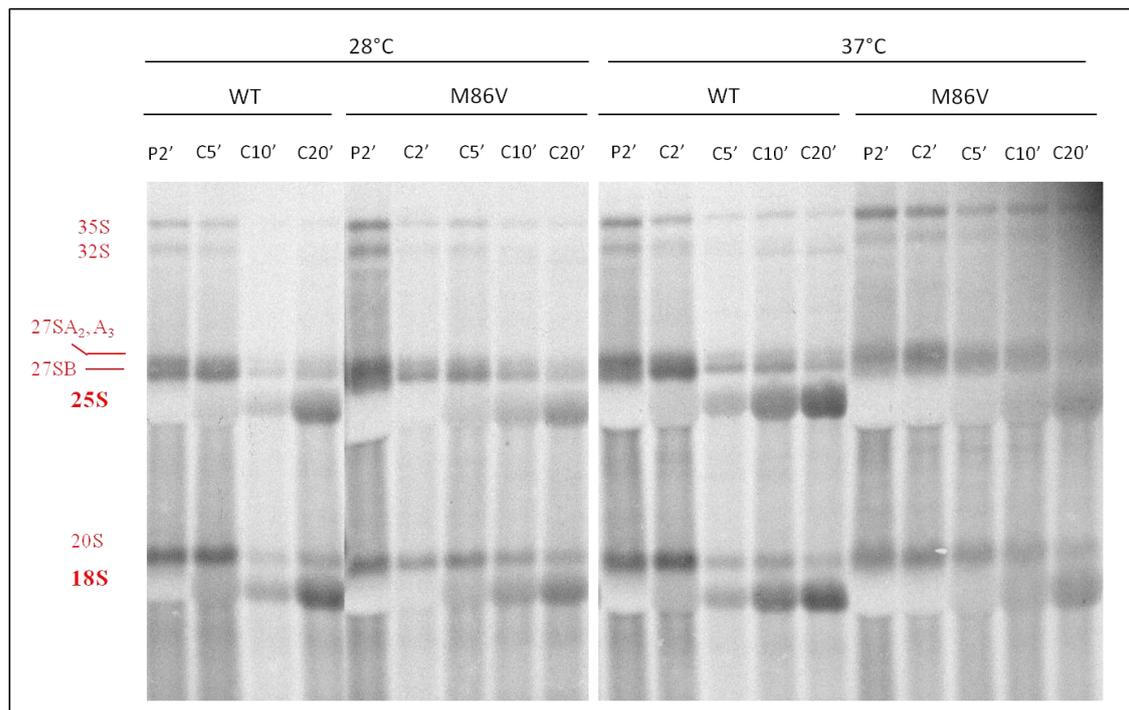
Análisis de pulso y caza con uracilo tritiado de los RNAs en los mutantes *rpl16bΔ_i.**

Mediante este tipo de ensayos se puede obtener información acerca de de la cinética de síntesis y procesamiento *in vivo* de los RNAs ribosómicos. Para ello, se añade a las células 100μCi de [5,6- ³H] uracilo (pulso) y se incuban durante un período de tiempo, tras el cual se detiene la incorporación de uracilo radiactivo al añadir un exceso de uracilo frío, tomándose muestras en distintos momentos (caza). El uracilo se incorpora en todos los RNAs que se estén transcribiendo activamente, pero al ser los rRNAs los más abundantes, son los que preferiblemente se van a distinguir en este tipo de experimento. De esta manera, se puede obtener información acerca

Los mutantes I8N R93H y M86V y la cepa control se cultivaron en medio mínimo sin uracilo (SD) a 28°C y tras transferirlos a 37°C durante 8 horas. El pulso con uracilo tritiado se realizó durante 2 minutos, posteriormente se añadió uracilo frío a una concentración de 1 mg/ml y se recogieron muestras a los 2, 5, 10 y 20 minutos de caza (Materiales y Métodos).

Como se observa en la figura 26, en el mutante M86V a 28°C se sintetizan los rRNAs maduros 25S y 18S a partir del pre-rRNA, en tiempos y cantidades similares a la cepa control,

aunque se aprecia una ligera acumulación de los precursores 35S, 27S y 20S. Sin embargo, a 37°C en el mutante la acumulación del precursor 35S es mayor y además hay un gran retraso en su cinética de procesamiento, así como en la de los precursores 27S y 20S, lo que causa que los rRNAs 25S y 18S se produzcan más tarde y en menor cantidad que en la cepa control. En el doble mutante la acumulación del precursor 35S a 37°C es mucho más drástica, por lo que se reduce la síntesis de los precursores 27S y 20S, que además se procesan más lentamente a 25S y 18S, respectivamente. Además, a 28°C ya se observa este mismo fenotipo, aunque de una manera menos acusada.



Resultados

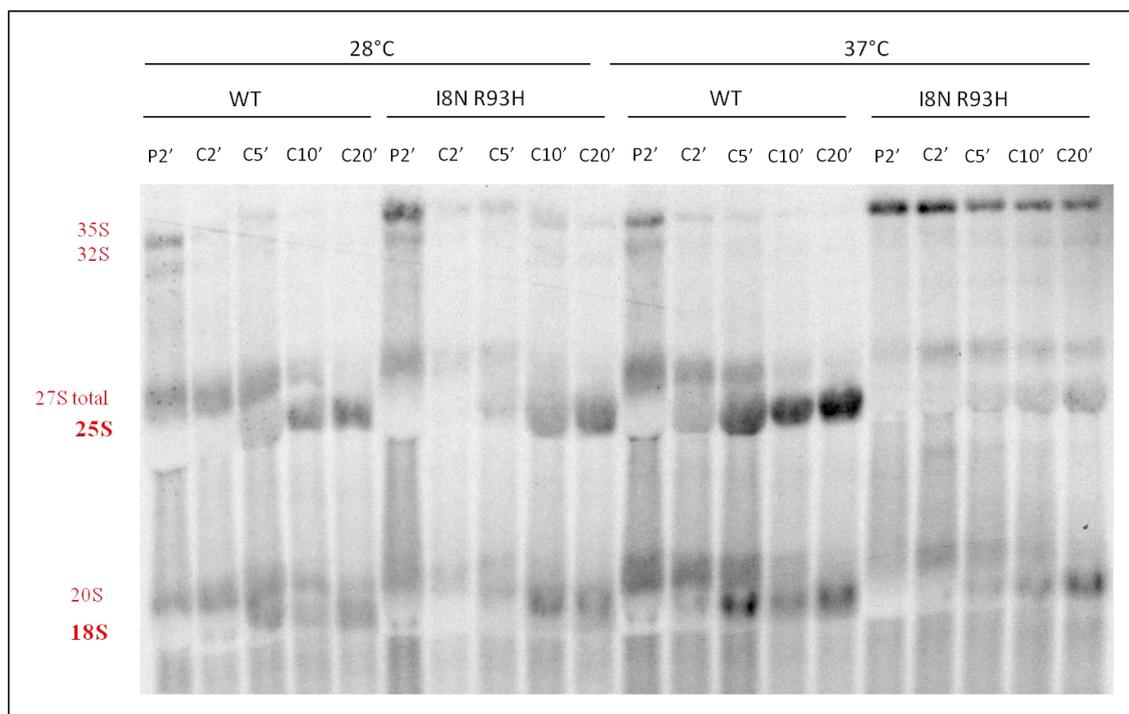


Figura 26. Análisis de la síntesis *in vivo* y procesamiento de los rRNAs de alto peso molecular en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. La cepa control *RPL16BΔ_i* y los mutantes *rpl16bΔ_i** se cultivaron en SD a 28°C hasta alcanzar una OD~ 0.8 o bien hasta una OD~ 0.4 y se transfirieron durante 8 horas a 37°C. Se obtuvieron muestras de RNA total de células marcadas con [5,6-³H] uracilo durante 2 minutos y después de 2, 5, 10 y 20 minutos de caza con uracilo frío en exceso. 20.000 cpm de cada muestra se resolvieron en gels de agarosa al 1.2% y formaldehído 4% y se transfirieron a membranas que se expusieron en pantallas especiales para la detección de tritio.

6. LAS PROTEÍNAS MUTANTES L16B* SE ENSAMBLAN CORRECTAMENTE EN PRE-RIBOSOMAS 60S

Los defectos en la biogénesis de ribosomas de los mutantes *rpl16bΔ_i** en cepas *Δrpl16a Δrpl16b* serían debidos a la presencia de las proteínas mutantes L16B* en las pre-partículas ribosómicas, ya que son viables; pero también podrían verse acentuados por reducciones en la síntesis, la estabilidad o la incorporación de las proteínas mutantes a estas pre-partículas. Para investigar estos posibles defectos, se fusionó a cada uno de los alelos mutantes *rpl16bΔ_i** la secuencia del epítipo FLAG en el extremo 3' terminal de la ORF (Ver Materiales y Métodos). La inmunoprecipitación de pre-ribosomas 60S y el posterior análisis de sus componentes por “western blot”, permitiría además verificar la incorporación en los mismos de las proteínas mutantes L16B*.

En primer lugar, se obtuvieron extractos proteicos de los mutantes y de la cepa isogénica *RPL16BΔ_i* cultivados en YEPD a 28°C hasta fase exponencial y a 37°C durante 8h y la síntesis de las proteínas L16B*::FLAG se analizó usando un anticuerpo anti-FLAG

(Materiales y Métodos). Como se observa en la figura 27, a pesar de que hay ligeras diferencias de carga, en todos los mutantes se detectaron cantidades de proteína L16B* similares a las de la cepa isogénica control incluso al incubarlos a 37°C. Por tanto, los fenotipos de los mutantes de *rpl16bΔ_i** no se deberían en principio a defectos en la síntesis o en la estabilidad de las distintas proteínas mutantes L16B*.

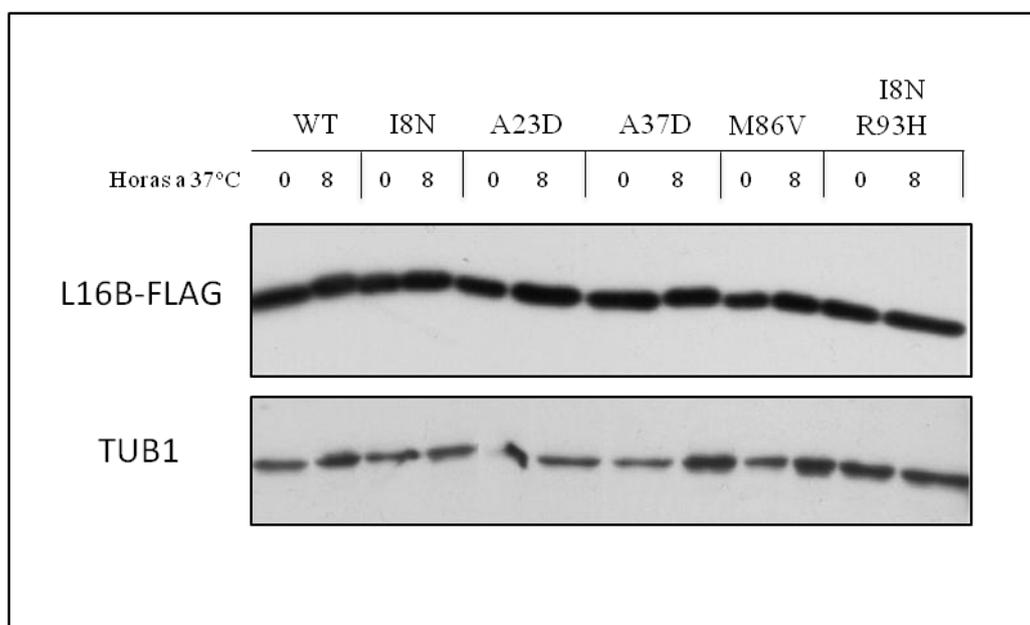


Figura 27. Detección de las proteínas L16B* en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i fusionados al epítipo FLAG.** Se prepararon extractos totales de células cultivadas en YEPD a 28°C y durante 8 horas a 37°C hasta una O.D~0.8, que se analizaron mediante "western blot" utilizando anticuerpos anti-FLAG y anti-tubulina que sirvió como control de carga.

Para comprobar que las proteínas mutantes L16B* se incorporan sin mayores problemas en las pre-partículas ribosómicas, se utilizaron las versiones de las mismas fusionadas al epítipo FLAG para inmunoprecipitar esas partículas. Para ello, se emplearon microesferas conjugadas con el anticuerpo anti-FLAG y se analizó posteriormente qué moléculas precursoras de los rRNA estaban presentes en ellas. De esta manera, si las proteínas mutantes se incorporan en los pre-ribosomas 60S se deben detectar todos los precursores del rRNA en ellas, así como los rRNAs maduros, ya que L16 se ensambla en las etapas tempranas de la biogénesis de ribosomas (Ohmayer *et al.*, 2015). Se obtuvieron extractos celulares de los mutantes *rpl16bΔ_i** y de la cepa isogénica *RPL16BΔ_i* cultivadas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial y después de transferirlas a 37°C durante 8h y se inmunoprecipitaron la partículas pre-ribosómicas. A partir de las muestras obtenidas se extrajo RNA total que se analizó por "northern blot" empleando como sondas los oligonucleótidos apropiados, para comprobar la presencia de las diferentes moléculas precursoras y de los rRNAs maduros. Además, como control, se extrajo RNA de los extractos celulares antes de incubarlos con las bolas conjugadas con el anticuerpo

Resultados

(“input”). También se usó como control la cepa BY4741, en la que L16B no está fusionada al epítipo FLAG, de manera que en sus extractos no se deberían detectar precursores del rRNA.

Como se observa en la figura 28 en la cepa control y en los mutantes *rpl16bΔ_i** se detectan las moléculas precursoras y los rRNAs maduros 25S, 18S, 5.8S y 5S, a 28°C y a 37°C. Esto indica que las versiones mutantes de la proteína L16B* se incorporan en los pre-ribosomas, como sugería la viabilidad de los respectivos mutantes haploides $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ en los que se expresan los alelos *rpl16bΔ_i** como única fuente de proteína L16B*. Como habíamos observado con anterioridad en los experimentos de “northern blot”, aquí se aprecia también menor cantidad de rRNAs precursores y maduros en la fracción “input” de los mutantes. Como consecuencia, existen menores cantidades tanto de pre-rRNAs como de rRNAs maduros en los inmunoprecipitados, aunque esto también podría deberse a que la inmunoprecipitación en estos casos haya sido menos eficiente. Sin embargo, el precursor 35S inmunoprecipita con mayor eficiencia en los mutantes, de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de “northern blot”, donde se observaba su acumulación. Asimismo, las señales de los precursores en los inmunoprecipitados obtenidos de células cultivadas a 37°C son muy similares a las que se observan a 28°C, en la que los mutantes apenas presentan defectos de crecimiento.

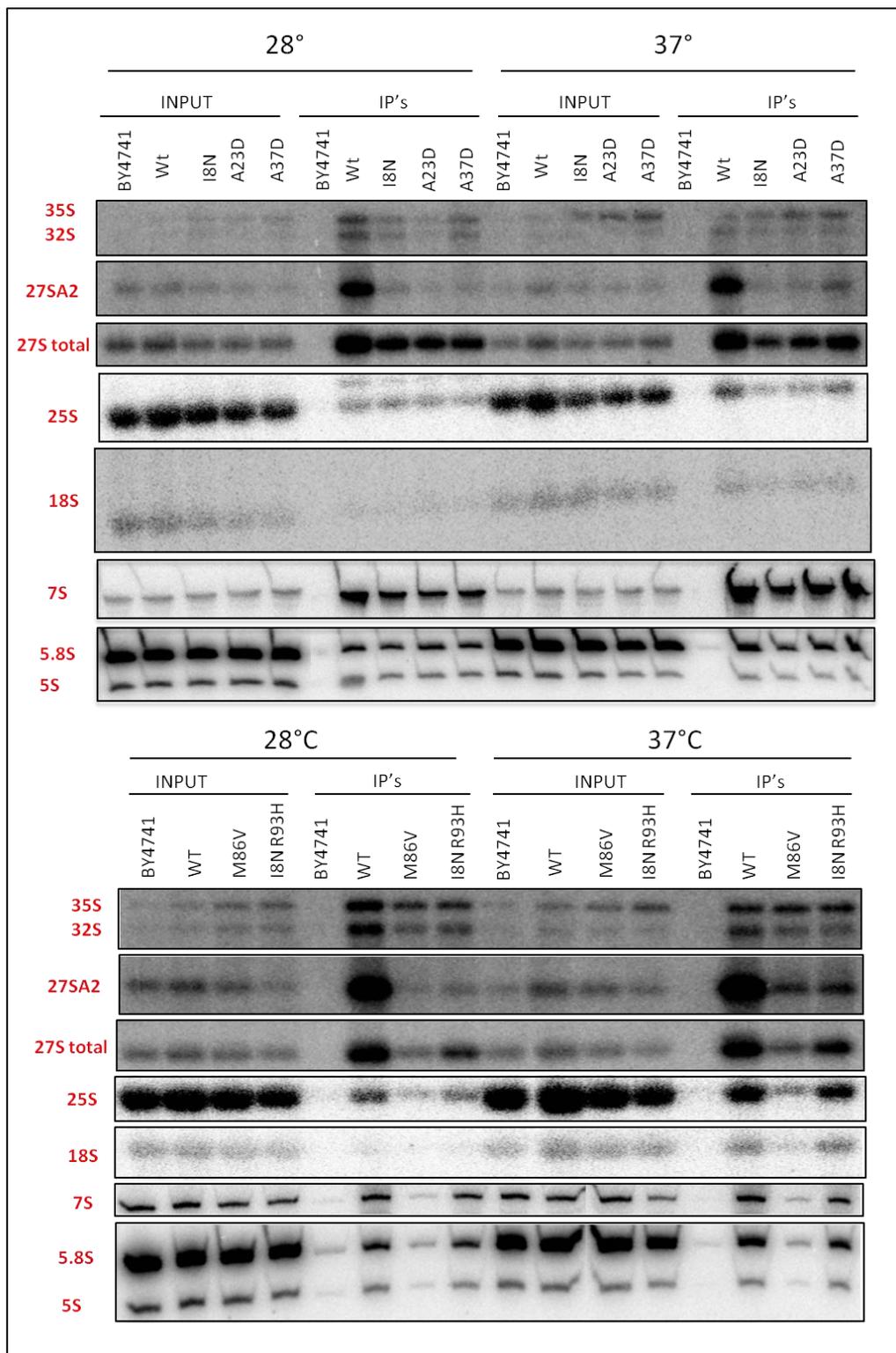


Figura 28. Análisis del ensamblaje de las proteínas L16B* en los pre-ribosomas 60S en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ*, fusionados al epítipo FLAG. La cepa control *RPL16BΔ*, y los mutantes *rpl16bΔ*,* se cultivaron en YEPD hasta fase exponencial a 28°C y se transfirieron durante 8 horas a 37°C. Se prepararon extractos celulares de los que una fracción se usó para extraer RNA total ("input") y otra se utilizó para inmunoprecipitar pre-ribosomas 60S con microesferas conjugadas con anticuerpo anti-FLAG, de las que se extajo el RNA que co-purifica con ellas ("IP"). Las distintas fracciones de RNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y formaldehído 4% y tras transferirlos a membranas de nylon se hibridaron con los mismos oligonucleótidos que en las figuras 23 y 25.

Resultados

Al analizar la cantidad de proteína L16B* mediante "western blot", en las inmunoprecipitaciones de las distintas cepas, se observa una reducción en la cantidad de proteína mutante M86V tanto a 28°C como a 37°C, que podría ser la causa de la menor cantidad de pre-rRNAs detectados en este mutante.

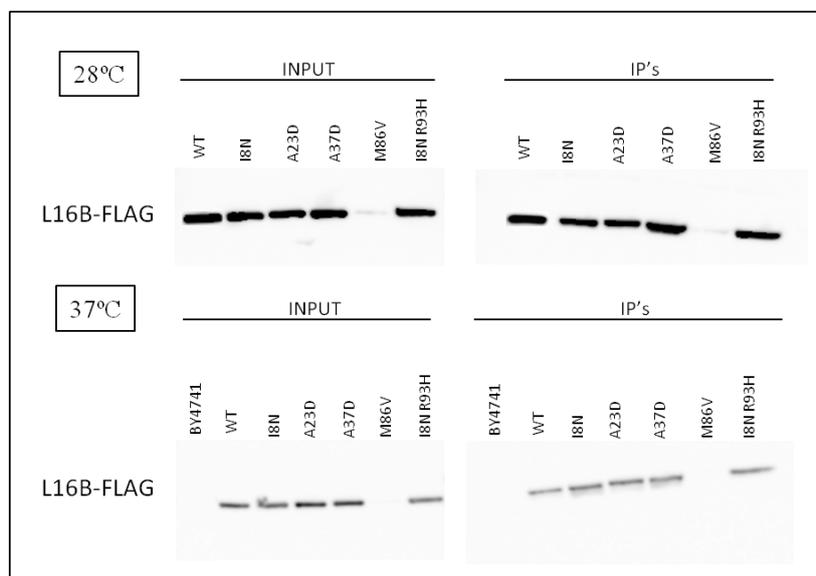


Figura 29. Detección de las proteínas L16B* que se ensamblan en pre-ribosomas 60S. En el experimento de la Figura 29 se analizó por "western blot" la cantidad de proteína L16B-FLAG en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ*, fusionados al epítipo FLAG, tanto en la fracción "Input" como en la inmunoprecipitada "IP".

7. TRADUCCIÓN DEL mRNA DE *GCN4* EN LOS MUTANTES *rpl16bΔi**

Una vez analizados los defectos de los mutantes *rpl16bΔi** en la biogénesis de ribosomas y en el inicio de la traducción general de mRNAs se investigó si tienen alteraciones en la regulación traduccional del mRNA del factor de transcripción *GCN4*. Existen precedentes de que variantes mutantes de proteínas ribosómicas causan defectos en la actividad peptil-transferasa de la subunidad 60S, reducciones en la tasa de síntesis general de proteínas, en la fidelidad traduccional y en la desrepresión de la traducción de mRNA de *GCN4* (Meskauskas y Dinman, 2001; Meskauskas y Dinman, 2007; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Rhodin y Dinman, 2010; Rakauskaite y Dinman, 2011; Rhodin *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión del gen *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 abierta cortas (uORFs 1-4, del inglés "upstream open reading frames") en la región líder del mRNA-*GCN4* (Hinnebusch 1997, 2005). La regulación traduccional del mensajero de *GCN4* es un buen modelo para estudiar

cómo afectan mutaciones en componentes de la maquinaria traduccional, a los procesos de iniciación y reiniciación de la traducción, ya que la traducción de este mensajero es muy sensible a alteraciones en varios de sus componentes. Mutaciones que alteran la integridad y disponibilidad de subunidades 60S modifican la regulación traduccional del mRNA de *GCN4*. Por ejemplo, una mutación o la delección de una de las parálogas de la proteína ribosómica L33 o L11 desreprimen constitutivamente su traducción (Foiani *et al.*, 1991; Martin-Marcos *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2014). Además, truncaciones del extremo C-terminal de L19B impiden la desrepresión de la síntesis de Gcn4 a niveles similares a los que ocurre en una cepa control durante la privación de algún aminoácido.

7.1 Análisis de la transcripción de *HIS4* en los mutantes *rpl16bΔ_i**

La expresión del gen *HIS4* en *S. cerevisiae* está regulada por Gcn4 (Lucchini *et al.*, 1984; Hinnebusch, 1988). La aparición de auténticas mutaciones *gcd* causa desrepresión constitutiva de la síntesis de Gcn4, el cual incrementa notablemente la transcripción de *HIS4* tanto en condiciones de carencia como de suficiencia de aminoácidos. Por tanto, valorar la expresión del gen *HIS4* constituye una aproximación indirecta para determinar los efectos de distintas mutaciones sobre la traducción de *GCN4*.

Para evaluar las cantidades del transcrito de *HIS4* en nuestros mutantes *rpl16bΔ_i**, se analizaron muestras de RNA total obtenido de células creciendo activamente en fase exponencial, en medio mínimo SD a 28°C, cuando se trataba de ensayos en **condiciones de represión (R)** de la expresión de *GCN4*, y en SD suplementado con sulfometurón metilo (SMM) cuando se trataba de imponer condiciones de **desrepresión de la traducción del mRNA GCN4 (DR)** (Materiales y Métodos). En el laboratorio la desrepresión traduccional de este mensajero se consigue estableciendo condiciones de privación de aminoácidos, añadiendo al medio de cultivo análogos de aminoácidos que inhiben la biosíntesis de alguno o varios de ellos. En este estudio utilizamos SMM, que inhibe la enzima acetolactato sintasa que cataliza la segunda reacción de la ruta de biosíntesis de la isoleucina y la primera de la valina (LaRossa y Scholss, 1984; Falco y Dumas, 1985; Jia *et al.*, 2000). Las distintas cepas se cultivaron a 28°C en medio SD hasta una $DO_{600nm} \sim 1.0$ (**R**) y en medio SD al que se añadió SMM a una concentración 0.5 µg/ml durante 6 horas de crecimiento en fase exponencial (**DR**).

Las cantidades del mRNA de *HIS4* se cuantificaron tanto por “northern blot” hibridando con una sonda genómica correspondiente a la ORF del gen *HIS4*, como por PCR cuantitativa, usando una pareja de oligonucleótidos que permite detectar la cantidad de *HIS4* en el cDNA preparado a partir de RNA total obtenido en las dos condiciones de cultivo. Cuando se analiza la expresión del mRNA-*HIS4* en condiciones de **represión (R)**, se aprecia en todos los mutantes

Resultados

una mayor cantidad que en la cepa control, salvo en A23D (Figura 30). En el caso de I8N y M86V se observan unos valores mayores, pero que no llegan a ser el doble, mientras que A37D y el doble mutante I8N R93H muestran una expresión de *HIS4* 2 y 3 veces superiores que la cepa control respectivamente, sugiriendo que ambos tienen un ligero fenotipo Gcd^- en condiciones de represión de la traducción de *GCN4*. Es reseñable el hecho de que en la cepa control que expresa el alelo *RPL16B Δ_i* desde un plásmido centromérico como única fuente de proteína L16B, se detecta una mayor cantidad del mRNA-*HIS4* que en la cepa BY4741, completamente silvestre de la que procede, lo cual indicaría que nuestra cepa control y por tanto los mutantes *rpl16b Δ_i **, tendrían aumentada la cantidad de Gcn4 respecto a una cepa silvestre en condiciones de represión.

Al evaluar la expresión del mRNA de *HIS4* en respuesta a la carencia de isoleucina y valina impuesta por el SMM (**DR**), se observa que ésta aumenta considerablemente en todas las cepas, por lo que el compuesto está desreprimiendo correctamente la traducción de *GCN4*. En esta situación, la cantidad de mRNA-*HIS4* de los mutantes I8N, A23D y M86V es similar al control, mientras que la de A37D y el doble mutante I8N R93H es cantidad ligeramente superior. Por tanto, en condiciones de desrepresión de la traducción de *GCN4* los cinco mutantes *rpl16b Δ_i ** no tienen un fenotipo Gcd^- tan claro como el observado en condiciones de represión.

Además, también se cuantificaron las cantidades del mRNA de *GCN4*, para verificar que eran similares en todas las cepas (Figura 30). En condiciones de represión, todos los mutantes excepto I8N muestran una menor cantidad del mRNA de *GCN4*, sugiriendo que el fenotipo Gcd^- sería algo más fuerte que lo que refleja la cantidad de mRNA de *HIS4*. Lo mismo ocurre en condiciones de desrepresión, de manera que si se normaliza la cantidad de mRNA de *HIS4* respecto a la de *GCN4* sí que tendrían un fenotipo Gcd^- , similar al observado en condiciones de represión.

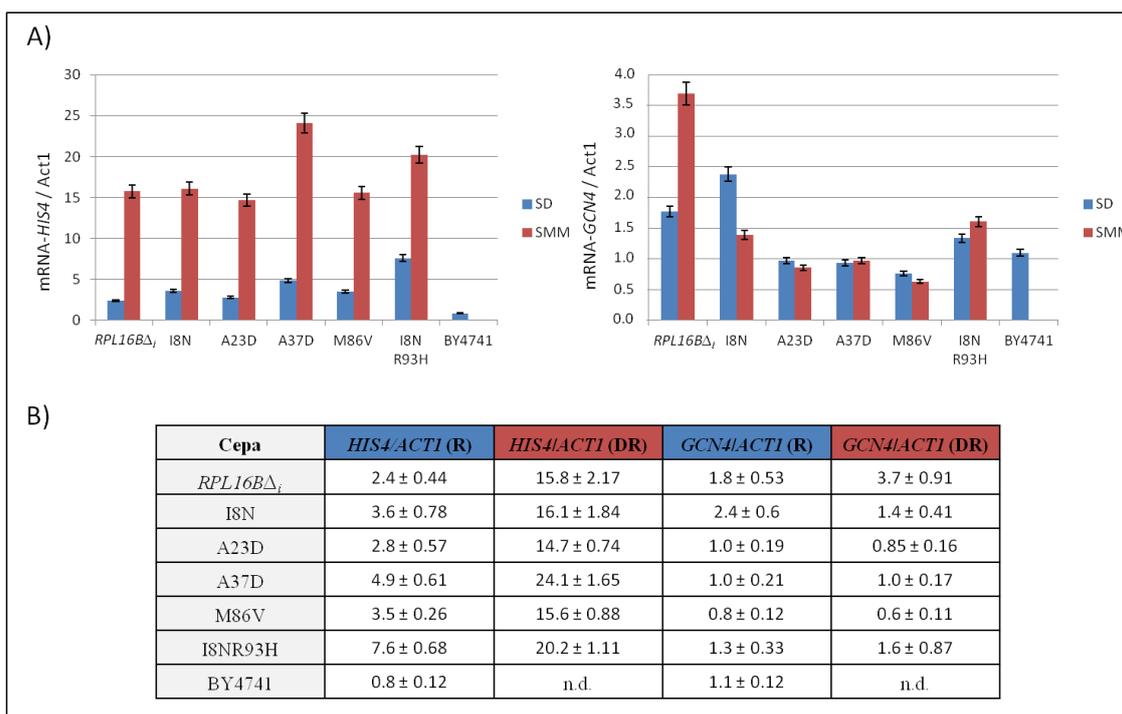


Figura 30. Análisis de la cantidad de los mRNAs *HIS4* y *GCN4* en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Los mutantes *rpl16bΔ_i y la cepa control *RPL16BΔ_i* se cultivaron a 28°C en SD y en SD+SMM 0.5 μg/ml durante 6 horas y se obtuvieron RNAs totales, a partir de los cuales se preparó cDNA y se cuantificó la expresión de los mRNAs *HIS4* y *GCN4* mediante PCR cuantitativa, utilizando una pareja de oligonucleótidos complementaria a la ORF de cada uno de ellos. Se utilizó la cantidad del mRNA del gen constitutivo *ACT1* para normalizar la cantidad de *HIS4* y de *GCN4*. Los valores se representan gráficamente en A) o numéricamente en B).**

FALTA EL NORTHERN

7.2 Análisis de la regulación traduccional de *GCN4* en los mutantes *rpl16bΔ_i**

Para obtener evidencias directas de que las mutaciones *rpl16bΔ_i** afectan a la expresión de *GCN4* a nivel traduccional, se midió la actividad β-galactosidasa de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* con diferente composición de uORFs en la secuencia líder de sus mRNAs (Figura 31).

Así, el plásmido **p180** porta la fusión *GCN4::LacZ* silvestre con las 4 uORFs que regulan la expresión de *GCN4*. El plásmido **p227** contiene la fusión *GCN4::LacZ* sin ninguna uORFs, lo que permite estudiar los niveles de expresión de *GCN4* sin que exista regulación por reiniciación en las uORFs (equivalente a fenotipo Gcd⁻ de desrepresión traduccional constitutiva). El plásmido **p226** tiene la fusión *GCN4::LacZ* únicamente con la uORF4 en su secuencia líder, la cual tiene efectos negativos sobre la expresión de *GCN4*, por lo que apenas llegan ribosomas hasta la ORF real de *GCN4* (equivalente a fenotipo Gcn⁻ o no desrepresión

Resultados

traduccional constitutiva). Por último, se usó el plásmido **pM226** en el que la fusión *GCN4::LacZ* tiene únicamente la uORF1 con su codón de terminación mutado, por lo que se alarga y se solapa con la ORF de *GCN4*. El análisis de los valores de actividad β -galactosidasa obtenidos con cada plásmido, nos va a dar información acerca de cómo afectan las mutaciones *rpl16b Δ _i** a los procesos de iniciación y reiniciación de la traducción.

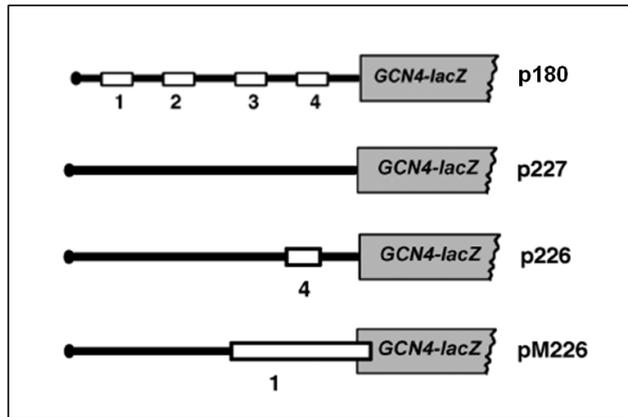


Figura 31. Esquema de los distintos transcritos de fusión *GCN4::LacZ*. Se representan las diferentes uORFs presentes en cada transcrito de fusión (Adaptada de Ghosh *et al.* 2014).

Estos ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron a partir de extractos celulares obtenidos de los mutantes *rpl16b Δ _i** y de la cepa control isogénica, cultivados de la misma forma que antes, en medio mínimo SD a 28°C cuando se trataba de ensayos en condiciones de represión (R), y en medio mínimo suplementado con SMM cuando se trataba de crear condiciones de desrepresión de la traducción del mRNA *GCN4* (DR).

En primer lugar se investigó si las mutaciones *rpl16b Δ _i** desreprimen la traducción del mRNA de *GCN4* en condiciones de suficiencia de aminoácidos o **represión (R)**, como es el caso de los mutantes con fenotipo *Gcd*⁻, y como sugerían las valoraciones de las cantidades del mRNA de *HIS4* para los mutantes A37D e I8N R93H. Para ello se valoró la actividad β -galactosidasa en varios clones de los mutantes y de la cepa control, transformados con el plásmido p180, con la versión silvestre de *GCN4* fusionada a *LacZ*. Como se observa en la figura 32 todos los mutantes muestran una mayor desrepresión de la traducción de *GCN4* en condiciones de represión que la cepa control *RPL16B Δ _i*, aunque existen diferencias entre ellos. Así, la desrepresión ejercida por las mutaciones A23D y M86V es bastante ligera (1.3-1.5 veces mayor), presentando unos valores de actividad β -galactosidasa similares al control, como sucedía con la expresión de *HIS4*. Sin embargo, los valores de actividad β -galactosidasa de los mutantes I8N y A37D son 2.5 veces superiores a los de la cepa control y más de 3 veces mayores en el caso del mutante doble I8N R93H. Esto confirma el fenotipo *Gcd*⁻ de A37D e I8N R93H y además sugiere que también en el mutante I8N se sintetizaría más *Gcn4* en condiciones

de represión, lo cual no se apreciaba tanto mediante la cuantificación indirecta del mRNA de *HIS4*.

A continuación se valoró la **desrepresión** de la traducción del mRNA *GCN4* en los mutantes *rpl16bΔ_i** en condiciones de privación de aminoácidos (**DR**). En este tipo de ensayos se observa más claramente que en la PCR cuantitativa la desrepresión causada por el SMM, ya que la cepa control tiene unos valores de actividad β-galactosidasa 12 veces mayores en DR que en R. En estas condiciones todos los mutantes *rpl16bΔ_i** tienen unos valores de actividad enzimática ligeramente menores que el control. Estos valores en el caso de I8N, A23D y M86V disminuyen aproximadamente entre un 5 y un 10%, mientras que los de A37D y I8N R93H 20% con respecto a la cepa control. Por tanto, parece que estos dos mutantes desreprimen la traducción del mRNA de *GCN4* con menor eficiencia que la cepa control.

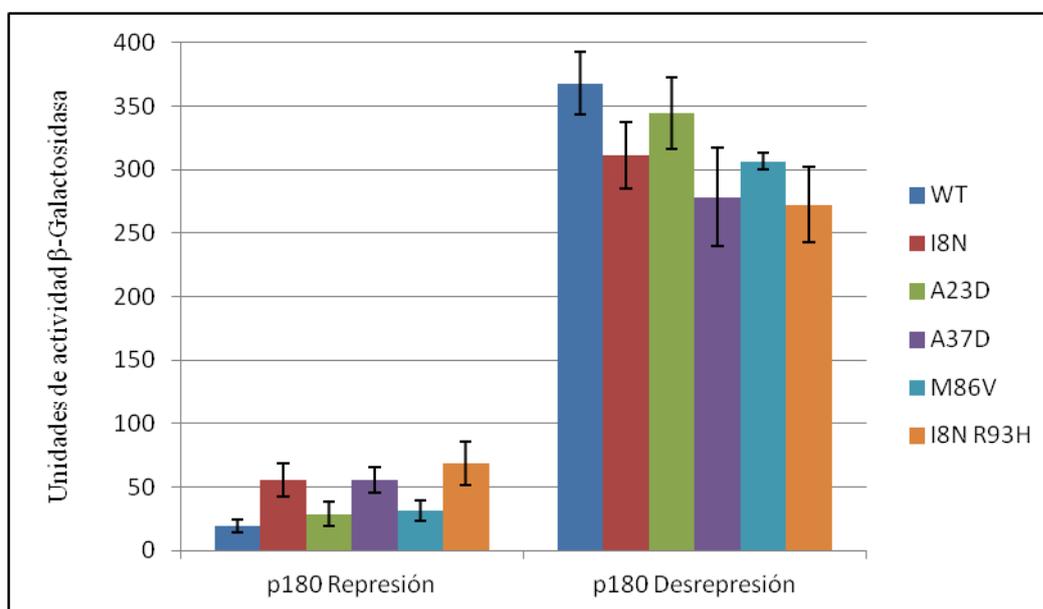


Figura 32. Traducción de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* con las 4 uORFs en la secuencia líder en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i.** Se valoró la actividad β-galactosidasa de los mutantes *rpl16bΔ_i** y la cepa control *RPL16BΔ_i* tras transformarlos con el plásmido p180. Las células se cultivaron a 28°C en medio SD (Represión) o en medio SD+SMM 0.5 μg/ml durante 6 horas (Desrepresión). Las unidades de actividad β-galactosidasa expresan nanomoles de ONPG hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína. Se muestran las medias de 5 replicados biológicos y los errores estándar de la media.

Posteriormente, se cuantificó la actividad β-galactosidasa de las cepas *rpl16bΔ_i** transformadas con los plásmidos p226 y pM226. Estos plásmidos dan información sobre la traducción de las uORFs1 (pM226) y uORF4 (p226) en el líder de *GCN4*, y permiten analizar posibles fenómenos de *leaky scanning*, o rastreo sin lectura. Estos fenotipos son debidos a una reducción en la actividad o en la cantidad de subunidad 60S, que causarían que algunos complejos de preiniciación 43S unidos a la secuencia líder no unan una subunidad 60S en el

Resultados

AUG de la uORF1 o de la uORF4, continuando el rastreo en dirección 3' del mRNA en busca de otro AUG.

Se observó que para ambos plásmidos, todos los mutantes *rpl16bΔ_i** tienen mayor actividad β-galactosidasa que la cepa control, aunque existen diferencias entre ellos. Mientras que el mutante A23D presenta valores de actividad más similares al control para ambos plásmidos, I8N y M86V tienen una actividad dos veces superiores y finalmente la actividad β-galactosidasa procedente de los dos plásmidos en A37D y en el mutante doble es tres veces mayor que en el control (Figura 33). Estos datos indican que se está produciendo con más frecuencia un fenómeno de *leaky scanning* de la uORF4 en los mutantes en condiciones de represión, lo cual originaría el fenotipo Gcd⁻. Además, según el plásmido pM226, también estaría ocurriendo *leaky scanning* de la uORF1, lo que haría que este fenotipo no sea tan claro en condiciones de desrepresión.

Por último, se midió la actividad β-galactosidasa de los mutantes y de la cepa control transformados con el plásmido p227. Este plásmido contiene un transcrito de fusión sin uORFs en su secuencia líder, por lo que permite comprobar si hay diferencias significativas en la cantidad del mRNA de *GCN4* en los mutantes. Cuando se comparan los valores de los mutantes *rpl16bΔ_i** con los de la cepa control, se observa que todos los mutantes presentan entre 1.4 y 2 veces más actividad β-galactosidasa que el control, a pesar de que según la PCR cuantitativa tenían la misma cantidad de mRNA de *GCN4*. No obstante, en otros estudios se ha descrito que en mutantes Gcd⁻ que exhiben una desrepresión constitutiva de la traducción *GCN4* se observa también un incremento de la cantidad del transcrito de entre 1.5 y 2 veces (Foiani *et al.*, 1991).

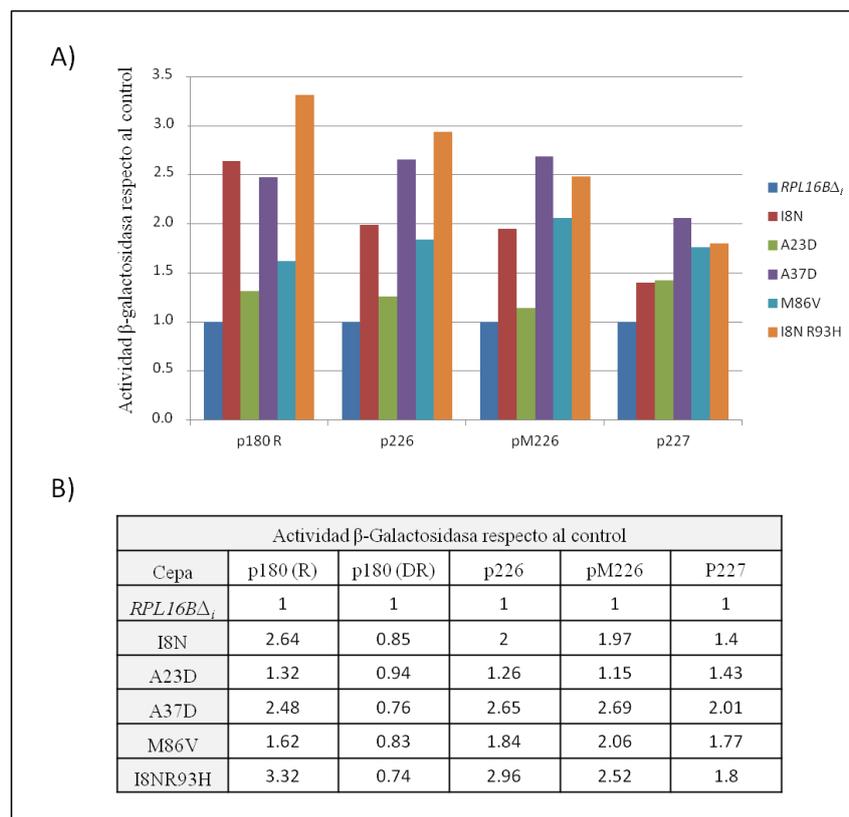


Figura 33. Traducción de transcritos de fusión *GCN4::LacZ* con diferentes uORFs en la secuencia líder en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Se valoró la actividad β-galactosidasa de los mutantes *rpl16bΔ_i** y la cepa control *RPL16BΔ_i*, transformados con los plásmidos p226, pM226 y p227. Las células se cultivaron a 28°C en medio SD para todos los transcritos de fusión. La actividad β-galactosidasa de los mutantes está normalizada respecto a la de la cepa control, normalizándose también los valores de p180 obtenidos en la Figura 32, para facilitar la comparación. Los valores se representan gráficamente en A) o numéricamente en B).

8. DEFECTOS EN FIDELIDAD DE LA TRADUCCIÓN

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

Para investigar si alguno de los mutantes *rpl16bΔ_i** podría tener defectos en la eficiencia o en la fidelidad de la traducción, se analizó su resistencia o sensibilidad a distintos antibióticos que inhiben la traducción en eucariotas, bien alterando la función descodificadora del mRNA o bien la actividad peptidil-transferasa de los ribosomas (Materiales y Métodos).

Se realizaron ensayos de gotas sobre placas de medio rico YEPD suplementadas con diferentes concentraciones de cada uno de los antibióticos. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de las células cultivadas en YEPD a 28°C hasta fase exponencial. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 28°C. Como se observa en la figura 34 los mutantes *rpl16bΔ_i** tienen cierta sensibilidad a paromomicina, un antibiótico que afecta la función descodificadora de la subunidad 40S (Carter *et al.* 2000; Ogle *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2003). En cambio los cinco mutantes son mucho más sensibles que la cepa control a anisomicina, un antibiótico que

Resultados

inhibe la actividad peptidil-transferasa de la subunidad 60S (Grollman, 1967; Rodriguez-Fonseca *et al.*, 1995; Meskauskas *et al.*, 2003). Además, los mutantes también son más sensibles que la cepa control a cicloheximida, un antibiótico que inhibe iniciación y la elongación de la traducción al unirse al ribosoma e impedir la translocación mediada por eEF2 (Abraham y Pihl, 1983; Schneider-Poetsch *et al.* 2010). Estos resultados indican que las mutaciones *rpl16bΔ_i** afectan a la función del ribosoma durante la traducción, como ya se había observado en los perfiles de polisomas.

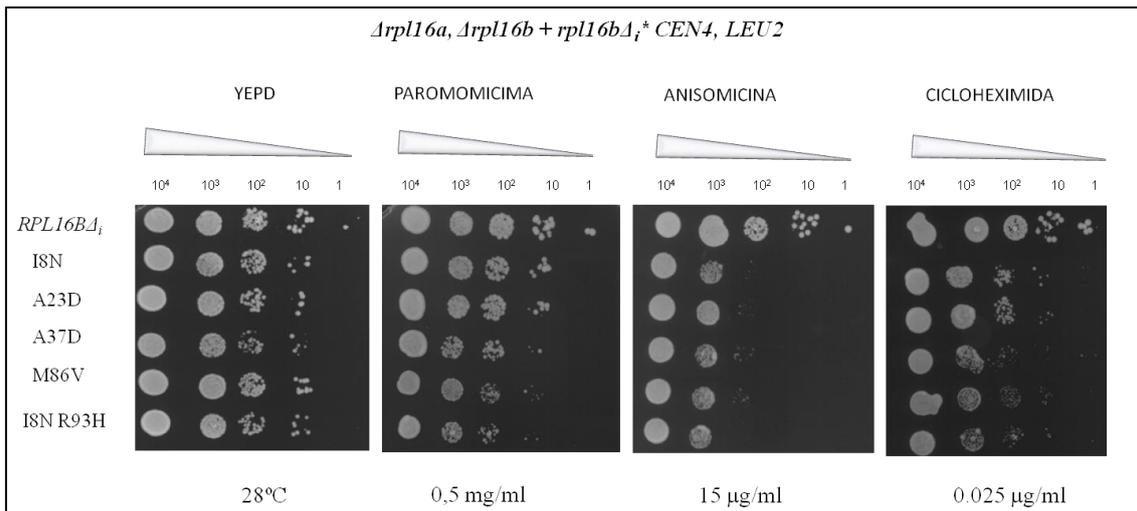


Figura 34. Crecimiento de cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i* en presencia de antibióticos inhibidores de la traducción. Diluciones seriadas de células que portan los alelos *RPL16BΔ_i* indicados, cultivadas a 28°C en YEPD hasta fase exponencial, se aplicaron en placas de YEPD suplementadas con distintas concentraciones de antibióticos: paromomicina (0.5 mg/ml), anisomicina (15 μg/ml) y cicloheximida (0.025 μg/ml). Las placas se incubaron durante 2 días a 28°C.

b) Análisis de la frecuencia en el cambio de fase de lectura programada

La fidelidad de la traducción en los mutantes *rpl16bΔ_i**, se analizó valorando la frecuencia con la que podrían ocurrir cambios en la fase de lectura en la traducción por los ribosomas. Para ello, se usaron plásmidos que contienen el promotor *PGK* seguido de un codón de inicio de la traducción AUG y a continuación el gen *LacZ* fusionado en fase con ese codón (p0-LacZ), o bien separado por una secuencia del virus L-A (p1-LacZ), que requiere un cambio de fase de lectura -1 para que se traduzca (-1 Programmed Ribosomal Frameshifting, -1PRF. Figura 35) (Dinman *et al.*, 1991; Dinman y Wickner, 1992). Se transformaron las distintas cepas con los dos plásmidos indicados, se determinó la actividad β-galactosidasa en los extractos de varios transformantes en cada caso y se calcularon los cocientes entre los valores obtenidos para cada tipo de plásmido. Los cambios programados en -1 en la fase de lectura (-1

PRF) pueden estar influenciados por modificaciones en parámetros biofísicos que promueven la parada de los ribosomas, como alteraciones en la afinidad por los tRNAs (Meskauskas y Dinman 2001; Meskauskas *et al.*, 2003) o cambios en las tasas de acomodación de los amino acil-tRNAs (Kinzy *et al.*, 2002).

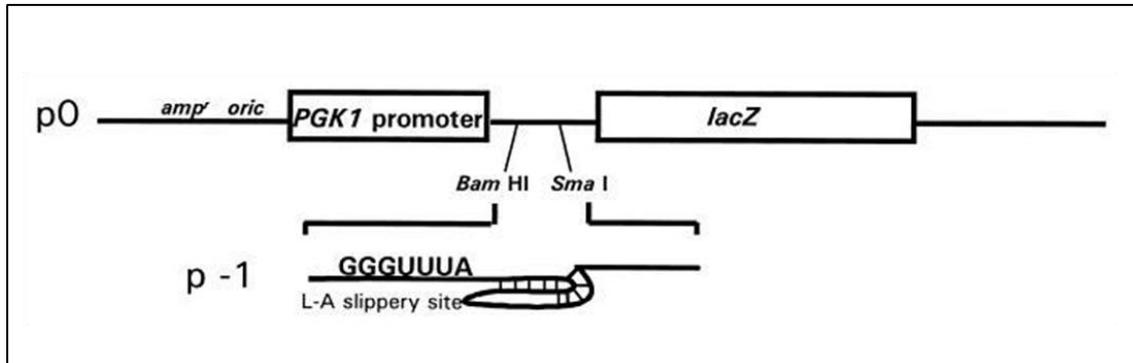


Figura 35. Esquema de los transcritos de fusión utilizados para analizar la frecuencia en el cambio de fase de lectura programada. En el plásmido p0 el gen *LacZ* está en fase con respecto al codón de inicio AUG, mientras que en el plásmido p1 el gen *LacZ* se encuentra en fase -1 respecto al AUG debido a la presencia de la señal -1 PRF del virus L-A (Peltz *et al.*, 1999).

Como se aprecia en la gráfica de la figura 36, sólo en los mutantes I8N e I8N R93H se observa un incremento significativo en el cociente entre la actividad β -galactosidasa en los clones transformados con el plásmido que contiene la ORF de *LacZ* fuera de fase y los que portan el plásmido con la ORF en fase de lectura con el AUG inicial. Este aumento en los dos mutantes es solamente de 1,7X en relación a la cepa control, pero es significativo y es similar a la frecuencia con la que se produce el cambio de fase de lectura en otros mutantes de proteínas ribosómicas, como L11, L2 y L10, (Rhodin y Dinman, 2010; Meskauskas *et al.*, 2008; Petrov *et al.*, 2008). En el resto de los mutantes *rpl16b* Δ *i** las frecuencias de error con las que se produce el cambio -1 de fase de lectura son similares a las de la cepa control, excepto en el A37D, en el que los valores son algo mayores, sin embargo estadísticamente no es significativo.

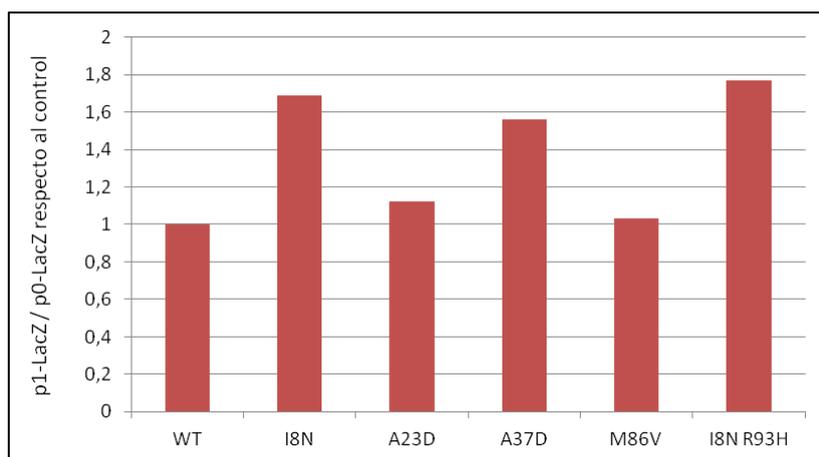


Figura 36. Análisis del cambio programado -1 en la fase de lectura en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ*. Los mutantes *rpl16bΔ_i** y la cepa control transformados con los plásmidos p0-LacZ o p1-LacZ se cultivaron en medio SD a 28°C hasta fase exponencial. Se prepararon extractos y se midió la actividad β-galactosidasa normalizándola con el plásmido control y refiriéndola a la de la cepa control.

c) Reconocimiento del codón AUG de inicio de la traducción

Utilizando herramientas y técnicas de genética molecular para levaduras se han identificado mutaciones que alteran la fidelidad en la selección del codón correcto de inicio de la traducción (Donahue y Cigan, 1988; Yoon y Donahue, 1992; Martin-Marcos *et al.*, 2011). Existen mutaciones denominadas *sui*, que reducen la fidelidad en la selección del codón de iniciación y permiten iniciar la traducción en codones UUG. Existe también una segunda clase de mutaciones denominadas *ssu* (supresores de *sui*) que suprimen la mayor frecuencia de iniciación en UUG que presentan los mutantes *sui*. Además, la intensidad de estos dos tipos de mutaciones se puede valorar cuantitativamente midiendo 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), mientras que los mutantes *ssu*, disminuyen el incremento del cociente UUG/AUG observado en presencia de mutaciones *Sui*⁻.

En *S. cerevisiae* existen mutaciones que afectan a los factores de inicio de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 o eIF5, y que provocan la estabilización de los complejos de preiniciación (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). Mutaciones en distintos componentes de la subunidad 40S, como las proteínas ribosómicas S5 y S16 (Ghosh *et al.*, 2014) o el rRNA 18S en zonas cercanas al sitio P, también producen fenotipo *Sui*⁻ (Dong *et al.*, 2008). También se ha descrito que la ausencia de una de las proteínas parálogas L11 causa fenotipo *Sui*⁻, al aumentar el inicio de la traducción en codones

AUA (Moritz *et al.*, 1991). Por otra parte, el mal funcionamiento de subunidades 60S, debido a alteraciones de su conformación estructural causadas por mutaciones en el rRNA 25S, puede impedir la unión correcta de las mismas con los PIC 43S, causando *leaky scanning* de codones canónicos AUG, en mayor medida que de codones UUG, originando un fenotipo Ssu^- (Hiraishi *et al.*, 2013).

Para investigar si los mutantes *rpl16b Δ _i** tienen defectos en la fidelidad de selección del codón de inicio de la traducción, se hicieron ensayos de actividad de β -galactosidasa para cuantificar la expresión *in vivo* de dos transcritos de fusión **HIS4::LacZ** que tienen (i) o bien un codón **AUG** en contexto favorable para la iniciación (ii) o un codón **UUG** al que los PICs 48S no reconocen o lo hacen con baja eficiencia. Para ello, los mutantes se transformaron con los plásmidos **p367** (**HIS4::LacZ [AUG]**) o **p391** (**HIS4::LacZ [UUG]**) y se cultivaron en medio líquido SD a 28°C hasta fase exponencial. Como control se utilizó un mutante *sui* del gen *SUII* (K60A), que codifica el factor eIF1, en el que la iniciación de la traducción ocurre con mayor frecuencia de lo normal en codones UUG (Martin-Marcos *et al.*, 2013). En los valores obtenidos para *HIS4* con un codón de inicio UUG respecto al que lleva el AUG, no se observó ninguna diferencia significativa en ninguno de los mutantes *rpl16b Δ _i** en relación a la cepa control; como sí ocurre en el mutante *sui1-K60A*, en los que la expresión desde un UUG incrementa 4 veces respecto a los valores obtenidos para una cepa que expresa L16B silvestre (Figura 37). Esto es debido a que, a pesar de que la expresión del transcrito de fusión con el codón UUG es mayor en todos los mutantes, siendo casi el doble en A37D, también son mayores los valores del transcrito con el codón AUG. Estos valores procedentes de los transcritos de fusión *HIS4::LacZ* son superiores en los mutantes respecto a la cepa control, porque, como se ha explicado anteriormente, la expresión de *HIS4* está regulada por Gcn4 y en los mutantes en estas condiciones se sintetiza mayor cantidad de este factor de transcripción (Figura 32).

Resultados

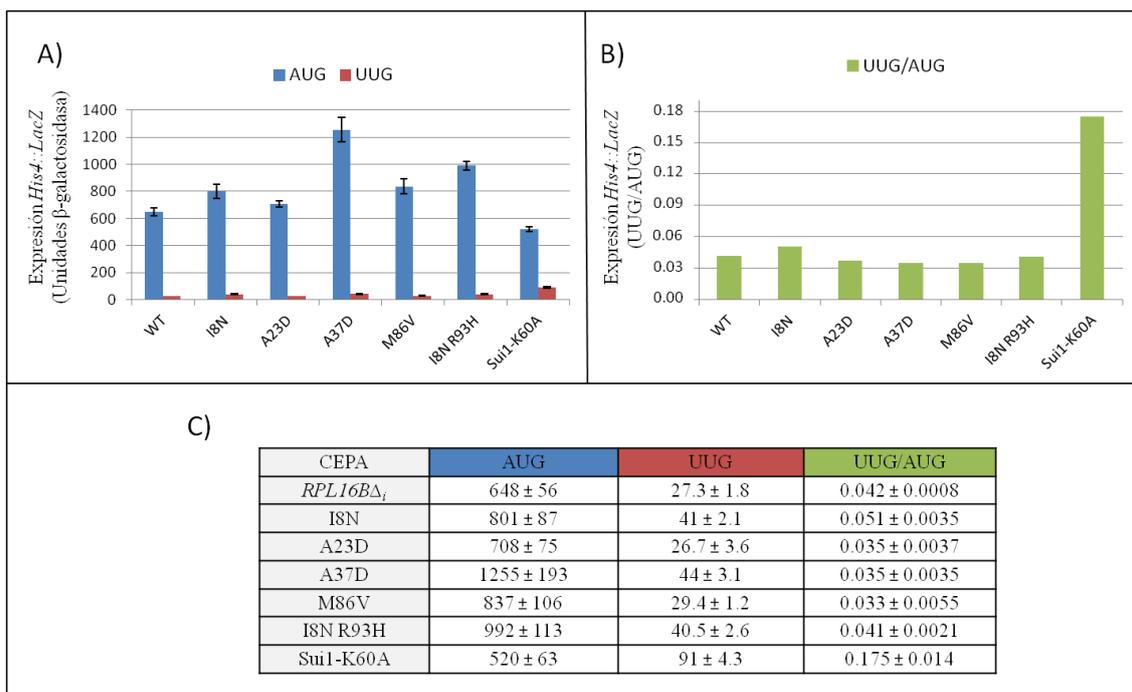


Figura 37. Traducción de los transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con codones de inicio AUG o UUG en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i* se transformaron con los plásmidos p367 (*His4::LacZ* [AUG]) o p391 (*His4::LacZ* [UUG]) se cultivaron a 28°C en medio SD hasta fase exponencial y se midió la actividad β-galactosidasa a partir de extractos totales. A) Representación gráfica de la expresión de los transcritos *HIS4::LacZ* con un codón AUG o con un codón UUG. B) Representación del cociente entre los valores de actividad cuando el transcrito posee el codón de inicio UUG frente a cuando posee AUG. C) Cuantificación de la actividad β-galactosidasa de los transcritos *HIS4::LacZ* en los mutantes *rpl16bΔ_i** y la cepa control. Los datos corresponden a la media aritmética de 3 experimentos independientes.

Además, como el mutante M86V tiene un grave defecto en el inicio de la traducción a 37°C en los perfiles de polisomas, ya que muestra una gran acumulación de monosomas, se decidió analizar la expresión de estos transcritos de fusión *HIS4::LacZ*, con codones de inicio AUG o UUG, incubando el mutante y la cepa control durante 6 horas a 37°C. Como se observa en la figura 38, en el mutante M86V la expresión del mRNA *HIS4* con un codón de inicio AUG disminuye un 75% respecto a la cepa control. Además, la expresión del mRNA *HIS4* con un codón UUG disminuye más del 90% respecto al control, pues tiene un valor de actividad β-galactosidasa casi inapreciable para este transcrito a temperatura restrictiva de 37°C.

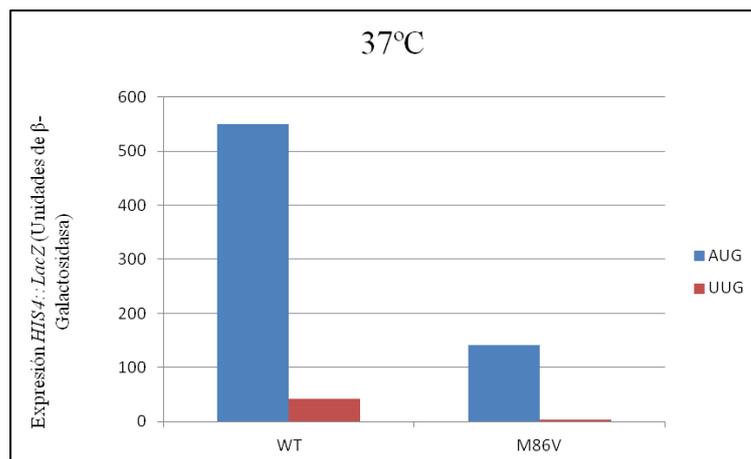


Figura 38. Traducción de los transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con codones de inicio AUG o UUG en el mutante M86V y en la cepa control a 37°C. Se procedió como en la Figura 38, pero los valores de actividad β-galactosidasa de ambas cepas se obtuvieron tras cultivarlas durante 6 horas a 37°C.

Capítulo 2: Me falta el título

La proteína L16 se encuentra conservada en los ribosomas de los organismos en los tres dominios de la vida: bacterias, arqueobacterias y eucariotas. Sin embargo, su versión eucariota ha adquirido con la evolución una larga hélice en el extremo C-terminal. Existen varios trabajos recientes en los que se ha investigado la funcionalidad de los nuevos elementos del ribosoma eucariota en la biogénesis de los ribosomas y en la traducción de los mRNAs (Ben-Shem *et al.*, 2010; Melnikov *et al.*, 2012). Así, algunos de estos nuevos elementos eucariotas serían importantes en el aumento en la complejidad estructural y funcional del ribosoma eucariota y por consiguiente del proceso de traducción en estos organismos (Jakovljevic *et al.*, 2004; Gamalinda y Woolford, 2014; Ghosh *et al.*, 2014).

Una vez identificados y analizados varios residuos importantes para la funcionalidad de la proteína L16 gracias a la selección de mutantes de pérdida parcial de función, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el papel de una larga α -hélice del extremo C-terminal de L16 de 62 aminoácidos en la biogénesis de ribosomas y en la traducción.

Utilizando la estructura cristalográfica de alta resolución del ribosoma 80S de levadura (Ben-Shem *et al.*, 2010), se aprecia que L16 establece múltiples interacciones con las proteínas ribosómicas L6, L14, L20 y L33, permitiendo numerosos contactos entre el dominio II, incluyendo su segmento de expansión del rRNA ES7 y el segmento ES 39 del dominio VI. Estas interacciones permiten un plegamiento adecuado de esta zona del rRNA 25S durante la maduración de la subunidad 60S, cubriendo el extremo 5' del rRNA maduro 5.8S, lo cual va a ser fundamental para su correcto procesamiento ya que regularía que el acceso de la exonucleasas encargadas de este proceso ocurra en el momento adecuado. La estructura tridimensional de la α -hélice C-terminal de L16 de *S. cerevisiae* sugiere la existencia de un giro de 90° que podría desempeñar un papel fundamental en el plegamiento de esta región, al anclar el segmento ES39 y el dominio VI del rRNA 25S al dominio II del mismo rRNA (Figura 39). Además, aunque la proteína L16 interacciona principalmente con el dominio VI de ese rRNA, el fenotipo de procesamiento de los precursores del 25S de un mutante en el que se inhibe la expresión de L16 es similar al del bloqueo en la expresión de otras proteínas ribosómicas que se encuentran en el dominio II del rRNA como L33 o L7 (Martin-Marcos *et al.*, 2007; Poll *et al.*, 2009; Jakovljevic *et al.*, 2012). Por lo tanto es predecible que el extremo C-terminal de L16 contribuiría a la regulación del procesamiento del extremo 5' del rRNA maduro 5.8S por las exonucleasas Rat1, Rrp17 y Xrn1. Además, el rRNA maduro 5.8S es exclusivamente eucariota, por lo que se puede proponer de estas observaciones que la extensión del extremo C-terminal de L16 habría aparecido evolutivamente en los organismos eucariotas a la vez que surge este rRNA 5.8S, interaccionando con su extremo 5' en la subunidad eucariota 60S.

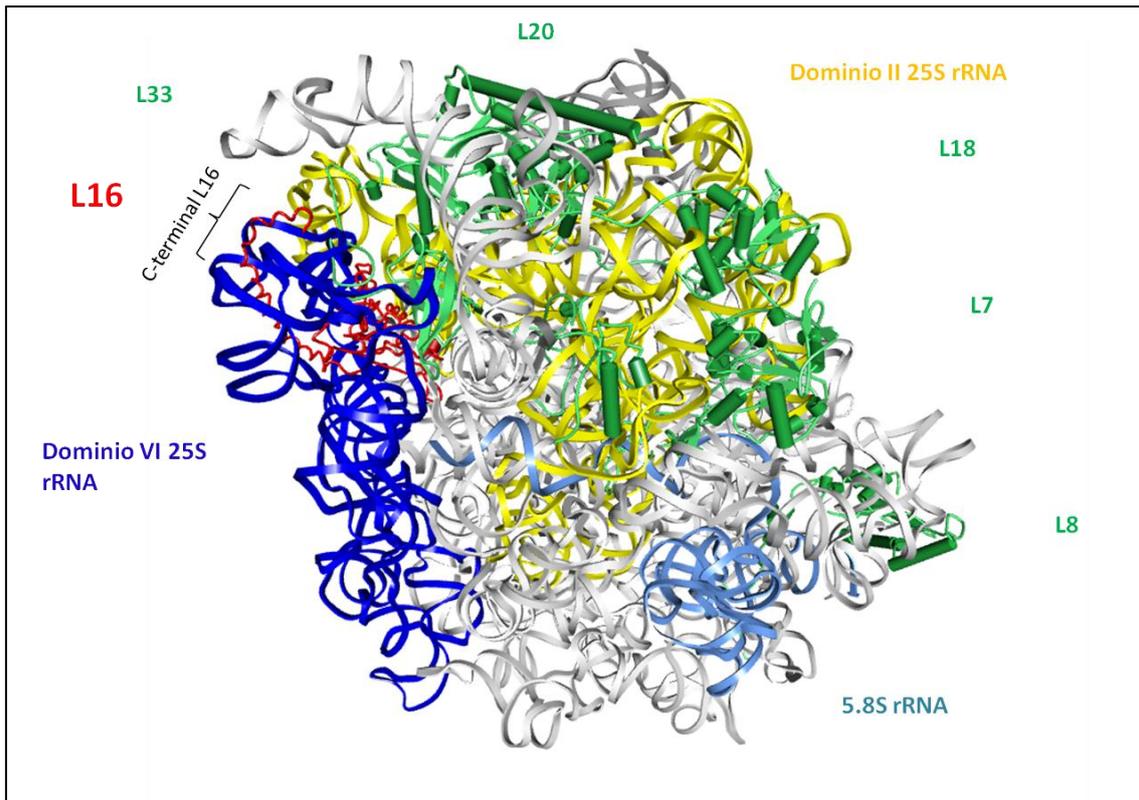


Figura 39. Posición de L16 y de su α -hélice C-terminal entre los dominios II y VI del rRNA 25S. L16 se representa en rojo, señalándose su extremo C-terminal, el dominio II del rRNA 25S en azul oscuro, el dominio VI del rRNA 25S en amarillo, el rRNA 5.8S en azul claro, varias RPs próximas a ellos en verde y el resto de dominios del rRNA 25S en gris.

Con el fin de investigar la posible función biológica de la α -hélice del extremo C-terminal de L16 en el procesamiento del pre-rRNA, para originar el rRNA maduro 5.8S, se generaron dos versiones truncadas de la proteína por mutagénesis dirigida. Para ello se introdujeron en el alelo *RPL16BA*₆, clonado en un vector centromérico, mutaciones que sustituyen los aminoácidos codificados por el codón 147 y por el 170 desde el ATG por un codón sin sentido. Los alelos *rpl16b* Δ CT generados codifican dos proteínas, L16B Δ 51 y L16B Δ 28, que carecen de los últimos 51 y 28 aminoácidos respectivamente. Es decir, L16B Δ 51 está desprovista de toda la α -hélice exclusivamente eucariota, y a L16B Δ 28 le falta solo una parte de ella que se introduce entre el dominio II del rRNA y el dominio VI del rRNA 25S.

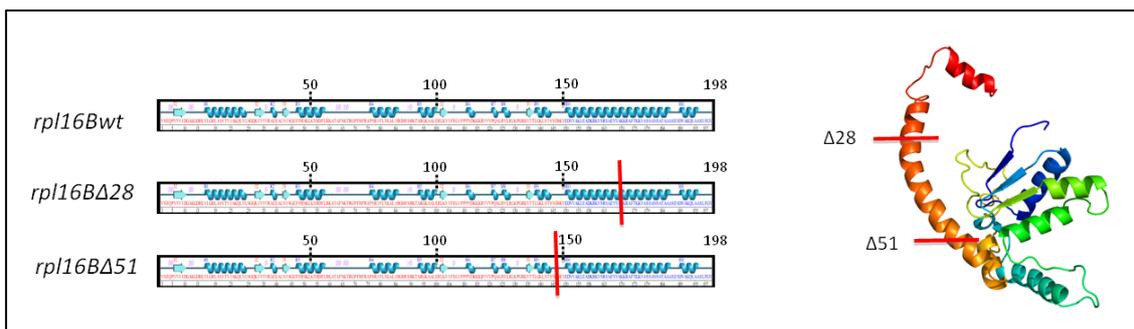


Figura 40. Representación de la región α -helicoidal del extremo C-terminal de L16B eliminada en parte o totalmente en los dos mutantes de truncación L16 Δ CT.

Para generar estos alelos truncados *rpl16 Δ CT* se utilizó el kit “Quickchange Lighting” de Agilent®, usando como molde el plásmido pAGH2 (*RPL16 Δ _i*, *CEN4 URA3*) y parejas de oligonucleótidos que sustituyen los nucleótidos correspondientes que dan lugar a los codones sin sentido, creándose los plásmidos pAGH3 y pAGH4 (Materiales y Métodos, Tabla 2 de los Anexos). Del mismo modo que en el apartado anterior, se denominará a los mutantes *rpl16 Δ CT* en función de la deleción correspondiente.

1. FENOTIPO DE CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES *rpl16 Δ CT*

Una vez obtenidos los alelos *rpl16 Δ CT* clonados en un vector *URA3*, se transformó con ellos la cepa TY931 (Δ *rpl16a*, Δ *rpl16b*, *YCplac111::pGAL::RPL16 Δ _i*). Esta cepa carece de los dos genes parálogos de *RPL16* en el genoma y sobrevive gracias a la presencia de un alelo *RPL16 Δ _i* clonado en un vector centromérico bajo el promotor *GAL1/10*, que es reprimible en presencia de glucosa, por lo que esta cepa no crece en YEPD ni en medio complejo definido SC. Por tanto al cambiar la fuente de carbono de galactosa a glucosa, se inhibe la expresión del gen *RPL16 Δ _i* y sólo se expresan los alelos truncados *rpl16 Δ CT*. De esta forma, es posible investigar si las versiones truncadas L16 Δ CT son viables, ya que los transformantes serían capaces de crecer en un medio con glucosa como el YEPD.

Se analizó el crecimiento en YEPD de transformantes de la cepa TY931 con plásmidos centroméricos que llevan clonados cada uno de los alelos de truncación *rpl16 Δ CT*, el vector vacío (mutante nulo) o el alelo *RPL16 Δ _i*, como controles negativo y positivo respectivamente. Para ello, las distintas cepas se cultivaron hasta fase exponencial en medio SC con galactosa y sin leucina ni uracilo (SCGal-leu-ura) y después se hicieron diluciones seriadas y se aplicaron gotas con el mismo número de células en placas de YEPD que se incubaron a 28°C durante 3

Resultados

días. Como se observa en la figura 41 la cepa TY931 transformada con un vector vacío es incapaz de crecer en YEPD, ya que en este medio con glucosa se inhibe la síntesis de L16B desde el promotor *GALI/10*. De la misma forma, cuando se expresan los plásmidos que portan los alelos *rpl16bΔCT* tampoco los transformantes correspondientes son capaces de crecer en YEPD. Por tanto, el extremo C-terminal de L16 es indispensable para el crecimiento de *S. cerevisiae*.

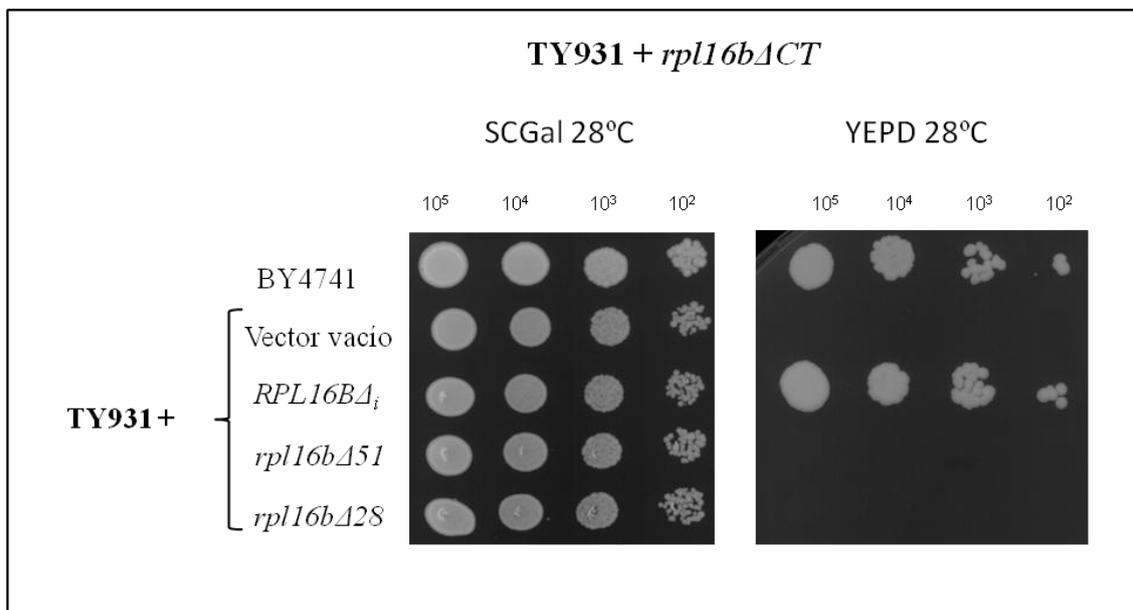


Figura 41. Fenotipo de crecimiento de la cepa TY931 transformada con los alelos *RPL16BΔ*, que se indican. La cepa WT BY4741 y la cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ *pGAL::RPL16BΔ_i*) transformada con un vector vacío o con vectores que portan el alelo silvestre *RPL16BΔ_i* o los alelos *rpl16bΔCT* se cultivaron en medio SCGal-leu-ura a 28°C hasta fase exponencial. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas que se aplicaron en placas de SCGal-leu-ura o en placas de YEPD que se incubaron a 28°C durante 3 días.

Además, estas cepas se cultivaron en medio líquido, tanto con galactosa como con glucosa como fuente de carbono a 28°C y se observó que al bloquear la expresión en glucosa del alelo *pGAL::RPL16BΔ_i*, las células transformadas con el plásmido que porta el alelo silvestre *RPL16BΔ_i* crecen prácticamente igual en YEPD que en SCGal-leu-ura. Sin embargo, los transformantes con el vector vacío o con los alelos *rpl16bΔCT*, dejan de crecer cuando se inhibe la expresión del alelo silvestre en YEPD. Durante las primeras dos horas de incubación en YEPD estas células siguen creciendo, debido a que aún tienen una cierta cantidad de proteína silvestre L16B sin embargo, al inhibir su síntesis y no ser completamente funcionales las proteínas sin la α hélice C-terminal, se observa un progresivo descenso en la velocidad de crecimiento con el tiempo de incubación en YEPD.

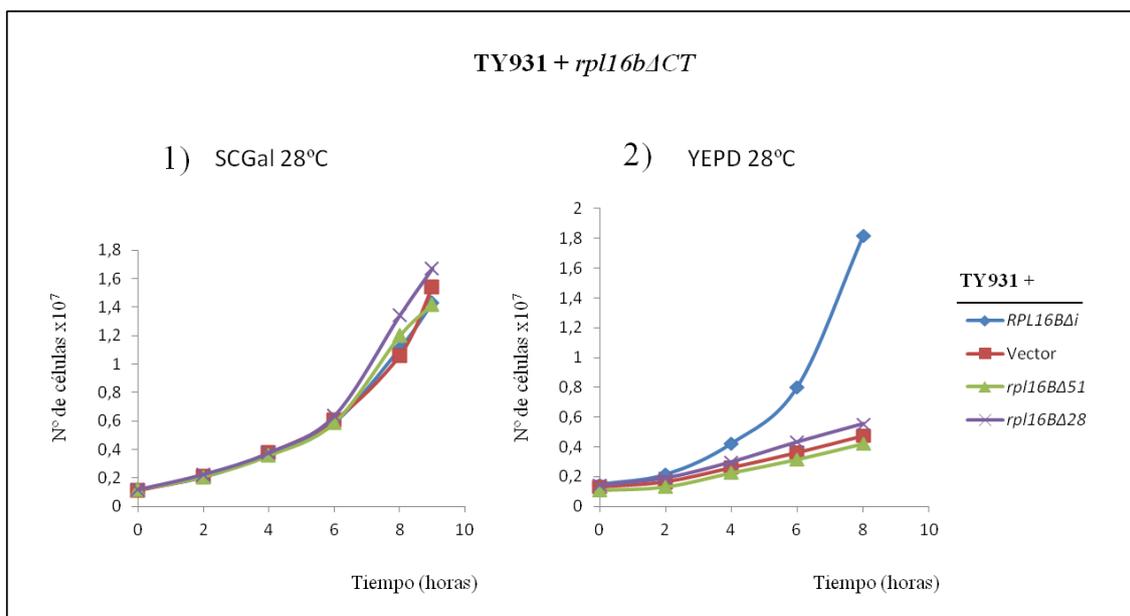


Figura 42. Curvas de crecimiento de la cepa TY931 transformada con los alelos *RPL16B*Δ, que se indican. La cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ pGAL::*RPL16B*Δ) transformada con un vector vacío o con plásmidos que portan el alelo silvestre *RPL16B*Δ, o los alelos *rpl16b*ΔCT se incubaron a 28°C hasta fase exponencial en medio SCGal-leu-ura. Las células se recogieron por centrifugación y se transfirieron al mismo medio a 28°C (1) o YEPD a 28°C (2). Los cultivos líquidos se incubaron en los correspondientes medios y se tomaron muestras cada 2 horas, para determinar en cada caso la tasa de crecimiento de las cepas.

Ya que las versiones mutantes L16BΔCT que carecen del extremo C-terminal no pueden mantener por sí solas la viabilidad celular, los experimentos con las cepas que las expresan se realizaron cultivándolas primero en medio con galactosa (SCGal-leu-ura) hasta fase exponencial y transfiriéndolas posteriormente a medio con glucosa (YEPD o bien SC-leu-ura) durante las horas indicadas en cada caso.

Análisis de la cantidad de proteína de L16ACT

Para comprobar que los alelos *rpl16b*ΔCT se expresan y originan proteínas detectables de menor tamaño que la silvestre L16B, se analizó la presencia de las mismas mediante “western blot” empleando versiones fusionadas a un epítipo FLAG (ver Materiales y Métodos). El epítipo se fusionó en el extremo C-terminal de las dos proteínas truncadas y de la silvestre, porque el extremo N-terminal de L16 está localizado en el interior de la subunidad 60S en un sitio poco accesible, por lo que su posible inmunoprecipitación una vez ensambladas en el ribosoma, para experimentos posteriores sería poco eficiente (Ver materiales y métodos).

Resultados

Transformantes de la cepa TY931 que expresan alelos de fusión *rpl16bΔCT::FLAG* (proteínas L16ΔCT-FLAG) o el alelo *RPL16BΔ_i-FLAG* (L16B-FLAG) se cultivaron hasta fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0.4$) en el medio SCGal-leu-ura y a continuación se transfirieron las células a YEPD durante 2, 4 y 8 horas. Posteriormente, se prepararon extractos proteicos a partir del mismo número de células de cada cultivo y se analizó la presencia de las proteínas L16-FLAG. Como se puede observar en la figura 43, las proteínas truncadas L16ΔCT se sintetizan correctamente en las cepas correspondientes, sus tamaños moleculares son menores que el de la proteína silvestre y además son menos abundantes o se detecta menor cantidad de ellas que de L16B.

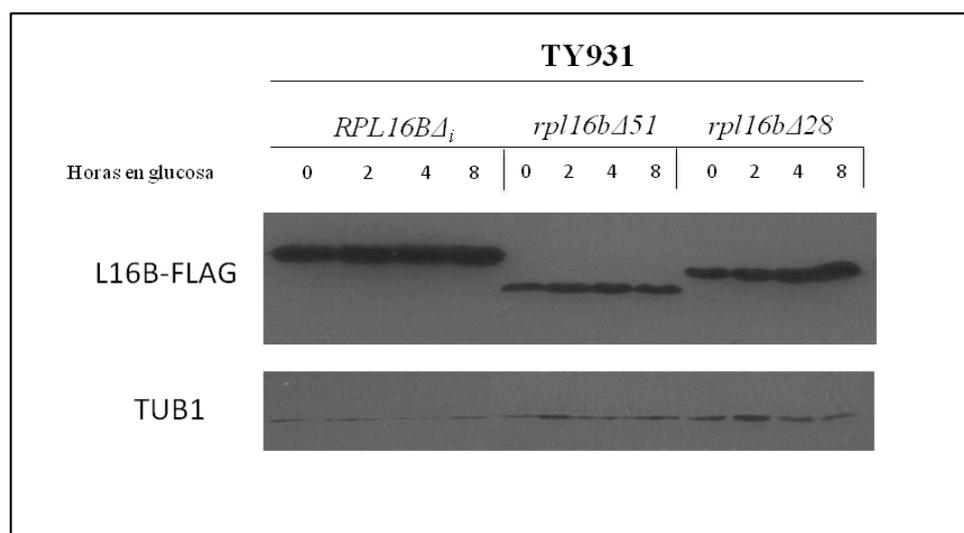


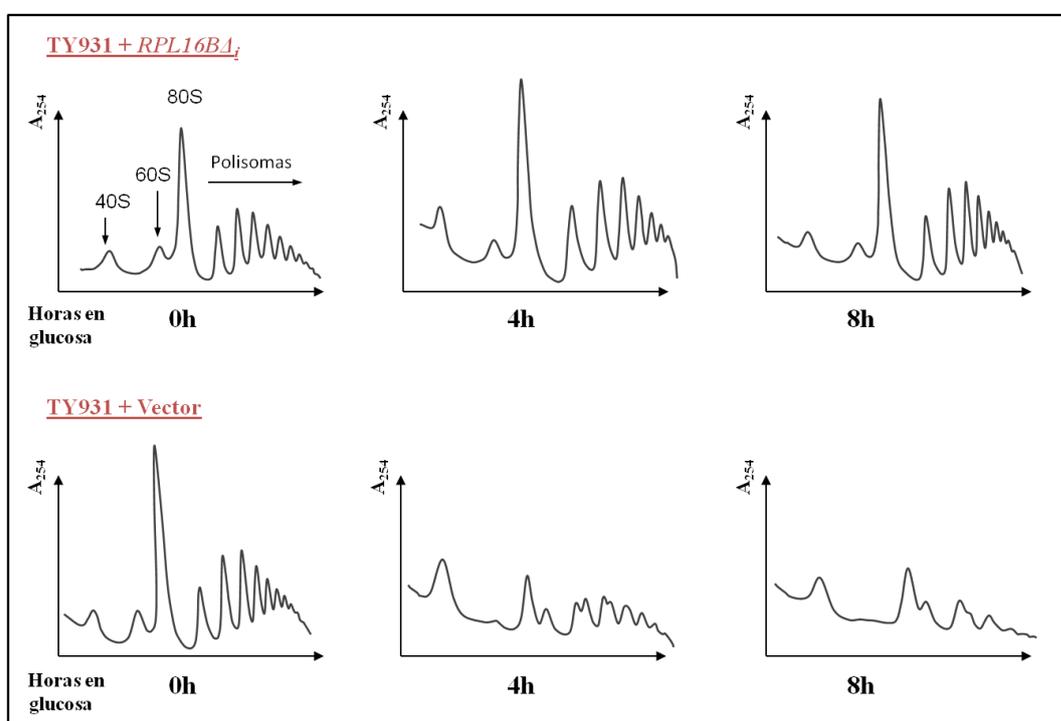
Figura 43. Detección de las proteínas L16BΔCT en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i* fusionados al epítipo FLAG. Se prepararon extractos totales de la cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ *pGAL::RPL16BΔ_i*) transformada con los alelos *RPL16BΔ_i-FLAG* indicados y cultivadas en SCGal-leu-ura y durante 2, 4 y 8 horas en YEPD a 28°C hasta una O.D.~0.8. Estos extractos se analizaron mediante "western blot" utilizando anticuerpos anti-FLAG y anti-tubulina que sirvió como control de carga.

2. DEFECTOS EN LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN Y EN LA BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN LOS MUTANTES *rpl16bΔCT*

Para investigar cómo afecta la truncación del extremo C-terminal de L16B a la síntesis general de proteínas, se obtuvieron perfiles de polisomas totales de las diferentes cepas en las que se expresa cada uno de los alelos *rpl16bΔCT*, el alelo silvestre *RPL16BΔ_i* o el vector vacío. Estas cepas se cultivaron en SCGal-leu-ura hasta fase exponencial y después se transfirieron a SC-leu-ura durante 4 u 8 horas. Se prepararon extractos celulares de estos mutantes y se separaron en gradientes de sacarosa continuos del 7% al 47% y que posteriormente se

fraccionaron monitorizando los RNAs con la lámpara UV de 254 nm acoplada al papel registrador.

En los perfiles de la cepa TY931 transformada con el vector vacío, se observa que la cantidad de subunidades maduras 60S se reduce drásticamente cuando se impide la expresión del alelo condicional *pGAL::RPL16B Δ _i*; al cultivar las células en presencia de glucosa, siendo apenas perceptible después de 8 horas de incubación. Además, debido a este gran déficit de subunidades 60S, se observa una enorme acumulación de subunidades 40S y una gran reducción de monosomas 80S y de polisomas. Por tanto, la disminución progresiva de la cantidad de L16B bloquea también progresivamente la maduración de las subunidades 60S y la formación de ribosomas maduros 80S nuevos que se incorporen a la traducción global de mRNAs. En los perfiles de las cepas transformadas con los alelos de truncación se aprecia un fenotipo muy similar al de la reducción de la expresión de *RPL16B*, aunque algo menos severo. Estos datos sugieren que el principal defecto traduccional de los mutantes que carecen del extremo C-terminal de L16B se debería a un grave problema en la producción de subunidades 60S, similar a lo que ocurre cuando no existe la proteína completa. Aunque el mutante *rpl16b Δ 28* tiene un fenotipo de defecto menor que el del mutante *rpl16b Δ 51* y éste a su vez que el de la carencia de L16B.



Resultados

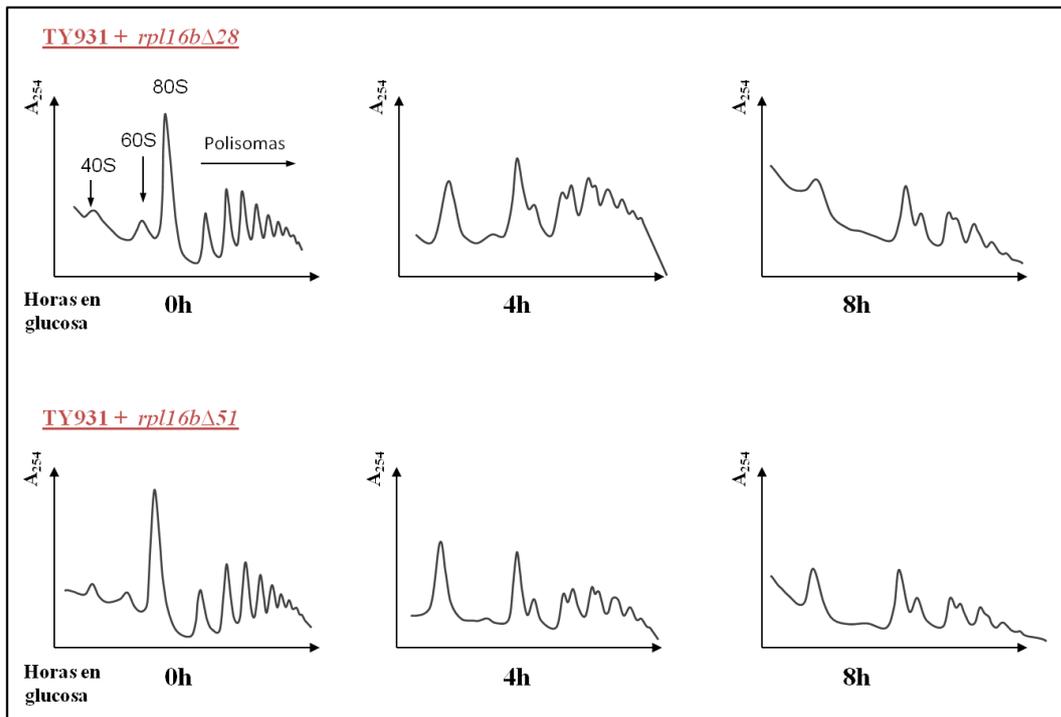


Figura 44. Perfiles de polisomas de la cepa TY931 transformada con los alelos *RPL16BΔ*, que se indican. Se obtuvieron los perfiles de polisomas de la cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ pGAL::*RPL16BΔ_i*) transformada con un vector vacío o con vectores que portan el alelo silvestre *RPL16BΔ_i*, o los alelos *rpl16bΔCT*. Se utilizaron extractos celulares preparados a partir de células incubadas en SCGal-leu-ura a 28°C y después de transferirlas 4 y 8 horas a YEPD. Los picos corresponden (de izquierda a derecha) a las subunidades 40S, 60S, a los ribosomas 80S y a los polisomas. En cada perfil se indica el cociente polisomas/monosomas (P/M).

Procesamiento de los precursores de los RNAs ribosómicos en mutantes *rpl16bΔCT*.

Para investigar si la α -hélice del extremo C-terminal de L16 es esencial en la biogénesis de las subunidades 60S, como parecen indicar los perfiles de polisomas, se analizó el procesamiento de los precursores de los rRNAs en los mutantes *rpl16bΔCT* mediante ensayos de “northern blot”. Además, estos experimentos nos permitirían comprobar si el extremo C-terminal de L16 es necesario para el procesamiento del extremo 5' del rRNA maduro 5.8S, como se infería de la estructura tridimensional de la subunidad 60S.

Para ello las distintas cepas se cultivaron en SCGal-leu-ura a 28°C hasta fase exponencial y luego se transfirieron a SC-leu-ura durante 2, 4 y 8 horas y después se extrajo el RNA total a partir del mismo número de células. Se cargaron cantidades equivalente a ~10 μ g de RNA de cada cepa en geles desnaturalizantes de agarosa y se separaron por electroforesis y posteriormente se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Materiales y Métodos). La carga se normalizó en relación a la señal de hibridación de los RNAs *SCR1* y *U3*.

Como se observa en la figura 45, el fenotipo de procesamiento de los pre-rRNAs en los mutantes *rpl16bΔCT* es muy similar al que se observa al reducirse progresivamente la expresión de *pGAL::RPL16BA_i* (vector vacío). Cuando se analizan los precursores que se pueden detectar con el oligonucleótido 4, tanto en los mutantes *rpl16bΔCT* como al reducirse la cantidad de la proteína L16B en glucosa, se aprecia una gran acumulación del precursor primario 35S respecto a lo que ocurre en el control. Este fenotipo concuerda con el hecho de que la proteína L16 se incorpore en las primeras etapas de la biogénesis de la subunidad 60S, por lo que su ausencia o variantes mutantes de ella podrían afectar al procesamiento del precursor primario 35S en los sitios A₀ y A₁. Además, en las cepas que sintetizan proteínas truncadas L16BΔCT y en el mutante nulo, al analizar la evolución del cociente entre el 27SA₂ y otros precursores a medida que las cepas crecen en glucosa, se observa la acumulación del mismo con respecto a los precursores posteriores en la ruta de procesamiento. Para cuantificar mejor la acumulación del pre-rRNA 27SA₂, se hibridó la membrana con el oligonucleótido 6, que detecta todos los precursores 27S y el precursor 7S del 5.8S. Sin embargo, tanto en los mutantes *rpl16bΔCT* como en ausencia de la proteína L16, el pre-rRNA 7S no se produce en cantidad detectable. Defectos en el procesamiento de los precursores 27S junto con una drástica reducción de 7S, serían la causa de una grave reducción en la producción de rRNA maduro 25S y en la biogénesis de las subunidades 60S que se apreciaba en los perfiles de polisomas de los mutantes *rpl16bΔ28* y *rpl16bΔ51*.

Cuando se inhibe la síntesis de la proteína silvestre L16B en los mutantes *rpl16bΔCT*, se observa en el “northern blot” un cambio de movilidad en la señal de hibridación de los precursores 27S, que sugería que podrían ser de mayor tamaño y no se estarían formando correctamente. Sin embargo, con esta técnica, no puede determinarse con exactitud en qué etapa del procesamiento de los precursores 27S es imprescindible la presencia del extremo C-terminal de L16. Es decir, puede ocurrir que el pre-rRNA 7S no se está produciendo porque en los mutantes los precursores 27SB no se están procesando bien en el sitio C₂, o es que estos pre-27SB no se están formando debido a que el problema está en pasos anteriores del procesamiento, bien en el sitio A₃ o bien en los sitios B_{1L}-B_{1S} del extremo 5' del rRNA 5.8S. Por tanto, con el fin de determinar en qué momento del procesamiento de los precursores 27S se requiere la α -hélice C-terminal de L16 se realizaron ensayos de “primer extension”.

Resultados

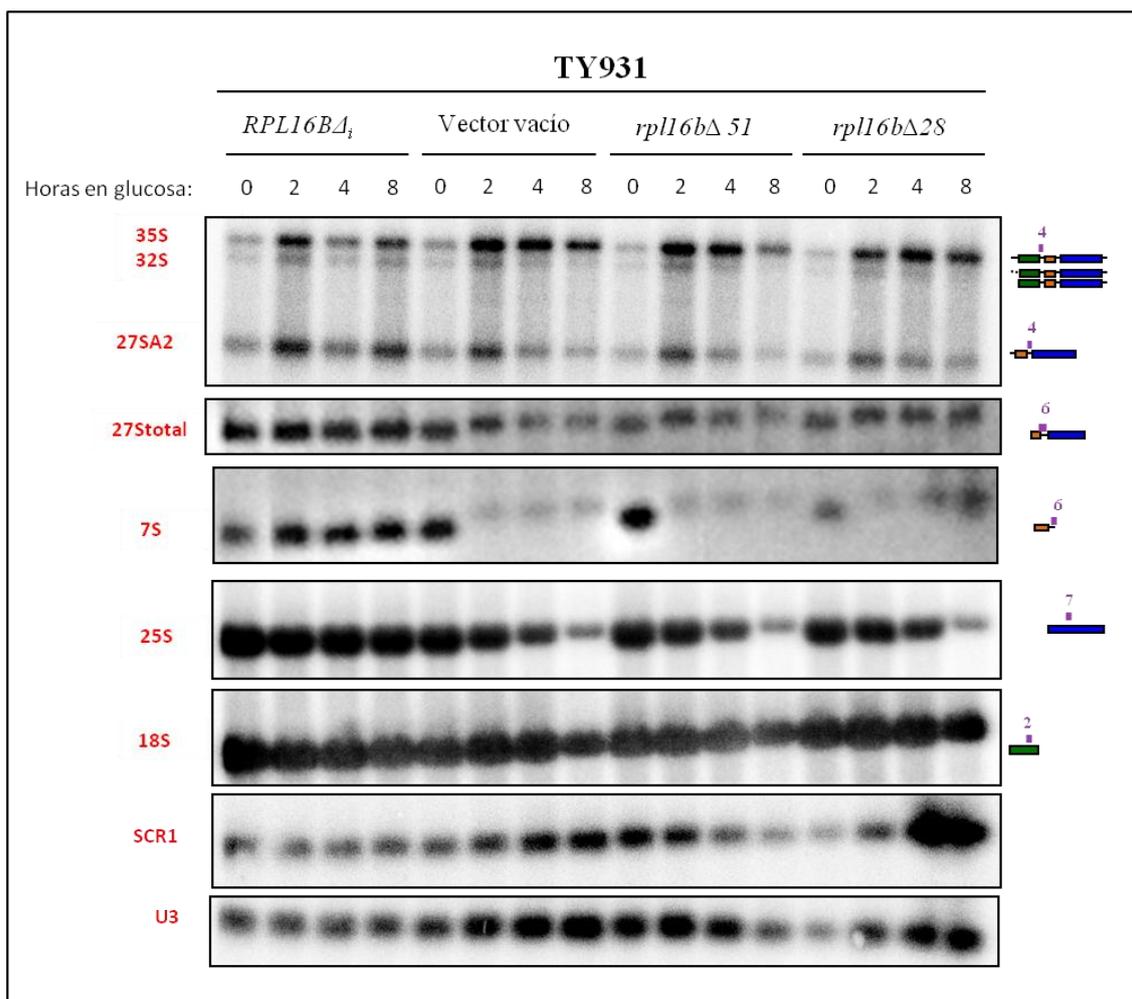


Figura 45. Defectos en el procesamiento y acumulación de los rRNAs en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. La cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b pGAL::RPL16B\Delta_i$) transformada con un vector vacío o con plásmidos que portan el alelo silvestre *RPL16BΔ_i* o los alelos *rpl16bΔCT* se cultivaron en SCGal-leu-ura hasta fase exponencial a 28°C y se transfirieron durante 2, 4 y 8 horas a YEPD. Se obtuvieron RNAs totales y se sometieron a electroforesis desnaturizante geles de 1.2% agarosa y 4% formaldehído. Como sondas moleculares específicas se utilizaron los oligonucleótidos 2, 4, 6 y 7, que anillan en las regiones señaladas en la Figura 24; y otras que detectan específicamente el RNA SCR1 y el snoRNA U3.

Para llevar a cabos los ensayos de “primer extension” se utilizó como cebador el oligonucleótido 6 (complementario a la región E-C₂) marcado radiactivamente, para realizar una reacción de retro-transcripción, que permitiera amplificar el extremo 5’ de los diferentes precursores 27S, utilizando como molde los mismos RNAs totales que se cargaron en el “northern blot”.

Como se observa en la figura 46, los precursores 27SA₂ y 27SA₃ se producen correctamente a medida que se bloquea la expresión de L16, tanto en el mutante nulo como en los mutantes en los que se sintetizan cada una de las proteínas truncadas L16ΔCT. Sin embargo, en ninguno de ellos se producen los precursores 27SB_L ni 27SB_S, lo que indicaría que no está teniendo lugar el procesamiento en los sitios B_{1L} ni B_{1S} del precursor 27SA₃. Por tanto, como se

predecía de su posición en la estructura de la subunidad 60S, la α -hélice del extremo C-terminal de L16 es imprescindible para el procesamiento del extremo 5' del rRNA maduro 5.8S, que va a ser necesario para una correcta biogénesis de esta subunidad madura 60S.

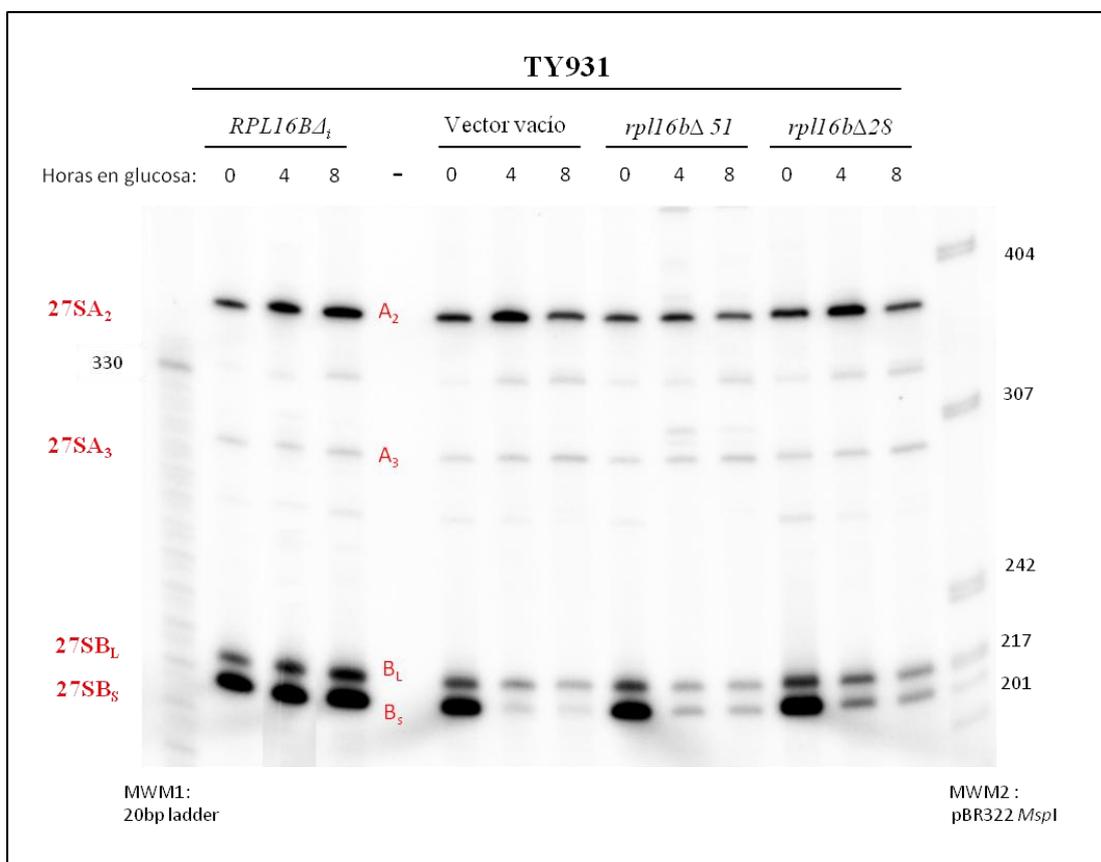


Figura 46. Defectos en el procesamiento de los pre-rRNAs 27S en cepas que portan diferentes alelos *RPL16BΔ_i*. Ensayo de *primer extension* utilizando los RNAs totales de la figura 45 y como cebador el oligonucleótido 6 marcado radiactivamente. Como marcadores de masa molecular se utilizó el plásmido pBR322 digerido con la endonucleasa de restricción *MspI* y el marcador comercial 20bp (Gibco). De esta forma, se amplificaron los extremos 5' de los distintos precursores 27S que posteriormente se resolvieron en geles de acrilamida al 6% y urea 8M.

Aunque ni en el mutante nulo ni en los mutantes con el C-terminal de L16B truncado se está produciendo el procesamiento del precursor 27SA₃, parece que en el mutante nulo existe una menor cantidad de los precursores 27SB que en *rpl16bΔ51*, y en éste a su vez menos que en *rpl16bΔ28*. Es decir, parece que aunque las dos truncaciones del C-terminal de L16B son letales, la mutación *rpl16bΔ28* impide el procesamiento del extremo 5' del rRNA 5.8S menos drásticamente que *rpl16bΔ51*, y ésta a su vez menos que la ausencia progresiva o casi total de la proteína. Esto también se observa en el “northern blot”, donde se intuye que hay una mayor cantidad del precursor 7S en *rpl16bΔ28* que en *rpl16bΔ51* (aunque en este caso podría haber sobrecarga de RNA en este carril según indica la señal de *SCR1*). Por tanto, como se predecía de su posición en la estructura de la subunidad 60S, la α -hélice del extremo C-terminal de L16 es

imprescindible para el procesamiento del extremo 5' del rRNA maduro 5.8S, que va a ser necesario para una correcta biogénesis de esta subunidad madura 60S.

3. LAS PROTEÍNAS TRUNCADAS L16 Δ ACT SE ENSAMBLAN EN PRE-PARTÍCULAS RIBOSÓMICAS

Como se ha demostrado anteriormente, tanto la ausencia de parte del extremo C-terminal de L16B, como la ausencia de síntesis de la proteína completa, provocan un bloqueo en el procesamiento del rRNA precursor 27SA₃, impidiéndose la formación del extremo 5' del rRNA 5.8S. No obstante, en los mutantes de truncación este fenotipo podría deberse a que el extremo C-terminal de L16 fuese esencial para ese paso específico de procesamiento, o bien a que las proteínas truncadas no se estuviesen incorporando correctamente en las pre-partículas ribosómicas, por lo que esos mutantes tendrían un fenotipo similar al observado por la falta de síntesis de la proteína esencial L16. Sin embargo, el fenotipo de procesamiento de los mutantes de truncación analizados, *rpl16b Δ 28* y *rpl16b Δ 51*, no es tan drástico como el del mutante nulo (*pGAL::L16B* durante el crecimiento en glucosa), lo que sugiere que al menos una fracción de las proteínas L16 truncadas sí se ensamblarían en subunidades 60S. Para investigar si esto ocurría, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de pre-partículas ribosómicas 60S en estos mutantes. Para ello, se usaron versiones de L16B y de L16 Δ ACT fusionadas al epítipo FLAG en su extremo C-terminal clonadas en vectores multicopia (pAGH5, pAGH6 y pAGH7, ver Materiales y Métodos y Tabla II de los Anexos), y se utilizaron micro-esferas conjugadas con anticuerpo anti-FLAG para inmunoprecipitar las pre-partículas ribosómicas, analizando después los pre-rRNAs asociadas a ellas por “northern blot”, de la misma forma que se hizo con los mutantes *rpl16b Δ _i** (Figura 28 o pág 62). De esta manera, si las proteínas truncadas se incorporan en pre-ribosomas 60S se deberían detectar precursores del rRNA, así como rRNAs maduros en los inmunoprecipitados de los mutantes correspondientes.

Los resultados de la figura 47 muestran que en los inmunoprecipitados de los mutantes que sintetizan las proteínas truncadas se detectan los mismos precursores del rRNA y en cantidades similares a los de la proteína completa. En el caso de los rRNAs maduros 25S y 18S se inmunoprecipitaron ambos con menor eficiencia a partir de los extractos del mutante *rpl16b Δ 51*, aunque parece que en la fracción “input” también hay menos cantidad de rRNA en este caso. No obstante, en todos los casos se observa menos cantidad de los rRNAs maduros 25S y 18S que de sus precursores, debido a que la proteína está menos accesible en la subunidad madura 60S que en las pre-partículas. Sin embargo, los precursores 35S y 27S inmunoprecipitan con eficiencia similar tanto en los extractos de los mutantes de truncación como en los de la

cepa control. Por tanto, las proteínas L16B Δ 28 y L16B Δ 51 sí se incorporan en pre-partículas ribosómicas 60S, aunque en ellas no se estabilizarían correctamente los dominios II y VI del rRNA 25S, por lo que no ocurriría correctamente el procesamiento exonucleolítico del extremo 5' del rRNA 5.8S.

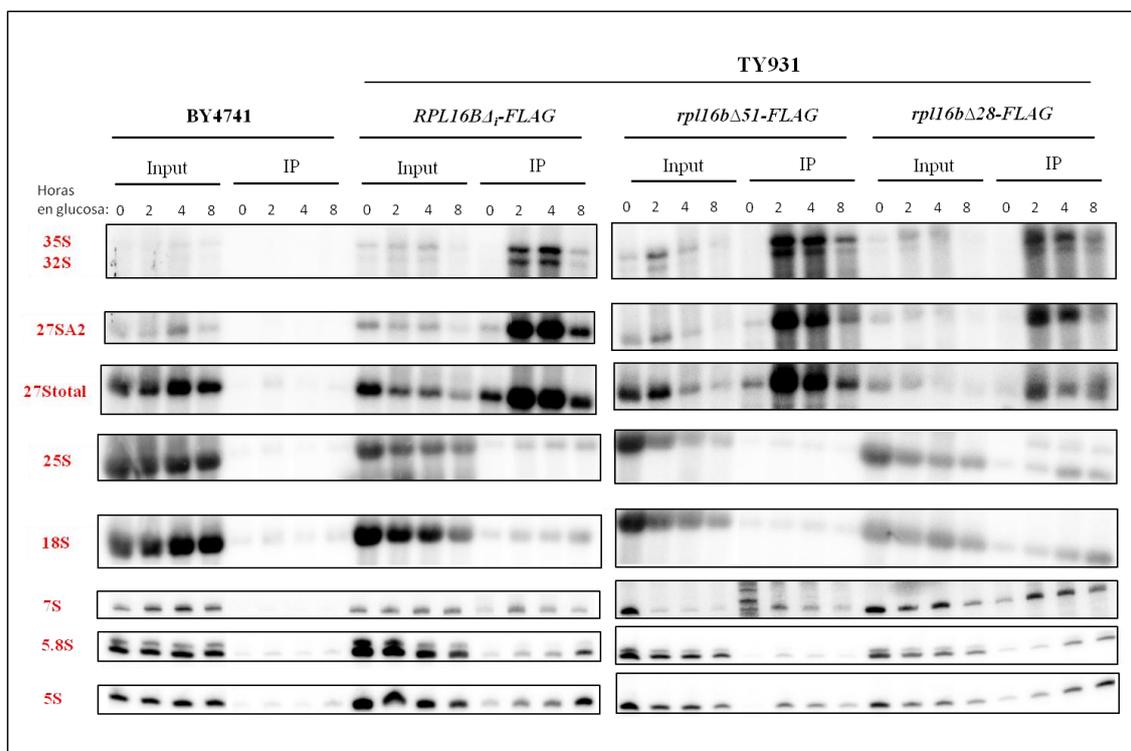


Figura 47. Análisis del ensamblaje de las proteínas mutantes L16B Δ CT en los pre-ribosomas 60S en cepas que portan diferentes alelos *RPL16B Δ* ; fusionados al epítipo FLAG. La cepa WT BY4741 y la cepa TY931 transformada con el alelo silvestre *RPL16B Δ* o los alelos *rpl16b Δ CT* fusionados al epítipo FLAG se cultivaron en medio SCGal-leu-ura hasta fase exponencial a 28°C y se transfirieron durante 2, 4 y 8 horas a YEPD. Se prepararon extractos celulares de los que una fracción se usó para extraer RNA total ("input") y otra se utilizó para inmunoprecipitar pre-ribosomas 60S con microesferas conjugadas con anticuerpo anti-FLAG, de las que se extajo el RNA que co-purifica con ellas ("IP"). Las distintas fracciones de RNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y formaldehído 4% y tras transferirlos a membranas de nylon se hibridaron con los mismos oligonucleótidos que en las figuras 23 y 25.

4. LA AUSENCIA DEL EXTREMO C-terminal DE L16 NO PROVOCA CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LAS PRE-PARTÍCULAS RIBOSÓMICAS

En trabajos previos se han utilizado con éxito aproximaciones de espectrometría de masas semicuantitativa para detectar cambios en la composición en los factores de biogénesis de ribosomas asociados temporalmente y/o en las RPs que componen las partículas pre-ribosómicas aisladas de cepas de levadura mutantes respecto a las silvestres (Ohmayer *et al.*,

Resultados

2013, Jakob *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2008; Merl *et al.*, 2010; Altvater M 2012). Una de estas técnicas de espectrometría de masas se denomina iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) y permite comparar la abundancia relativa de una proteína en dos muestras. Para ello las proteínas presentes en las dos muestras se digieren con tripsina y los péptidos resultantes se marcan con dos reactivos distintos según de que muestra procedan, para después ser separados e identificados por cromatografía HPLC asociada a un equipo MALDI TOF/TOF. Así, se puede comparar la abundancia relativa de una proteína en las dos muestras analizando la abundancia de los reactivos con los que se marcaron.

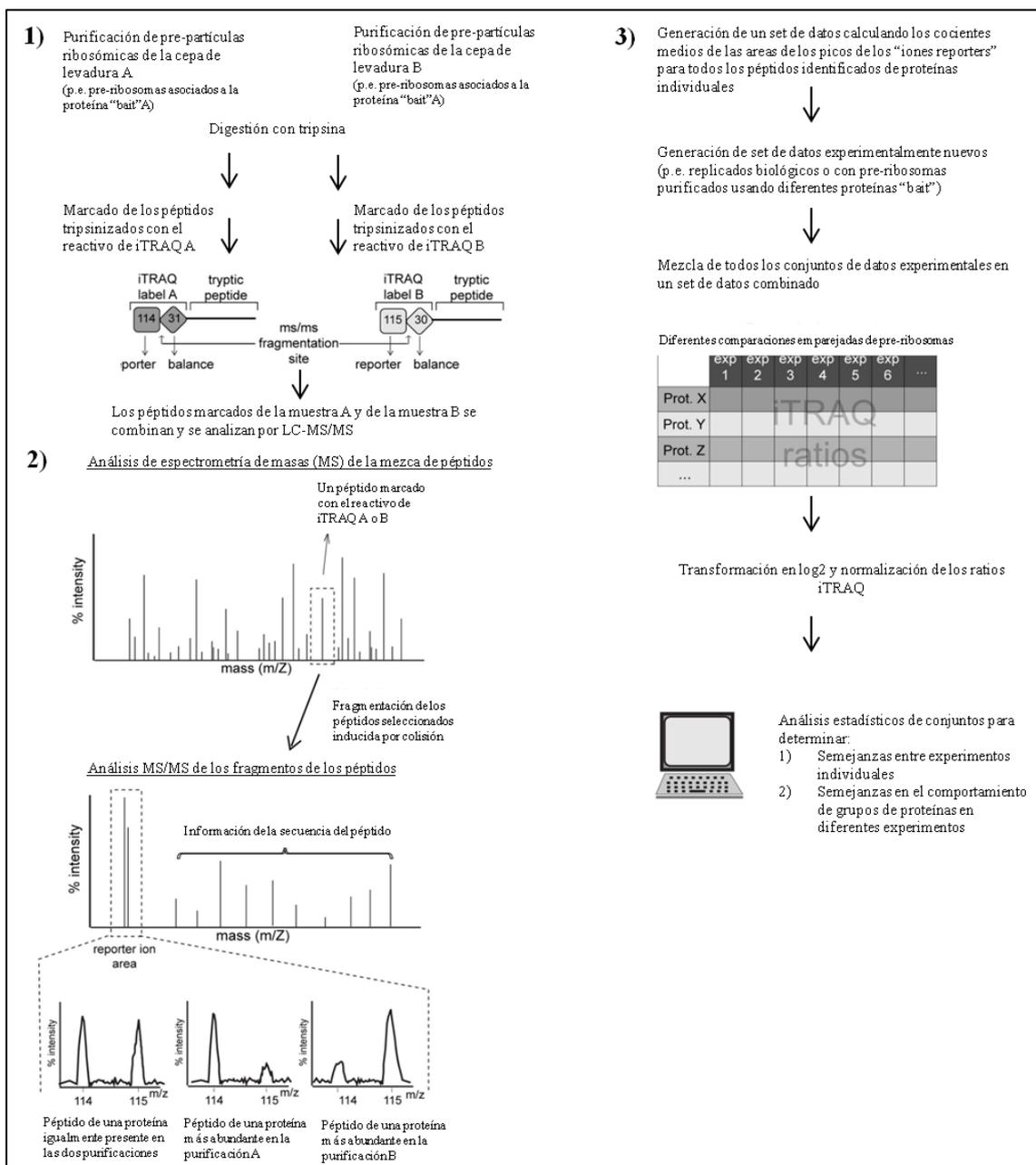


Figura 48. Representación esquemática de la aproximación utilizada para caracterizar la composición de las pre-partículas ribosómicas purificadas del mutante L16BΔ51 o de la cepa isogénica control. Resumen de las etapas

llevadas a cabo para purificar distintas pre-partículas ribosómicas y caracterizar su composición por LC-MS/MS (Adaptado de Ohmayer *et al.*, 2013).

Tras comprobar que las proteínas truncadas L16 Δ CT se incorporaban en pre-partículas ribosómicas, utilizamos la técnica del iTRAQ para analizar si la ausencia de la α -hélice C-terminal de L16 originaba cambios en la asociación de factores de biogénesis de ribosomas o en la incorporación o ensamblaje de otras proteínas ribosómicas en los pre-ribosomas. Para ello, se purificaron por afinidad pre-ribosomas 60S de la cepa TY931 transformada con los alelos silvestre o truncado *rpl16b Δ 51* y cultivadas en medio con glucosa, utilizando el factor de biogénesis Noc2 fusionado al epítipo TAP (ver Materiales y Métodos). Este epítipo se une a las moléculas de IgG conjugadas en micro-esferas magnéticas, permitiendo la inmunoprecipitación de las pre-partículas ribosómicas asociadas al factor de biogénesis Noc2. Se utilizó la proteína Noc2 porque es un factor que se asocia específicamente con pre-partículas 60S que se encuentran en las primeras etapas y en etapas intermedias de maduración en la biogénesis de ribosomas, ya que los mutantes de truncación mostraban defectos en el procesamiento temprano del pre-rRNA.

La cepa TY931-Noc2TAP transformada con los alelos silvestre o truncado *rpl16b Δ 51* se cultivó en SCGal-leu-ura hasta fase exponencial, se transfirió a YEPD durante 8h a 28°C y se prepararon extractos celulares a partir de los que se obtuvieron las diferentes pre-partículas ribosómicas. Posteriormente, los pre-ribosomas procedentes de las cepas que expresan la proteína silvestre y truncada se marcaron con los distintos reactivos del iTRAQ y se separaron por HPLC, identificándose posteriormente por espectrometría de masas su composición (Materiales y Métodos).

Al analizar los datos obtenidos del ensayo proteómico se observó que la proteína ribosómica que más disminuye en la cepa que expresa la proteína truncada L16 Δ 51 respecto a la que expresa la proteína silvestre es L16, lo cual sería un indicativo de que el ensayo se ha realizado correctamente. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas en las cantidades de los distintos factores de biogénesis o RPs que co-purifican con las partículas pre-ribosómicas unidas a Noc2 en ambas cepas. Las principales diferencias en la composición de las pre-partículas ribosómicas entre ambas cepas, son un ligero aumento en la cantidad de las RPs L27, L26 y L23, así como en la cantidad de los factores de biogénesis Mak5 y Rrp14 en la cepa que expresa la proteína truncada L16 Δ 51. También se observa en ellas un leve descenso en la cantidad de los factores de biogénesis Brx1 y Ssf1.

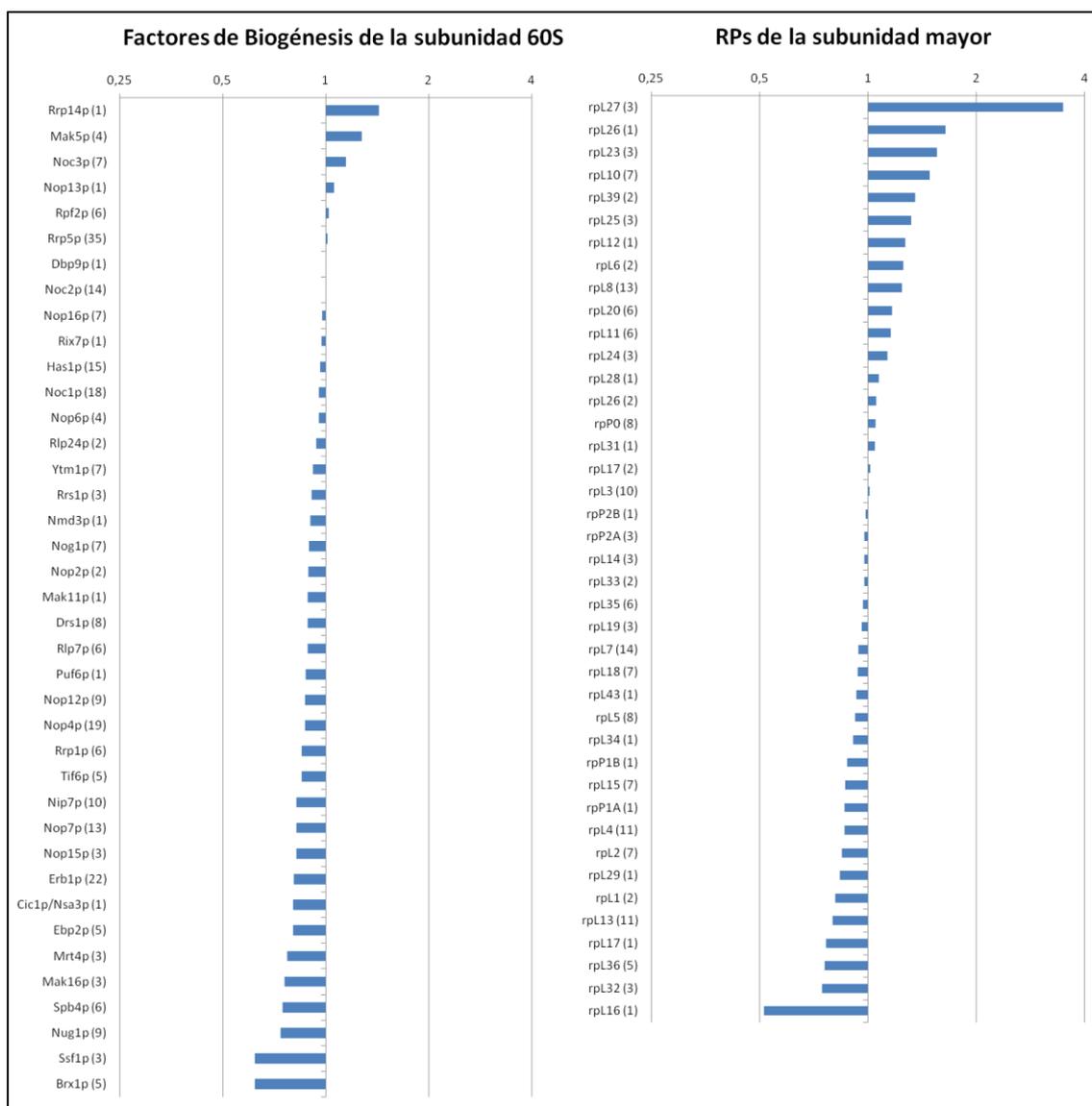


Figura 49. Análisis de la composición de las pre-ribosomas 60S purificados vía Noc2-TAP en el mutante L16 Δ 51 o en la cepa isogénica control. La cepa TY931-Noc2TAP transformada con los alelos silvestre o truncado *rpl16 Δ 51* se cultivó en medio SCGal-leu-ura hasta fase exponencial y se transfirió a YEPD durante 8 horas. Los pre-ribosomas 60S de ambas cepas unidos a Noc2-TAP se purificaron por afinidad usando microesferas magnéticas conjugadas a IgG y su composición se comparó por iTRAQ (Materiales y Métodos). Se representa la abundancia de distintos factores de biogénesis de la subunidad 60S y de distintas RPs en el mutante L16 Δ 51 frente a la cepa control. Entre paréntesis se recoge el número de péptidos de cada proteína identificados por el espectrómetro de masas.

5. AISLAMIENTO DE SUPRESORES DE DOSIS DE LAS MUTACIONES *rpl16 Δ ACT*

Una de las aproximaciones clásicas para detectar interacciones genéticas e identificar genes cuyos productos estén implicados en el mismo proceso celular, es la búsqueda de supresores de dosis, ya que el incremento de la dosis de un producto génico en la célula puede compensar el fenotipo mutante causado por una mutación en otro gen. Con este objetivo,

tratamos de encontrar algún supresor que corrigiera el fenotipo de letalidad de cepas que solamente expresan los alelos *rpl16bΔCT* desde plásmidos centroméricos y permitiera su crecimiento.

En primer lugar utilizamos los vectores con los alelos *rpl16bΔCT* fusionados al epítipo FLAG en un vector multicopia (pAGH6 y pAGH7) para determinar si un aumento en la cantidad de las proteínas truncadas podría suprimir la letalidad de los transformantes de la cepa TY931 en medio con glucosa. Encontramos que los transformantes con el plásmido multicopia con el alelo *rpl16Δ28-FLAG*, sí son capaces de crecer en un medio con glucosa, aunque tienen un acusado fenotipo de crecimiento lento. Para investigar si ese fenotipo se debería a la presencia del epítipo, construimos un alelo *rpl16Δ28* con sus regiones promotora y terminadora de la transcripción naturales y sin FLAG, lo clonamos en un vector de alto número de copias (pAGH9, *hc-rpl16bΔ28*) y observamos que el fenotipo de crecimiento lento de los transformantes correspondientes era idéntico al de aquellos con el plásmido pAGH7 (*hc-rpl16Δ28-FLAG*). Es decir, la expresión únicamente de un alelo *rpl16Δ28* clonado en un plásmido centromérico es letal, pero no lo es cuando se expresa desde un plásmido multicopia.

En la figura 50 se muestra el crecimiento lento en YEPD de transformantes de la cepa TY931 con el plásmido *hc-rpl16BΔ28*. También se muestra que, por el contrario, la sobreexpresión del alelo *rpl16Δ51* por sí solo en esa cepa y en medio con glucosa no es suficiente para sostener la viabilidad celular. Además, pudimos observar que el plásmido *hc-rpl16BΔ51* tiene un efecto más grave sobre el crecimiento de la cepa TY931 en medio con galactosa (en el que se sobreexpresa a la vez el alelo *pGal::RPL16BΔi*) que *rpl16Δ51* clonado en un plásmido centromérico (ver Figura 41) Este posible efecto de dominancia se trata en el siguiente apartado de la memoria.

Resultados

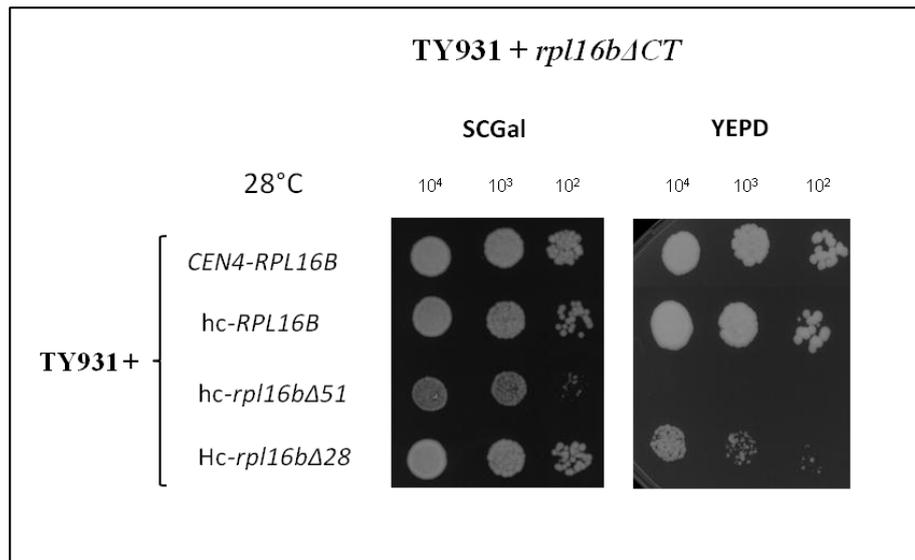


Figura 50. Fenotipo de crecimiento de la cepa TY931 transformada con los alelos *RPL16B* Δ , que se indican. La cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b pGAL::RPL16B\Delta_i$) transformada con vectores que permiten la sobreexpresión del alelo silvestre *RPL16B* Δ_i o los alelos *rpl16b*ΔCT se cultivaron en medio SCGal-leu-ura a 28°C hasta fase exponencial. Se hicieron diluciones seriadas que se aplicaron en placas de SCGal-leu-ura o en placas de YEPD que se incubaron a 28°C durante 3 días.

Para determinar cómo influye la sobreexpresión desde un plásmido en alto número de copias del alelo *rpl16b*Δ28 en la síntesis de la proteína L16BΔ28-FLAG, se transformó la cepa TY931 con un plásmido centromérico y uno multicopia que portaban el alelo *rpl16b*Δ28-FLAG (pAGH12 y pAGH13, respectivamente. Ver tabla II de los anexos). A continuación se prepararon extractos de las dos cepas resultantes en SCGal-leu-ura hasta fase exponencial y tras incubadas 8 horas en YEPD y se comparó la cantidad de proteína en cada situación por “western blot”. El resultado indica que, como se esperaba, al expresar el alelo desde un plásmido de alto número de copias aumenta notablemente la cantidad de proteína L16BΔ28. Por tanto, la ausencia de los últimos 28 aminoácidos de L16 sí permitiría que se produjese en cierta medida el procesamiento del extremo 5' del rRNA 5.8S, aunque de manera insuficiente para permitir la biogénesis de una cantidad de subunidades 60S maduras, necesarias para el crecimiento normal de la cepa, similar al de la cepa isogénica control. Así, al aumentar la cantidad de proteína truncada mejoraría el procesamiento de los precursores permitiendo alcanzar una cantidad de subunidades 60S maduras suficientes para conseguir la viabilidad celular.

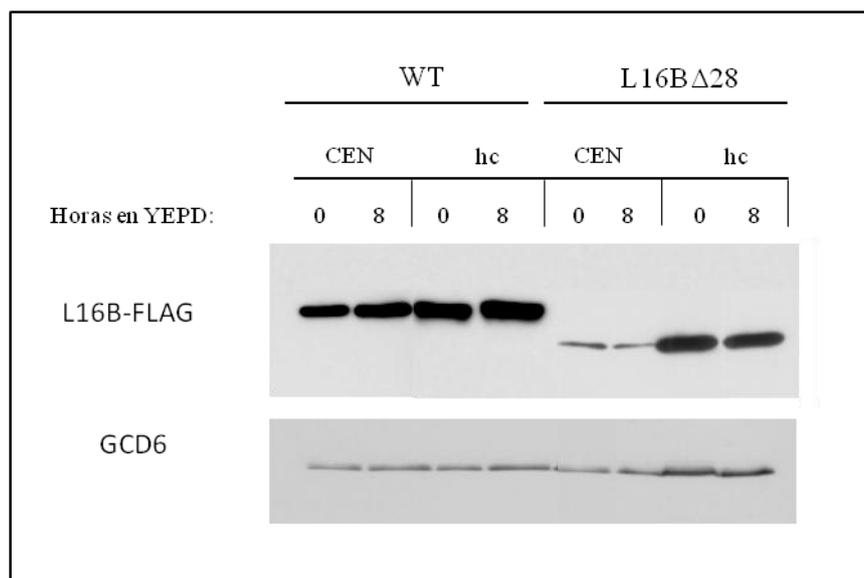


Figura 51. Análisis de la cantidad de proteína L16BΔ28 al sobreexpresar en la cepa TY931 el alelo *rpl16bΔ28*. La cepa TY931 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b pGAL::RPL16B\Delta_i$) se transformó con plásmidos centroméricos o multicopia con los alelos *RPL16BΔ_i-FLAG* o *rpl16bΔ28-FLAG*. Se prepararon extractos a partir de células cultivadas en SCGal-leu-ura a 28°C y durante 8 horas en YEPD a 28°C hasta una O.D~0.8. Estos extractos se analizaron mediante "western blot" utilizando anticuerpos anti-FLAG y anti-GCD6 que sirvió como control de carga.

Al constatar que el alelo *rpl16Δ28* clonado en un plásmido multicopia permitía el crecimiento celular de una cepa $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$, decidimos usar una cepa que expresa sólo el alelo de truncación en ausencia del alelo *pGAL::RPL16BΔ_i*, para intentar seleccionar de supresores de dosis. Esta cepa Hm717 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b, hc-rpl16\Delta28$) ahora es viable, pero presenta un crecimiento lento muy severo, por lo que se podría detectar fácilmente la supresión de este fenotipo.

La primera estrategia que se consideró utilizar para aislar supresores de dosis fue transformar el mutante con genotecas construidas en vectores multicopia, seleccionando los transformantes que corrigieran el fenotipo *slg*. Sin embargo, cuando se aplicó esta estrategia en trabajos anteriores en el laboratorio (Tesis Pilar Martín Marcos) y se recuperaban los plásmidos que corregían ese fenotipo, siempre portaban un alelo silvestre del gen de interés o su parólogo. Por esta razón, desechamos emplear esta estrategia y decidimos transformar el mutante *rpl16Δ28* con plásmidos multicopia en los que están clonados genes que codifican factores de biogénesis de la subunidad 60S o proteínas implicadas en el inicio de la traducción. En la tabla 3 se recogen los genes con los que se transformó la cepa mutante.

Nombre del Gen	Descripción	
BRX1	Proteína con un motivo σ -70 de unión a RNA implicada en la biogénesis de subunidades	Kaser <i>et al.</i> 2001
SSF1	Proteína nuclear implicada en el procesamiento del pre-rRNA 27SA ₂	Fatica <i>et al.</i> 2002
MAK16	Componente de las pre-partículas ribosómicas 60S que interviene en la maduración de los rRNAs 25S y 5.8S	Pellett S and Tracy JW 2006
MAK5	RNA helicasa de la familia DEAD-box implicada en la biogénesis de subunidades 60S	Zagulski <i>et al.</i> , 2003
EBP2	Se requiere para la maduración del rRNA 25S y para el ensamblaje de subunidades 60S	Wan <i>et al.</i> , 2015
RRP14	Ribosomal RNA Processing. Proteína implicada en la biogénesis de ribosomas	Oeffinger <i>et al.</i> 2007
NOP7	Factor de biogénesis requerido para el procesamiento del 27SA3. Interacciona funcionalmente con Drs1	Adams <i>et al.</i> 2002
DRS1	RNA helicasa de la familia DEAD-box que participa en el procesamiento de los pre-rRNAs 27SB	Ripmaster <i>et al.</i> , 1992
DBP6	RNA helicasa de la familia DEAD-box implicada en la biogénesis de subunidades 60S	Kressler <i>et al.</i> 1998
SPB4	RNA helicasa de la familia DEAD-box. Necesaria para el procesamiento de los pre-rRNAs 27SB	De la Cruz <i>et al.</i> 1998b
DOB1	RNA helicasa dependiente de ATP de la familia DExD/H que se requiere para la formación del extremo 3' del rRNA 5.8S	De la Cruz <i>et al.</i> 1998a
DED1	RNA helicasa dependiente de ATP de la familia DEAD box con una función esencial en el inicio de la traducción	Iost <i>et al.</i> 1998
NUG1	GTPasa asociada a pre-ribosomas 60S que se requiere para su exporte al citoplasma	Bassler <i>et al.</i> , 2001
NSA2	Factor de biogénesis que participa en el procesamiento de los precursores 27S	Lebreton <i>et al.</i> , 2006
FUN12	Factor de inicio de la traducción eIF5B que promueve la unión de subunidades ribosómicas 40S y 60S	Choi <i>et al.</i> 1998
PAB1	Proteína de unión a las colas de polyA esencial para la estabilidad de los mRNAs en el inicio de la traducción	Sachs <i>et al.</i> 1987
CT	Complejo ternario formado por eIF2-GTP-tRNA _i ^{Met}	Benne y Hershey. 1978

Tabla 3. Descripción de los factores de biogénesis de la subunidad 60S y de los componentes de la maquinaria traduccional que se sobreexpresaron en el mutante *rpl16bΔ28* en tratando de aislar supresores de dosis.

Se decidió clonar y sobreexpresar el gen *MAK5* porque en un estudio anterior (Pratte *et al.*, 2013) se observó que una serie de factores de biogénesis que interaccionan física o genéticamente con él forman un “cluster” que está implicado en los reordenamientos que tienen lugar en una región específicamente eucariota de la subunidad 60S compuesta por las proteínas L6, L14 y L16 y los segmentos de expansión del rRNA ES7L y ES39L. Por tanto, aunque en

nuestros ensayos de espectrometría de masas Mak5 aumentaba cuando estaba ausente el extremo C-terminal L16, decidimos comprobar su posible interacción con L16 en la organización de esa región de los pre-ribosomas. También sobreexpresamos el gen que codifica **Ebp2** porque interacciona físicamente con Mak5 (Wan *et al.*, 2015), así como los genes que codifican los factores de biogénesis cuya cantidad disminuía más en la cepa que expresa el alelo *rpl16bΔ51*, **Brx1**, **Ssf1**, **Nug1** y **Spb4**. El resto de los genes analizados como posibles supresores de dosis del fenotipo de crecimiento lento de la cepa que expresa el alelo *rpl16Δ28*, codifican otros factores de biogénesis como **Nop7** (Adams *et al.*, 2002), **Nsa2** (Lebreton *et al.*, 2006), **Mak16** (X 2001), o **Rrp14** (Oeffinger *et al.* 2007); o helicasas de la familia DEAD box dependientes de ATP que en estudios anteriores se demostró que estaban implicadas en la biogénesis de la subunidad 60S como **Dbp6** (De la Cruz *et al.*, 1998a) **Drs1** (Ripmaster *et al.*, 1992), **Ded1** (X 199X) o **Dob1** (De la Cruz *et al.*, 1998b). Algunos de estos factores como Drs1 o Nop7, se había comprobado previamente que suprimían el fenotipo de crecimiento lento de mutaciones en otras RPs (Martín-Marcos *et al.*, 2007). Finalmente, también se sobreexpresaron el factor de inicio de traducción eIF5B, porque se había demostrado que corregía el fenotipo *slg* de mutantes de delección que carecen del extremo C-terminal de la proteína L19e (Tesis Ana Jiménez); la proteína PAB1 (“PolyA-Binding protein”), porque suprime parcialmente el fenotipo de crecimiento lento de mutantes en los que está alterada la proteína ribosómica L33; y el complejo ternario, porque suprime parcialmente el fenotipo Gcd⁻ de los mismos mutantes (Martín-Marcos *et al.*, 2007).

Como se aprecia en la figura 52, ninguno de los genes analizados suprime el fenotipo de crecimiento lento de la cepa Hm717 (*Δrpl16a Δrpl16b, hc-rpl16bΔ28*).

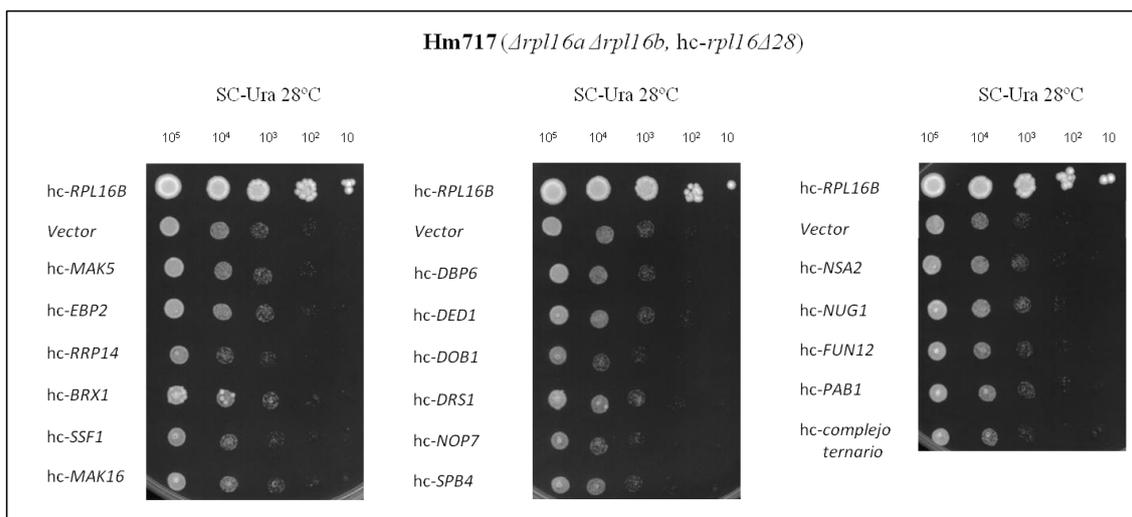


Figura 52. Sobreexpresión de diferentes factores de biogénesis de la subunidad 60S y componentes de la maquinaria traduccional en la cepa Hm717. La cepa Hm717 ($\Delta rpl16a \Delta rpl16b$, $hc-rpl16\Delta28$) se transformó con los genes que se recogen en la tabla 2 clonados en vectores de alto número de copia o con el vector vacío. Los distintos transformantes se cultivaron a 28°C hasta fase exponencial en medio SC-ura y posteriormente se hicieron diluciones seriadas que se aplicaron en placas de SC-ura que se incubaron a 28°C durante 3 días.

6. DOMINANCIA NEGATIVA DE LOS ALELOS *rpl16bΔCT* CUANDO SE SOBREEXPRESAN

Como se ha mencionado anteriormente, parece que la sobreexpresión del alelo *rpl16bΔ51* podría tener un efecto perjudicial para el crecimiento en presencia de la proteína silvestre L16B (Figura 50). Para comprobarlo, se transformó con los alelos *rpl16bΔCT* una cepa $\Delta rpl16a$ y también la cepa silvestre BY4741, que tiene los dos parálogos genómicos de *RPL16*, para analizar la posible dominancia de los alelos truncados.

Como se observa en la figura X, la sobreexpresión de los alelos *rpl16bΔCT* afecta negativamente al crecimiento de la cepa $\Delta rpl16a$ y de la cepa silvestre BY4741 tanto a 28°C como a 37°C, aunque este efecto es más acusado cuando sólo existe un parólogo *RPL16B* y a 37°C. Además la sobreexpresión del alelo *rpl16bΔ51* causa una reducción en el crecimiento mayor que la del alelo *rpl16bΔ28* en todas las condiciones. Por tanto los alelos de truncación *rpl16bΔCT* serían dominantes respecto de los alelos *RPL16A* y *RPL16B*.

Por tanto los alelos de truncación *rpl16bΔCT* serían dominantes, ya que clonados en plásmidos de alto número de copias causan crecimiento lento (i) en presencia de *RPL16A* y *RPL16B* en el genoma, (ii) en presencia de *RPL16B* únicamente en la cepa *rpl16a*, (iii) e incluso cuando hay un exceso de proteína silvestre L16B, en transformantes de fondo genético $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ que llevan también el alelo condicional *pGAL::RPL16BΔi* y esto se observa en medio con galactosa (Figura 50).

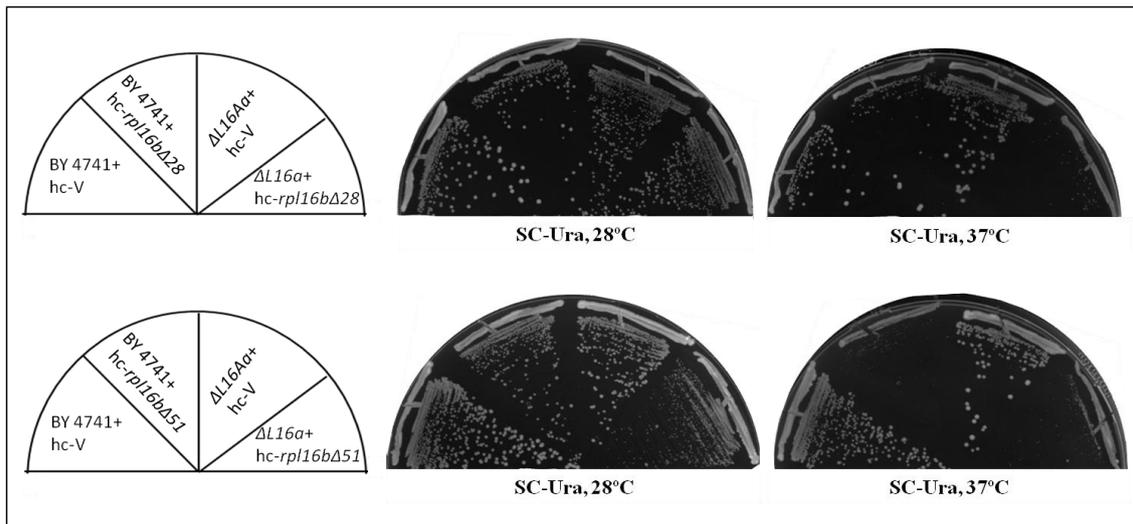


Figura 53. Fenotipo de crecimiento de las cepas $\Delta rpl16a$ y BY4741 cuando se sobreexpresa en ellas los alelos *rpl16b Δ CT*. Se hicieron estrías de las cepas indicadas transformadas con los alelos *rpl16b Δ CT* o con el vector episómico vacío *YEplac181* (*hc-V*) según se recoge en los esquemas de la izquierda de la figura en placas de SC-ura que se incubaron durante 2 días a 28°C o a 37°C.

Discusión

En este trabajo se han investigado las funciones esenciales de la proteína ribosómica L16 en la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S y en la traducción por el ribosoma maduro en *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, se realizó un análisis mutacional del gen *RPL16B* que permitiera correlacionar los rasgos fenotípicos de mutantes de pérdida parcial de función de L16 con los cambios que provocarían las respectivas mutaciones en la secuencia de aminoácidos o en la estructura de la proteína, para predecir qué interacciones con los rRNAs o con otras proteínas ribosómicas podrían resultar alteradas en la subunidad 60S. Además, también se generaron dos mutantes de truncación que permitieran analizar el papel de la larga hélice C-terminal exclusivamente eucariota de L16.

Interpretación de las consecuencias fenotípicas de las mutaciones *rpl16b* Δ CT y *rpl16b**

L16 es una proteína esencial que está muy conservada evolutivamente en bacterias, arqueobacterias y eucariotas y que se localiza en la subunidad 60S de *S. cerevisiae* junto al segmento de expansión del rRNA ES39, entre el dominio II y el dominio VI del rRNA 25S, contactando con las RPs L14, L33 y L20. La estructura tridimensional de L16 consta de dos regiones bien diferenciadas: un dominio globular conservado evolutivamente de bacterias a eucariotas, formado por el plegamiento de varias α -hélices y láminas- β unidas por regiones no estructuradas y por giros; y una larga hélice C-terminal que se pliega sobre sí misma para formar una especie de gancho y que únicamente posee la versión eucariota de la proteína.

En colaboración con el grupo del Dr. Philipp Milkereit de la Universidad de Regensburg, hemos analizado cómo afecta el ensamblaje de un conjunto de RPs que se unen al dominio II del rRNA 25S y al ES7 adyacente a él, en la composición de los disitntos pre-ribosomas 60S. Entre estas proteínas se encuentran. El ensamblaje del dominio II del rRNA 25S tiene un gran impacto en las interacciones transitorias de factores de biogénesis específicos de la subunidad mayor y el reclutamiento eficiente de otras RPs a las pre-partículas 60S (Ohmayer *et al.*, 2015). Las interacciones entre todos esos elementos conducirían a un estado de plegamiento concreto dentro de la región 5' del pre-rRNA de la subunidad 60S que va a ser funcionalmente importante en las primeras etapas de maduración de dicha subunidad, al promover el procesamiento exonucleolítico del extremo 5' del rRNA 5.8S. Durante el ensamblaje del dominio II, L16 y su extremo C-terminal desempeñan un papel fundamental al organizar una agrupación o cluster (cluster dII/dVI) junto con L14, L33, L20 y L6, que permite establecer numerosos contactos entre el dominio II, el ES7 y el dominio VI, incluyendo el ES39. El extremo C-terminal de L16 al plegarse en su parte central, anclaría el dominio VI al dominio II y al ES7 favoreciendo un plegamiento que protegería el extremo 5' del rRNA 5.8S como una tapadera, dificultando el acceso de exonucleasas y regulando así su correcto procesamiento

Discusión

exonucleolítico en el momento adecuado. Es posible que el extremo c-terminal de L14 establezca interacciones sinérgicas con las funciones del extremo c-terminal de L16 en este proceso.

Experimentos realizados en este trabajo de investigación, demuestran que efectivamente el extremo C-terminal de L16 es crucial para el correcto procesamiento del extremo 5' de los pre-rRNA 27S. Sin embargo, la deleción de los últimos 19 aminoácidos de la proteína no tiene consecuencias fenotípicas aparentes sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*, a pesar de que predeciblemente afectaría a la interacción con el extremo C-terminal de L14 en la estructura de la subunidad 60S. Estos resultados permiten proponer que las numerosas y fuertes interacciones moleculares que ocurrirían entre las RPs del cluster dII/dVI con esos dominios del rRNA, determinarían que parte de la α -hélice C-terminal de L16 fuese dispensable para el establecimiento y formación del cluster.

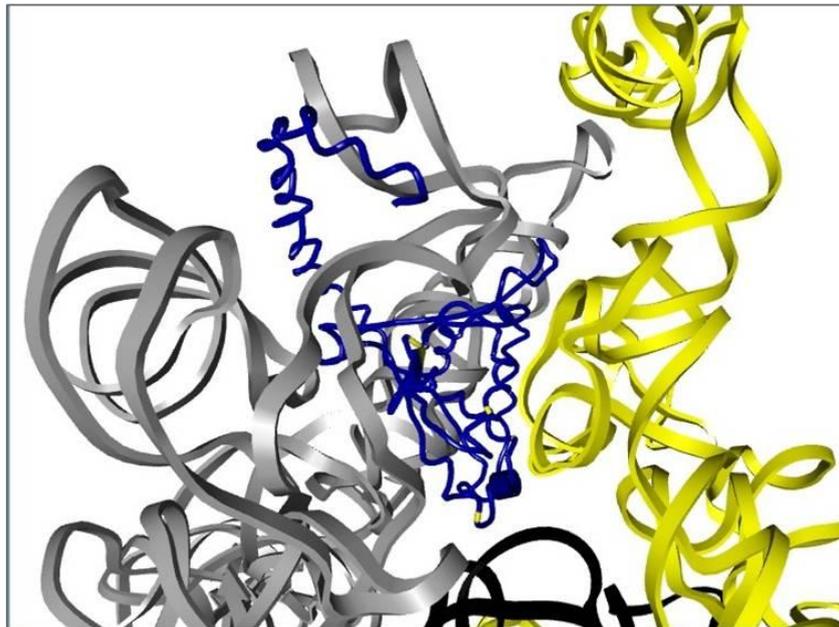
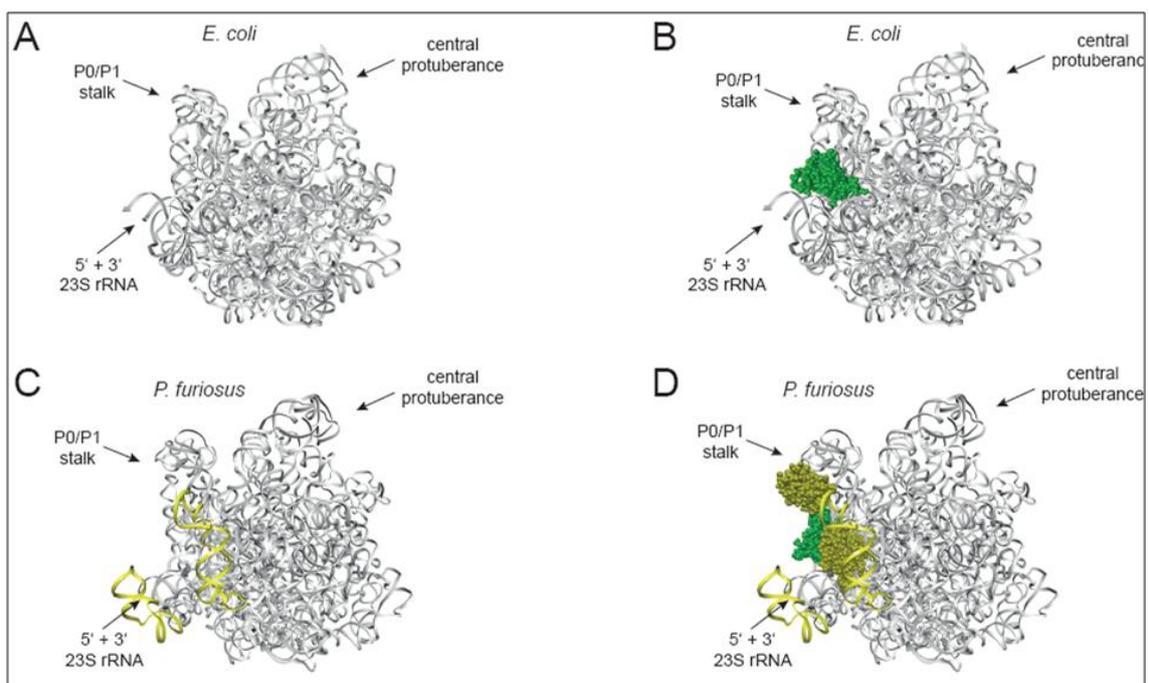


Figura 54. Representación de las interacciones de L16 con los dominios I, II y VI del rRNA 25S de *S. cerevisiae*. Se representa en azul la estructura terciaria de L16 indicándose en amarillo los aminoácidos mutados, en negro la estructura terciaria del dominio I del rRNA 25S, en amarillo la del dominio II y en gris la el dominio VI.

De todos los componentes del cluster dII/dVI, únicamente el dominio N-terminal de L16 se encuentra conservada en el ribosoma de bacterias. De igual forma, los segmentos de expansión ES7 y ES39 no tienen homólogo en el rRNA 23S bacteriano. Esto determina que la organización estructural del extremo 5' del rRNA de la subunidad 50S en bacterias difiera de la del rRNA de eucariotas. Así, los extremos 5' y 3' del 23S interaccionan de manera que la hélice resultante, quedaría bastante expuesta al lado del solvente al no existir un dominio VI en el rRNA que la cubra (Ver estructura del ribosoma de *E. coli* en la figura 55). En algunas

arqueobacterias la situación parece ser intermedia, debido a la existencia de los segmentos de expansión ES7 y ES39 y las proteínas homólogas de L14 y L33 de eucariotas. Sin embargo, en la estructura correspondiente de la subunidad 50S de arqueobacterias, apenas se establecen contactos entre los dominios II y VI que sean mediados por las RPs, por lo que el emparejamiento del extremo 5' del rRNA se parece bastante al de *E. coli* (Figura 55). En cambio, todas las proteínas que forman el cluster dII/dVI en levaduras están conservadas en otros eucariotas y los modelos estructurales actuales del ribosoma sugieren que la organización estructural entre los dominios II y VI y las regiones conservadas de ES7 y ES39 es muy similar en levaduras y mamíferos. Por tanto, los contactos mediados por RPs entre los dominios II y VI del rRNA aumentan notablemente desde bacterias a eucariotas gracias a la adición evolutiva de elementos relevantes en el rRNA y en las RPs, permitiendo una reorganización estructural alrededor del extremo 5' del rRNA de la subunidad 60S, que comprende el rRNA 5.8S ausente en bacterias. No obstante, experimentos en los que se inhibe la síntesis de L13a, la proteína ortóloga de L16 en células humanas, indican que no es esencial para la viabilidad celular, por lo que la función propuesta para el extremo C-terminal de L16 en la formación de la subunidad 60S de *S. cerevisiae* no estaría conservada en mamíferos (Chaudhuri *et al.*, 2007). Por otra parte, existen datos experimentales que sugieren una función de los homólogos de L14 y L33 en la formación del cluster dII/dVI en mamíferos, que sería un prerrequisito para la estabilización y el procesamiento eficiente de los precursores tempranos de la subunidad 60S (Xiang *et al.*, 2009).



Discusión

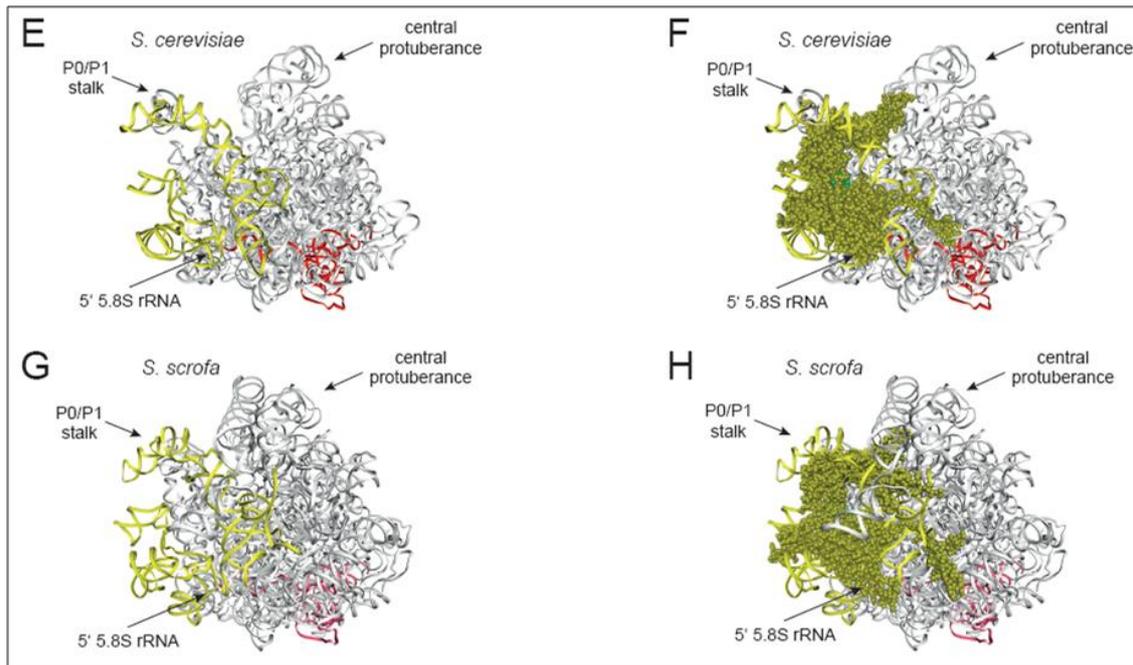


Figura 55. Representación de las interacciones entre los dominios II y VI del rRNA 25S y de la posición del extremo 5' del mismo en la subunidad mayor del ribosoma bacteriano, de arqueas o eucariota. Se representan los modelos de la subunidad mayor del ribosoma de *Escherichia coli* en A) y B), de la arquea *Pyrococcus furiosus* en C) y D) y de dos eucariotas, *Saccharomyces cerevisiae* en E) y F) y *Sus scrofa* en G) y H). Los segmentos de expansión ES7 y ES39 del rRNA 25S y las RPs que forman el cluster dII/dVI están indicados en amarillo, excepto el dominio globular de L16 conservado en todas las especies que está en verde. El rRNA 5.8S se indica en rojo y el resto del rRNA en gris. En A), C), E) y G) solo se muestra rRNA y en B), D), F) y H) las RPs del cluster dII/dVI son las únicas RPs representadas.

Al analizar en la estructura de la proteína la localización de los aminoácidos que resultan sustituidos como consecuencia de las mutaciones analizadas en este trabajo, observamos que se encuentran en regiones muy conservadas evolutivamente. Las sustituciones I8N, A23D y A37D podrían afectar al plegamiento de la región globular de L16B, al localizarse respectivamente en una lámina- β , una α -hélice y en un giro de la estructura secundaria. Por el contrario, las sustituciones M86V y R93H podrían modificar interacciones con el rRNA 25S, al encontrarse estos aminoácidos próximos a los nucleótidos C1176, G1313 y G1177 del dominio II y a los nucleótidos U631 y A3172 de los dominios I y VI.

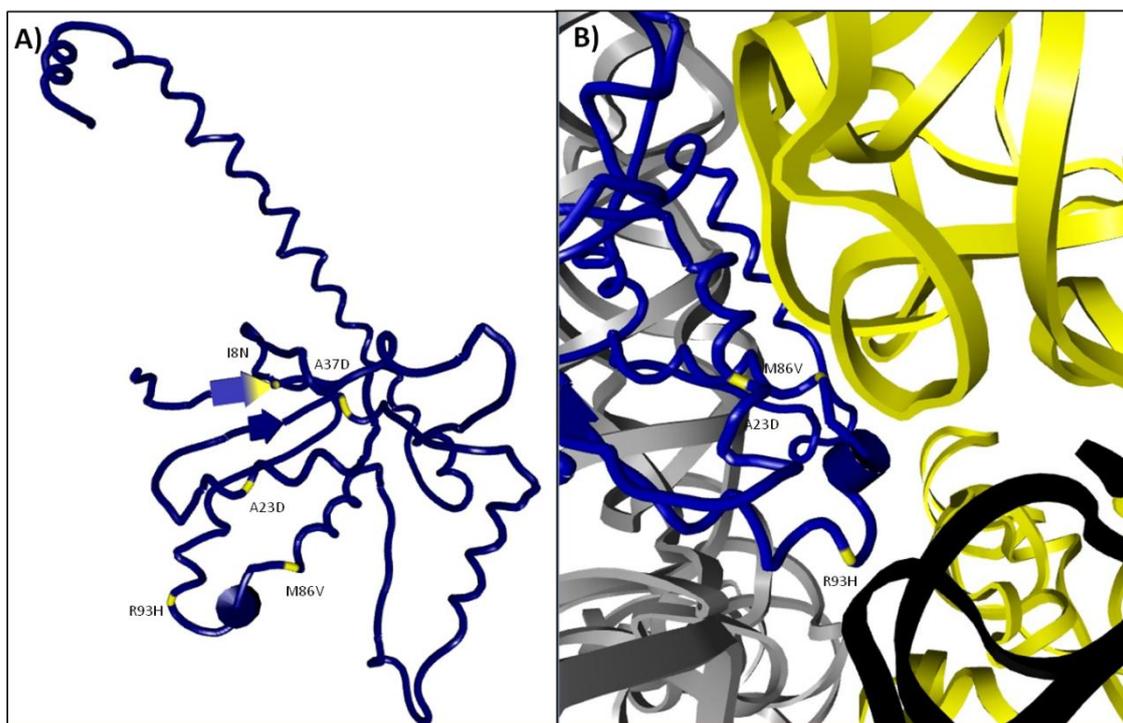


Figura 56. Localización en la estructura terciaria de L16 de los residuos sustituidos en los mutantes y representación de sus posibles interacciones con los dominios I, II y VI del rRNA 25S. A) Se representa en azul la estructura terciaria de L16 indicándose en amarillo la posición de los aminoácidos sustituidos. B) Se señalan en la estructura de L16 (azul) la posición de los aminoácidos sustituidos que modifican interacciones con el dominio I del rRNA 25S (negro), el dominio II (amarillo) o el dominio VI (gris).

Al realizar la mutagénesis aleatoria se identificaron también sustituciones en regiones muy conservadas de la proteína y en residuos que interactúan con el rRNA 25S, sin que esto causara fenotipo de crecimiento lento. Así, el cambio de otros aminoácidos conservados como la Arg17 o Gln25, o sustituciones como K114M, G131D o W146R que modificarían interacciones con el dominio VI del rRNA 25S, ya que suponen cambios en el tamaño de los aminoácidos y en las cargas electrostáticas, no tienen aparentemente consecuencias fenotípicas para una cepa *Arp116a Arp116b*. De hecho, el cambio R93H que agrava el fenotipo del mutante I8N, no causa apenas crecimiento lento por sí solo, a pesar de que podría debilitar la interacción con el rRNA 25S. Lo mismo ocurre en el caso de la mutación G85R, que afecta al residuo principal de L16 en su interacción con el rRNA 23S en *Haloarcula marismortui* (Klein *et al.*, 2004) y que está conservado en *S. cerevisiae*. Aunque al introducir una carga positiva la proteína interactúa más fuertemente con el dominio II del rRNA 25S, este cambio no es suficiente para conferir un fenotipo de crecimiento lento.

También se seleccionaron mutantes con sustituciones de aminoácidos que modificarían interacciones con otras RPs, según se predice de la estructura de la subunidad 60S. Entre otras, las sustituciones Q25R o N28K, que afectarían a los contactos de L16 con L20 y L33

Discusión

respectivamente, no causan un fenotipo de crecimiento lento que sugiera defectos en procesos celulares esenciales, como la traducción o la biogénesis de ribosomas. Por tanto, o bien el aminoácido que reemplaza al original no causa una alteración importante en la estructura o la funcionalidad de la proteína L16, o que aún así, esas sustituciones no producen una gran distorsión ni en la biogénesis ni en la estabilidad de la subunidad 60S.

Durante el desarrollo de este trabajo, el grupo del Dr. Mazumder identificó dos aminoácidos en L13a, la proteína ortóloga humana de L16, que son esenciales para la incorporación de la misma en los pre-ribosomas 90S (Das *et al.*, 2013). Así, al introducir las sustituciones R68A y S77D en L13A no se detectó la proteína en pre-ribosomas 90S, ni el rRNA 28S en inmunoprecipitados de ribosomas totales. La Ser77 se fosforila en monocitos humanos en respuesta a IFN- γ , e inhibe la traducción de los mRNAs con elementos GAIT en su secuencia. Cuando se sustituye por aspártico se crea un mutante fosfomimético de la proteína que no se incorpora en pre-ribosomas. En *S. cerevisiae* la Ser77 no se fosforila (*Sacharomyces Genome Database*) y a la proteína L16 no se le ha asignado ninguna función extra-ribosómica, como ocurre con su ortóloga humana, por lo que la sustitución S77D no tendría las consecuencias que se observan en monocitos. De hecho, al introducir la sustitución S77D en L16B, no se observó ningún fenotipo detectable, a pesar de haber introducido una carga negativa que podría modificar las interacciones electrostáticas de L16B con el rRNA 25S. Tampoco se parecía ningún fenotipo al introducir la sustitución R68A en L16B. La Arg68 interactúa con el nucleótido C2988 del rRNA 25S de *S. cerevisiae* (Ben-Shem *et al.*, 2010) y la eliminación de la carga positiva de este residuo podría afectar a la interacción con el rRNA 25S, constituyendo otro ejemplo de cambio en L16B que origina una distorsión en esa zona de la subunidad 60S, sin consecuencias fenotípicas detectables. Por tanto, parece que la región de la subunidad 60S en la que se localiza el segmento de expansión ES39L es susceptible de tolerar varios cambios en la proteína L16B.

Todos los mutantes analizados en esta memoria expresan proteínas L16B* a partir de alelos *rpl16b Δ* _i carentes de intrón. En *S. cerevisiae*, se ha descrito que intrones de los genes *RPG* de las RP pueden contribuir a su regulación transcripcional en determinadas condiciones, e incluso influir en la expresión del otro gen parálogo (Meyer y Vilardell, 2009; Bergkessel *et al.*, 2011; Parenteau *et al.*, 2011; Plocik y Guthrie, 2012). Sin embargo, en el caso de *RPL16B*, parece que su intrón no tiene ningún tipo de papel regulador en la expresión del gen (Parenteau *et al.*, 2011). Además, en este trabajo se comparan los datos de los mutantes *rpl16b Δ* _i con los obtenidos para la cepa isogénica control *RPL16B Δ* _i, estando los genes clonados en un vector idéntico y la ORF flanqueada por las mismas secuencias en ambos extremos. Por tanto, la

ausencia de intrón no contribuiría en modo alguno a las diferencias fenotípicas entre los mutantes y la cepa control.

Cuando analizamos la expresión de las proteínas mutantes L16B*-FLAG mediante ensayos de “western blot”, las cantidades de las mismas en las cepas mutantes *rpl16bΔ_i** correspondientes son similares a la de la cepa isogénica control, tanto a 28°C como a 37°C, de lo que se deduce que las mutaciones *rpl16bΔ_i** no parecen afectar a la cantidad ni a la estabilidad de las proteínas que codifican (Figura 27). Por el contrario, la cantidad de las proteínas truncadas L16BΔCT en los mutantes *rpl16bΔCT* es menor que la detectada en la cepa isogénica control (Figura 43). Incluso al sobreexpresar los alelos de *rpl16bΔCT* clonados en un plásmido de alto número de copias, las proteínas truncadas son también menos abundantes que la sintetizada a partir del alelo *RPL16B_i* en la cepa control (Figura 51). Esto podría deberse a que la enorme reducción de subunidades 60S que muestran los mutantes de truncación, conduzca a un importante descenso de la traducción general de mRNAs, que también afectaría a la de los propios mensajeros que codifican las proteínas truncadas. Los mRNAs de las RPs se traducen de forma muy activa, por lo que su propia traducción debe reducirse notablemente en cepas que tienen defectos traduccionales debido a la falta de ribosomas funcionales suficientes. Así, se ha descrito en un mutante de levadura que expresa una proteína ribosómica S31 que carece del residuo de ubiquitina en su extremo N-terminal y que tiene defectos en traducción y biogénesis de ribosomas, también desciende notablemente la cantidad de proteínas S31 y S8 (Lacombe *et al.*, 2009).

Por otra parte, los mRNAs transcritos a partir de los alelos *rpl16bΔCT* tienen codones de terminación de la traducción prematuros (PTCs) que podrían ser reconocidos para su degradación por la ruta NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) (Peltz *et al.*, 1994). En los mRNAs con PTCs aumenta la distancia entre el nuevo codón de terminación de la traducción y la secuencia de poliadenilación, por lo que disminuye la interacción entre PAB1 (*poly-A binding protein*) y el factor de terminación de la traducción eRF3, que interactúa con UPF1 (Shoemaker y Green, 2012). No obstante, cuando clonamos las ORFs de estos alelos *rpl16bΔCT* con el nuevo codón sin sentido seguido inmediatamente de la secuencia 3'UTR de la ORF de *RPL16B*, de manera que la distancia al sitio de poliadenilación es la misma que en un alelo silvestre, también detectamos una menor cantidad de las proteínas mutantes truncadas, por lo que parece menos probable que la reducción en la cantidad de proteína mutante se deba a la degradación por NMD.

En cualquier caso, el defecto en el procesamiento del extremo 5' del rRNA 5.8S en los mutantes *rpl16bΔCT* no se debería estrictamente a la falta de suficiente proteína L16BΔCT, porque cuando se expresan los alelos de truncación desde un plásmido en alto número de copias

Discusión

(Figura 47), consiguiéndose niveles de proteína similares a los presentes en la cepa control, también se detecta menor cantidad de los precursores 27S y 7S. Sin embargo, dado que la sobreexpresión del alelo mutante *rpl16bΔ28* es viable, si es posible que el problema en el procesamiento del extremo 5' del 5.8S se vea agravado como consecuencia de una menor cantidad de proteína truncada, ya que esa misma mutación es letal cuando la proteína se sintetiza a partir de ese alelo *rpl16bΔ28* clonado en un plásmido centromérico.

Defectos en el inicio de la traducción en los mutantes *rpl16bΔCT* y *rpl16bΔ_i**

El análisis de los perfiles de polisomas de los cinco mutantes *rpl16bΔ_i** revela que tienen graves defectos en el inicio general de la traducción, lo cual concuerda con su mayor sensibilidad a varios antibióticos que la inhiben en eucariotas. En los perfiles de todos los mutantes se observa la presencia de *halfmers* que representan complejos de preiniciación 43S unidos al mRNA sin que se hayan unido a ellos subunidades 60S para comenzar a traducir (Helser *et al.*, 1981), tanto a 28°C como a 37°C. La cantidad de subunidades 60S libres, monosomas (80S) y polisomas disminuye progresivamente durante la incubación a 37°C, a la vez que la cantidad de subunidades 40S libres aumenta con respecto a la cepa control (Figura 19). Como consecuencia, disminuyen progresivamente los cocientes 60S/40S y polisomas/monosomas a medida que las células mutantes se cultivan a 37°C (Figura 20-21). Estos perfiles son similares a los de otros mutantes de RPs de la subunidad mayor como L33, L2 y L10 (Martín-Marcos *et al.*, 2007; Meskauskas *et al.*, 2008; Petrov *et al.*, 2008).

Sin embargo el perfil de polisomas de M86V es algo diferente al del resto de mutantes. En este caso, los *halfmers* son menos abundantes, pues es menos acusada tanto la disminución en la cantidad de subunidades 60S como la acumulación de subunidades 40S, por lo que el cociente entre ambas subunidades no se reduce tan drásticamente como en el resto de mutantes a 37°C. Además, se observa en los perfiles de este mutante una gran acumulación de monosomas 80S con sólo una ligera reducción del tamaño y cantidad de los polisomas, lo que indica un claro defecto en iniciación, y es la razón de que también disminuya drásticamente el cociente polisomas/monosomas a medida que aumenta el tiempo de incubación a 37°C (Figura 19-21). Por tanto, en M86V podría haber además un defecto en los últimos pasos de la iniciación de la traducción, tras la unión entre ambas subunidades, que causaría el aumento de monosomas 80S. Este defecto en el inicio de la traducción también se aprecia en la disminución de la actividad β-galactosidasa procedente del transcrito de fusión *HIS4-LacZ* cuando se cultivan las células a 37°C (Figura 38). Cuando se ensaya en el mutante M86V la síntesis de esta proteína de fusión con un codón de inicio AUG a 37°C, se observa que se reduce hasta un 80% en relación con la cepa control.

En trabajos anteriores en el laboratorio se había observado que la sobreexpresión del factor de inicio de la traducción eIF5B suprimía el fenotipo *slg* de mutantes de *S. cerevisiae* que carecen del extremo C-terminal de la proteína L19e (Tesis Ana Jiménez). Esto se debería a que la GTPasa eIF5B interviene en el citoplasma en la maduración final de las subunidades pre-40S, promoviendo la unión con la subunidad 60S para la formación de una partícula “80S-like”, como un punto de control previo a la generación de subunidades competentes para la traducción (Soudet *et al.*, 2010; Lebaron *et al.*, 2012; Garcia-Gomez *et al.* 2014). Por tanto, un exceso de eIF5B podría favorecer la iniciación de la traducción en los mutantes de *rpl19ΔCT*.

También, se identificó en trabajos previos que la sobreexpresión de PAB1 (*poly-A binding protein*) suprimía parcialmente el fenotipo de crecimiento lento del mutante *rpl33-G76R* de la proteína ribosómica L33 (Martín-Marcos *et al.* 2007), ya que incrementa la cantidad de precursor 35S y por consiguiente la cantidad de subunidades 60S en ese mutante.

Además, en el caso de un mutante Δ uri1, cuando se elimina esta chaperona implicada en el control de calidad co-traducciona durante la síntesis proteica, las células muestran sensibilidad a antibióticos inhibidores de la traducción y presentan en su perfil de polisomas una gran acumulación de monosomas 80S. En este mutante, la sobreexpresión del complejo ternario también alivia sus defectos en el inicio de la traducción, corrigiendo el cociente P/M (Deplazes *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando se sobreexpresaron en el mutante M86V éstos u otros factores de inicio de la traducción, no se observó supresión del fenotipo *slg* a 37°C (datos no mostrados). El defecto en el inicio de la traducción en este mutante no se debería a defectos en la unión entre ambas subunidades, ya que se acumulan monosomas, ni a la presencia en cantidades limitantes de factores de inicio de la traducción. Podría ocurrir que la mutación M86V en la subunidad 60S, esté ralentizando la liberación de alguno de estos factores, bloqueando los ribosomas en el AUG y dificultando el último paso del inicio de la traducción.

Por otra parte, es reseñable que en los perfiles de la cepa control *RPL16bΔ_i* se observa la presencia de algunos *halfmers*. Este hecho indica que en cepas cuyo fondo genético es Δ *rpl16a* Δ *rpl16b* la cantidad de L16B silvestre sintetizada a partir del alelo clonado en un plásmido centromérico no sería completamente suficiente para la síntesis de la cantidad de 60S adecuada.

Como se ha comentado, los mutantes *rpl16bΔ_i** son sensibles a antibióticos que afectan a la actividad descodificadora o a la actividad peptidil-transferasa del ribosoma (Figura 34). Sin embargo, este fenotipo es común en cepas con defectos en la biogénesis de ribosomas que causan un déficit en subunidades ribosómicas (Martín-Marcos *et al.*, 2007; Meskauskas *et al.*, 2008; Petrov *et al.*, 2008; Tesis Ana Jiménez), por lo que podría ser esta reducción de 60S la causa principal y no la existencia de defectos traduccionales específicos en nuestros mutantes. No obstante, al estudiar la fidelidad traduccional se detectó en ellos un incremento en la

Discusión

frecuencia del cambio programado en -1 en la fase de lectura durante la traducción de un transcrito de fusión *LacZ* con la señal del virus L-A. Aunque sólo es significativamente mayor en el caso de I8N y el doble mutante, en los que es 1.8 veces superior a la de la cepa control (Figura 36). En otros mutantes con RPs alteradas en ningún caso este cambio en -1 en la fase de lectura llega a ser 2 veces mayor que en la cepa silvestre (Meskauskas *et al.*, 2005; Meskauskas *et al.*, 2008; Petrov *et al.*, 2008; Rhodin y Dinman 2010). También se analizó si los mutantes *rpl16bΔ_i** tienen alterado el reconocimiento del codón de inicio de la traducción, mediante la cuantificación de la expresión de transcritos de fusión *HIS4::LacZ* con codones de inicio AUG o UUG. En ningún caso se observó un aumento significativo en la expresión de *HIS4* con un codón de inicio UUG frente al que lleva AUG respecto a la cepa control, lo que sugiere que estos mutantes no tienen alterada la fidelidad en la selección del codón de inicio (Figura 37).

En el caso de los mutantes *rpl16bΔCT* los perfiles de polisomas son similares a los obtenidos cuando se impide progresivamente la expresión de *RPL16BΔ_i*, aunque el defecto es algo menor. Esto indicaría que sus defectos en traducción se deberían principalmente a una severa reducción de subunidades 60S que hace que disminuyan los monosomas y los polisomas y sugiere que numerosos mRNAs se están traduciendo por ello mucho menos eficazmente en estos mutantes. No obstante, también podría haber algún defecto en el inicio de la traducción que no podamos observar en estos ensayos al quedar en segundo plano frente a la gran reducción de subunidades 60S.

Además, cuando se sobreexpresa alguno de los alelos *rpl16bΔCT* en una cepa que tiene en su genoma uno sólo de los genes parálogos *RPL16*, o incluso en una cepa silvestre que posee los dos, se observa un fenotipo de crecimiento lento, que indicaría la dominancia negativa de estos alelos truncados. En esta situación, a pesar de que habrá un porcentaje de subunidades 60S con proteínas L16BΔCT y que tengan menos cantidad del precursor 7S, no habrá defectos en el procesamiento de los precursores 27S ni déficit de ribosomas, ya que hay suficientes subunidades 60S con proteína silvestre L16B. Esto, nos hace pensar que la dominancia se podría deber a que ambas subpoblaciones de subunidades 60S estarían compitiendo por unirse a los PICs 43S y las que tienen las proteínas truncadas o no se unen bien al PIC 43S (y por eso la existencia de *halfmers*) o tras unirse a ellos podrían formar monosomas que se quedarán bloqueados en el codón de inicio. Por tanto, es posible que la ausencia del extremo C-terminal de L16B también cause defectos en el inicio de la traducción.

Defectos en el procesamiento de precursores de los rRNAs en los mutantes *rpl16bΔCT* y *rpl16bΔ_i**

Para investigar las causas del déficit en las cantidades de subunidades 60S de los mutantes *rpl16bΔ_i** y *rpl16bΔCT*, analizamos el procesamiento de los precursores de los rRNAs en los mimos.

En los mutantes *rpl16bΔCT* el fenotipo de procesamiento de los precursores de los rRNAs es similar al que se observa cuando se inhibe progresivamente la expresión de *RPL16BΔ_i* y la síntesis de la proteína silvestre L16B (Figura 45). Este fenotipo se caracteriza por: (i) una gran acumulación del precursor 35S, (ii) un incremento en la proporción del precursor 27SA₂ respecto a los siguientes precursores 27S y (iii) una drástica reducción en los niveles del precursor 7S del 5.8S, que hace que sea prácticamente indetectable. Los resultados de la inmunoprecipitación de pre-ribosomas en estos mutantes indican que las proteínas truncadas L16BΔCT sí se incorporan en ellos y generarán subunidades 60S (Figura 47) por lo que el fenotipo de procesamiento de los pre-rRNA se debería a la ausencia de la α-hélice C-terminal, y no a que esas proteínas no se incorporen en los pre-ribosomas 60S.

Como se ha argumentado anteriormente, el extremo C-terminal de L16 sería necesario para el correcto plegamiento de los dominios II y VI del rRNA 25S, y por tanto, para un procesamiento exonucleolítico adecuado del extremo 5' del rRNA 5.8S. Este fenotipo de procesamiento se observa también cuando se inhibe la síntesis de otras RPs que se localizan próximas al dominio II del rRNA 25S y el ES7 adyacente (Martin-Marcos *et al.*, 2007; Pöll *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2007; Jakovljevic *et al.*, 2012; Gamalinda *et al.*, 2014b; Ohmayer *et al.*, 2015) o la síntesis de algunos factores de biogénesis que se unen en el dominio I del rRNA y/o en la región ITS2 que emerge del mismo (Granneman *et al.*, 2011; Babiano *et al.*, 2013; Dembowski *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2015).

Por tanto, la drástica reducción de subunidades 60S que compromete la viabilidad de los mutantes *rpl16bΔCT* se debería a que en ellos no se están produciendo adecuadamente en tiempo y cantidad los precursores 27SB, y por ello no se están formando los rRNAs maduros 25S y 5.8S en cantidades suficientes que se requieren fisiológicamente durante el crecimiento celular.

Respecto a los mutantes *rpl16bΔ_i**, el fenotipo de procesamiento del rRNA a 37°C es semejante al del mutante nulo, en cuanto a que se observa una gran acumulación del precursor 35S (Figura 23 y tabla X), que origina una gran reducción de los precursores 27SA₂ y 20S. La menor cantidad del pre-rRNA 7S en estos mutantes, podría deberse a este retraso en el procesamiento del 35S causa una disminución del 27SA₂, o a que también esté impedido en los

Discusión

mutantes el procesamiento de los precursores 27S que derivan del anterior. Al calcular el cociente $27SA_2/27S$ y basándonos en los datos del *primer extensión* (Figura 24 y tabla X) parece que todos los mutantes excepto el A23D también tienen defectos en el procesamiento de $27SA_2$ para generar el $27SB_S$. Además, el cociente entre los precursores $27SB_S/7S$ es mayor que en el control, lo que indica que el corte endonucleolítico en el sitio C_2 también sería defectuoso en los mutantes $rpl16b\Delta_i^*$. La acumulación del 35S también hace que en los mutantes se acumule cierta cantidad del precursor 23S, respecto a la cepa control, a medida que se incuban a 37°C. El pre-rRNA 23S se origina cuando están impedidos los cortes tempranos en A_0 , A_1 y A_2 , y el 35S se procesa directamente en A_3 y está descrito que puede procesarse normalmente a 18S (Granneman y Baserga, 2004). Finalmente, hay que destacar que cuando se incubaba la cepa control $RPL16B\Delta_i$ a 37°C, se aprecia también una ligera acumulación del 35S junto con una reducción del precursor $27SA_2$, y por tanto de la cantidad de 25S y 5.8S maduros, que reflejaría la ligera haploinsuficiencia de la cepa $\Delta rpl16a \Delta rpl16b$ cuando expresa únicamente el alelo $RPL16B\Delta_i$ clonado en un plásmido centromérico.

El análisis de la biosíntesis y el procesamiento de los rRNAs *in vivo* mediante pulso y caza con uracilo tritiado demuestra también una importante acumulación del precursor 35S en los mutantes $rpl16b\Delta_i^*$ cuando se cultivan a 37°C. También se detecta un retraso en el procesamiento de los precursores 27S en su conjunto para generar el rRNA maduro 25S, cuya cantidad está reducida considerablemente en todos los mutantes y que estaría en consonancia con los defectos en el procesamiento en los sitios B_{1L} , B_{1S} y C_2 (Figura 26). Además, la acumulación del precursor 35S causa un retraso en la síntesis del precursor 20S y por tanto también en la producción del rRNA maduro 18S en los mutantes $rpl16b\Delta_i^*$ (Figura 26).

Este fenotipo de procesamiento del pre-rRNA de los mutantes $rpl16b\Delta_i^*$ marcado por el defecto en la producción de los cortes tempranos A_0 , A_1 y A_2 del precursor 35S, concuerda con que L16 sea una proteína que se ensambla en las primeras etapas de formación de la pre-partícula 90S (Gamalinda *et al.*, 2014b; Ohmayer *et al.*, 2015) y es muy similar al fenotipo del mutante $RPL33-G76R$ de la proteína L33 (Martín-Marcos *et al.* 2007), que forma parte junto con L16 del cluster dII/dVI.

Cuando se analiza la incorporación de las proteínas mutantes L16B* en pre-partículas ribosómicas precursoras (mediante la inmunoprecipitación de pre-ribosomas y el posterior estudio de los precursores que copurifican con ellos), se observa que la cantidad de 35S y 27S es menor en los inmunoprecipitados de los mutantes que en los de la cepa control a 28°C, aunque parece que en esta última hay más proteína silvestre y por tanto se ha inmunoprecipitado más pre-rRNA (Figura 28). Sin embargo, a 37°C hay más cantidad del precursor 35S, pero menos pre-rRNAs 27S en los pre-ribosomas inmunoprecipitados de los mutantes respecto a los

de la cepa control. La disminución de los precursores 27S en los inmunoprecipitados de los mutantes podría deberse exclusivamente a sus defectos en el procesamiento de pre-rRNAs a 37°C, sin que hubiese problemas de incorporación *per se* de la proteína mutante. Además, si la menor cantidad de precursores que co-purifican en los mutantes a 37°C se debiera a defectos en el ensamblaje de las proteínas L16B*, estos defectos también existirían a 28°C, ya que también se inmunoprecipita en ellos menor rRNA; y sin embargo, a esta temperatura tienen un crecimiento similar al de la cepa control.

En el mutante M86V, se observa menos cantidad de proteína L16B*, tanto a 28°C como a 37°C (Figura 29), por lo que en este caso es esperable detectar menos pre-rRNA 35S y 27S en la inmunoprecipitación de sus pre-ribosomas.

Además, el precursor 27SA₂ no se acumula, sino que se procesa a 27SB de forma similar a lo que observamos en el “northern blot”, mientras que si las proteínas mutantes no se estuvieran incorporando eficazmente en pre-ribosomas, su fenotipo se parecería más al de un mutante nulo, en el que se acumula el precursor 27SA₂.

Por otra parte, se ha descrito que cuando las RPs no se ensamblan eficientemente, son rápidamente degradadas (Tsay *et al.*, 1988), por lo que si los mutantes no se ensamblaran bien el fenotipo sería más similar al del mutante nulo. Asimismo, al sobreexpresar los alelos mutantes *rpl16bΔ_i** en plásmidos multicopia no se corrige el crecimiento lento de los mutantes correspondientes, por lo que este fenotipo no se debería a un problema de dosis. Por tanto, la menor cantidad de los pre-rRNAs 27S detectados en los inmunoprecipitados de los mutantes, se debería quizá a los defectos en el procesamiento en el sitio A₂, más que a defectos en el ensamblaje de las proteínas mutantes L16B* en pre-partículas ribosómicas, aunque esta posibilidad no se podría excluir completamente.

En los mutantes *rpl16bΔ_i** la reducción en la cantidad de subunidades 60S se debería principalmente al efecto que ejercerán las proteínas mutantes sobre el plegamiento adecuado de la región del ES39 en los pre-ribosomas durante su maduración, necesaria para permitir un correcto procesamiento de los pre-rRNAs hacia la producción de los rRNAs maduros 25S y 5.8S. Pero también es posible que los pre-ribosomas con proteínas L16B* ensambladas sean menos estables que los silvestres y sean degradados más fácilmente, dando lugar a una reducción en la cantidad de subunidades 60S para participar en traducción.

L16 en el ensamblaje y maduración de pre-ribosomas 60S

Es posible que la función de L16 sea facilitar el plegamiento del pre-rRNA, para formar un entorno adecuado, que permita la asociación a los pre-ribosomas de algunos factores de

Discusión

biogénesis y de otras RPs, de forma que los siguientes pasos del procesamiento de los precursores y la ruta de maduración de la subunidad 60S puedan ocurrir correctamente. En colaboración con el grupo del Dr. Milkereit (Universidad de Regensburg, Alemania), se investigó la función de L16 en el procesamiento de los precursores de los rRNAs y la biogénesis de 60S. Para ello, se purificaron poblaciones pre-ribosomas tempranos e intermedios utilizando la proteína Noc2-TAP y se analizó su composición en RPs y los factores de ensamblaje asociados, cuando se inhibe la síntesis de L16. Se empleó con este fin la técnica de espectrometría de masas semicuantitativa iTRAQ, en la que se marca con reactivos isobáricos diferentes los péptidos procedentes de las células mutantes o control. Los datos se compararon con los obtenidos al inhibir la síntesis de otras RPs de 60S que se unen al dominio II del rRNA 25S (Ohmayer et al., 2015). Cuando se inhibe la síntesis de L16 empleando un alelo condicional *pGAL::RPL16BΔi* o la de alguna de las otras seis RPs (L4, L7, L18, L20, L32 y L33) disminuye notablemente la cantidad de los factores Nsa2, Nsa1, Nug1, Spb1 y Spb4 asociados a los pre-ribosomas que inmunoprecipitan con Noc2-TAP. Además, cuando se bloquea la producción de L16 o de otra de las proteínas integrantes del cluster dII/dVI, está afectado el ensamblaje de las RPs L19, L17 y L39 a los pre-ribosomas tempranos que contienen Noc2-TAP. Por tanto, el ineficiente reclutamiento de estas RPs, así como el debilitamiento en la asociación de factores de biogénesis que actúan downstream, podrían explicar también porqué cuando se inhibe la síntesis de L16 y la formación del cluster dII/dVI, se impide el procesamiento de la región ITS2 del rRNA y otros eventos posteriores en la maduración de las subunidades 60S.

Del mismo modo, analizamos cómo afecta la ausencia del extremo C-terminal de L16 a la composición de poblaciones de pre-ribosomas tempranos e intermedios (Figura 49). Los valores del ratio iTRAQ son menores para el mutante *rpl16bΔ51* que los que se obtienen cuando se inhibe la síntesis de L16, aunque hay factores de biogénesis cuya asociación a los pre-ribosomas se ve afectada en ambos casos. Así la ausencia de la α -hélice C-terminal de L16 hace que disminuya la asociación de Spb4, Nug1 y Ssf1, Ebp2 y Mak16 a los pre-ribosomas, como ocurre cuando se bloquea la síntesis de L16 aunque no la de otras RPs del cluster dII/dVI. Además, hay factores de biogénesis que se encuentran enriquecidos en los pre-ribosomas en ambos casos, como Rrp14 y Mak5. En cuanto a las RPs, en el mutante *rpl16bΔ51* se debilita, aunque ligeramente, el ensamblaje de L17, como ocurría cuando falta la proteína completa, L32 y L36, la cual interacciona genéticamente con Ebp2, por lo que podría estar perjudicando su asociación a los pre-ribosomas (Wan *et al.*, 2015). Estos datos indican, que el extremo C-terminal de L16 participa en las múltiples interacciones que establece L16 en el cluster dII/dVI, lo que permite el correcto plegamiento de esta región del rRNA 25S, necesario a su vez para el reclutamiento de una serie de factores de biogénesis y de RPs a los pre-ribosomas. Sin embargo, por su forma de plegamiento y su posición en el ribosoma, la predicción es que el papel

principal de la hélice C-terminal eucariótica de L16 sería anclar el dominio VI al dominio II del rRNA, controlando el acceso de las exonucleasas (Rat1, Xrn1 y Rrp17) al extremo 5' del 5.8S. Así, no parece probable que la α -hélice C-terminal sea el lugar de interacción de algunos de estos factores, ya que si se perdiese ese contacto en el mutante *rpl16b Δ 51*, en ese caso el ratio del iTRAQ sería mucho mayor. Nsa2 interacciona con el pre-rRNA en una hélice muy próxima al sitio de unión de L16 (Bassler *et al.*, 2014). Además, se ha descrito que la helicasa Mak5 participa en la formación de un cluster de proteínas junto con otros factores como Ebp2, que organizarían reordenamientos estructurales del pre-rRNA en la misma zona de ensamblaje de L16 (Pratte *et al.*, 2013). Por ello, se investigó si la sobreexpresión de los genes que codifican estas proteínas, suprimirían los defectos que los mutantes de truncación tienen en la biogénesis de ribosomas y que contribuyen al extremo crecimiento lento de la cepa *Δ rpl16a Δ rpl16b*, [*2 μ LEU2*, *rpl16b Δ 28*] (Tabla 3). También se sobreexpresaron los genes que codifican algunos factores de biogénesis de la subunidad 60S cuya asociación a los pre-ribosomas disminuye en ausencia del extremo C-terminal de L16. El incremento de dosis de esos factores no corrige de forma detectable el fenotipo *slg* de esta cepa. Para interpretar este resultado negativo, se puede proponer que, aunque algunos de los factores mencionados se estuvieran ensamblando peor en ausencia del extremo C-terminal de L16, su sobreexpresión podría contribuir solamente a mejorar en cierto grado el ensamblaje de una fracción mayor de subunidades 60S. Sin embargo, el grave defecto en el procesamiento del extremo 5' del rRNA 5.8S de los mutantes de truncación sería difícil de suprimir por un aumento de dosis de alguno de los factores de procesamiento, ya que nuestros resultados indican que es la causa principal del déficit en subunidades 60S y probablemente del exacerbado fenotipo de crecimiento lento.

Regulación traduccional de *GCN4* en los mutantes *rpl16b Δ _i**

Los datos de los ensayos de actividad β -galactosidasa con el plásmido p180 con la fusión *GCN4::LacZ* silvestre con las 4 uORFs, indican que las mutaciones *rpl16b Δ _i** causan una leve desrepresión de *GCN4* en condiciones de suficiencia de aminoácidos (fenotipo *Gcd⁻*). Los mutantes también tienen cantidades del mRNA de *HIS4* más elevadas que la cepa control en estas condiciones, confirmando este débil fenotipo *Gcd⁻*. Por el contrario, en condiciones de carencia de aminoácidos, la cantidad de proteína de fusión *Gcn4::LacZ* es ligeramente menor en los mutantes que en la cepa control, según los ensayos de actividad β -galactosidasa usando el plásmido p180 en presencia de SMM. Esto sugiere que los mutantes tendrían un fenotipo de regulación traduccional de *GCN4* similar al que se ha descrito para la delección de *RPL11B* y de *RPL33A*, como consecuencia del déficit de subunidades 60S que presentan (Foiani *et al.*, 1991; Tesis Pilar Martín):

Discusión

El modelo de regulación traduccional de *GCN4* propone que **en condiciones de suficiencia de aminoácidos**, en una cepa silvestre, los ribosomas traducen la uORF1 y aproximadamente el 50% de las subunidades 40S permanecen asociadas al mRNA y continúan el rastreo, de manera que adquieren “a tiempo” una subunidad 60S para reiniciar la traducción en alguno de los restantes uORFs, pero se disociarán con alta frecuencia al traducir las uORFs3 y 4, por lo que un bajo porcentaje de ellos alcanza el AUG real de *GCN4*. En cambio en los mutantes *rpl16bΔ_i** debido al déficit de subunidades 60S un alto porcentaje de las subunidades 40S que hayan traducido la uORF1 sobrepasarían las restantes uORFs sin captar una subunidad 60S que permitan su traducción, resultando en que más PICs 43S alcanzarían el AUG real de *GCN4*, traduciéndolo. Sin embargo, no todos los PICs 43S que hayan llegado al AUG de *GCN4* podrían formar monosomas con 60S para traducirlo, por lo que sólo se observa un pequeño incremento en la actividad actividad β-galactosidasa procedente del plásmido p180.

La regulación traduccional de *GCN4* requiere la lectura de la uORF1, por tanto en una cepa silvestre la expresión del transcrito de fusión *GCN4::LacZ* desde el plásmido p226, cuando sólo contiene la uORF4 en su secuencia líder es baja. En cambio, en los mutantes *rpl16bΔ_i** los valores de actividad β-galactosidasa procedente del plásmido p226 aumentan, sugiriendo que existe *leaky scanning* de PICs 43S (completamente constituidos) debido a la falta de subunidades 60S. Sin embargo, este efecto también podría deberse a un incremento en la reiniciación después de la lectura de la uORF4. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se midió la actividad β-galactosidasa procedente de un transcrito de fusión *GCN4::LacZ* que contiene únicamente la uORF1 en la posición de la uORF4 y elongada, de manera que se solapa con *GCN4* (pM226). Así, en mutantes que afecten a la reiniciación no se observaría un aumento en la expresión de este transcrito, mientras que en mutantes en los que hay *leaky scanning* se apreciará un aumento en los valores de actividad β-galactosidasa.

En células silvestres, la expresión del plásmido pM226 es muy baja porque los ribosomas traducen la uORF1 elongada y no la real de *GCN4*. Sin embargo, en los mutantes *rpl16bΔ_i** hay un aumento en la traducción de este transcrito, debido a que existe *leaky scanning* de la uORF1 y por tanto pueden iniciar en el AUG de *GCN4*, traduciéndolo. Este fenómeno de *leaky scanning* de la uORF1 en los mutantes *rpl16bΔ_i** determinaría que los niveles de desrepresión de Gcn4 no sean tan elevados.

En condiciones de carencia de aminoácidos, en una cepa silvestre, se va a activar la quinasa Gcn2 fosforilando eIF2α, lo que hace que la cinética de formación del CT sea más lenta. Así, los ribosomas que han traducido la uORF1 no adquieren CT “a tiempo” para traducir las otras uORFs y las subunidades 40S continúan el rastreo hacia el AUG auténtico de *GCN4*, adquiriendo en ese punto CT y subunidades 60S y aumentando su traducción. En los mutantes

*rpl16bΔ_i** la falta de subunidades 60S provoca una menor desrepresión de la traducción de *GCN4* en esas condiciones, ya que el evento de la traducción de la uORF1 necesario para la desrepresión de la traducción de *GCN4*, estaría también perjudicado. Así, observamos que en los mutantes la actividad β-galactosidasa procedente del plásmido pM226 es mayor (*leaky scanning* de la uORF1), por lo que también mostrarían una menor desrepresión de la traducción que el control en condiciones de carencia de aminoácidos. No obstante, este descenso es muy ligero, solamente significativo en el caso de los mutantes M86V e I8N R93H (20-25%). Por otro lado, los valores del mensajero de *HIS4* obtenidos por PCR cuantitativa en medio con SMM, indican que las mutaciones *rpl16bΔ_i** causarían una desrepresión de *GCN4* similar o incluso mayor que la cepa silvestre. Además, los valores de actividad β-galactosidasa del plásmido p367 con el transcrito de fusión *HIS4-LacZ* también son mayores en los mutantes en estas condiciones. Por tanto, parece que este fenómeno de *leaky scanning* de la uORF1 se compensaría con el aumento de PICs 43S capaces de llegar al codón de inicio de la traducción de *GCN4*. Para estar completamente seguros de que los mutantes tienen una mayor expresión de *GCN4* en condiciones de carencia de aminoácidos, se realizará un northern para cuantificar el mRNA de *HIS4* en células cultivadas en SMM.

Se ha observado la cepa control *RPL16BΔ_i* (*Δrpl16a Δrpl16b*) exhibe un aumento de 1.5 veces en la traducción de *GCN4* respecto a una cepa silvestre BY4741 (*RPL16A RPL16B*) en todas las condiciones, debido a que tiene una cantidad menor de subunidades 60S (Ver polisomas).

Por tanto, el hecho de que las mutaciones *rpl16bΔ_i** alteren la expresión del mRNA de *GCN4*, sugiere que la traducción de otras poblaciones de mRNAs o de otros mRNAs específicos podría estar afectada en estos mutantes, y su detección requeriría de análisis más precisos *in vitro* o también de estudios sistemáticos “*genome wide*” como el “*ribosome profiling*” (Ingolia *et al.*, 2009.)

Conclusiones

- 1) La obtención y selección de numerosos mutantes hipomórficos de *RPL16B*, entre ellos los portadores de mutaciones que provocan la sustitución de uno (**I8N**, **A23D**, **A37D**, **M86V**) o dos aminoácidos (**I8N R93H**) en distintas regiones de L16, revela graves alteraciones del crecimiento celular, el procesamiento de precursores de los RNA ribosómicos y la producción neta de subunidades maduras 60S, que son parcialmente funcionales.
- 2) Dos alelos *rpl16bΔCT* codifican proteínas truncadas L16ΔCT carentes de los 28 o 51 aminoácidos terminales de L16. Las proteínas mutantes establecerían interacciones defectuosas con proteínas de 60S (L6, L14, L20 y L33) que contactan con una región específica del rRNA 25S en la estructura atómica del ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae*. La α-hélice C-terminal de L16 sería esencial para anclar el segmento de expansión ES39 y el dominio VI al dominio II del 25S rRNA, favoreciendo un plegamiento adecuado y protegiendo al extremo 5' del rRNA maduro 5.8S del acceso de las nucleasas que lo procesan hasta etapas más tardías de la biogénesis de la subunidad. El extremo C-terminal de L16 aparecería evolutivamente en los organismos eucariotas a la vez que el rRNA 5,8S.
- 3) Los mutantes *rpl16bΔCT* tienen defectos específicos en el procesamiento de varios precursores del ARN ribosómico. Los 51 aminoácidos C-terminales de L16e son dispensables para su propio ensamblaje en 60S y, aunque la eliminación de 21 no es letal si altera y retrasa gravemente el procesamiento de precursores de los rRNA componentes de las dos subunidades ribosómicas.
- 4) La cantidad de subunidades maduras 60S y la proporción 60S/40S se reduce drásticamente en los mutantes de truncación *rpl16bΔCT* y muy notablemente en los cinco mutantes de sustitución, hipomórficos y viables que se han analizado, los cuales exhiben defectos en la traducción global de mensajeros que contribuyen a su fenotipo de crecimiento lento. Las mutaciones de sustitución en L16 impiden parcialmente la iniciación de la traducción (especialmente M86V) y reprimen la traducción del RNA mensajero de *GCN4* en condiciones de carencia de algún aminoácido (fenotipo Gcn⁻), aunque **X** e **Y** causan desrepresión parcial de su expresión en condiciones normales (fenotipo Gcd⁻). Es predecible por tanto que diferentes alteraciones de L16 tengan consecuencias diferentes sobre la traducción de determinadas subpoblaciones de RNA mensajeros, en condiciones fisiológicas normales o en situaciones de estrés.
- 5) La mutagénesis del gen *RPL16B* y el análisis fenotípico en *Saccharomyces cerevisiae* permiten desvelar, por primera vez, algunos determinantes estructurales de la proteína ribosómica L16 que son esenciales para el ensamblaje de la subunidad 60S y la

Conclusiones

funcionalidad completa del ribosoma eucariótico maduro. Las interacciones moleculares proteína-rRNA que alteran las proteínas truncadas en la estructura de alta resolución atómica de la subunidad 60S permiten definir una función esencial del extremo C-terminal de L16 en el procesamiento de precursores de los rRNA, la biogénesis y la funcionalidad de los ribosomas eucarióticos.

Materiales y Métodos

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

El microorganismo sobre el cual se ha llevado a cabo este trabajo es la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, y en la **tabla I de los Anexos** se muestran las cepas utilizadas, indicándose en cada caso su procedencia y sus principales características genéticas.

Todas las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se generaron transformando la cepa TY931 (Pöll *et al.*, 2009) con diferentes plásmidos, según se describe en el apartado de Resultados, excepto la cepa TY931-Noc2TAP, que además presenta la secuencia del epítipo TAP fusionado a la secuencia genómica del factor de biogénesis *NOC2*. Su obtención se describe a continuación:

Obtención de la cepa TY931-Noc2TAP

Para fusionar la secuencia del epítipo TAP al extremo 3' de la secuencia genómica de *NOC2* utilizamos un plásmido derivado del pBS1479 (Rigaut *et al.* 1999), que contiene la secuencia de TAP fusionada en fase a la secuencia del gen *NATMX6* que codifica para una proteína que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina (Goldstein y McCusker, 1999). Este plásmido se utilizó como molde para realizar una PCR usando como cebadores los oligonucleótidos *Noc2-TAP-NAT-F* y *Noc2-TAP-NAT-R* (tabla III de los anexos) y con el producto obtenido se transformó la cepa TY931. Se seleccionaron transformantes resistentes a nourseotricina en placas de YEPD (100 ng/μl), comprobándose posteriormente la correcta integración en el genoma de la secuencia TAP fusionada al extremo 3' del *Noc2* mediante PCR, usando un oligonucleótido complementario a la secuencia del gen *NATMX6* y otro complementario a la ORF del gen *NOC2*.

Para los procedimientos de clonación molecular y para la amplificación de plásmidos se empleó la cepa de *Escherichia Coli* DH5α (F⁻, φ80dlacZΔM15, Δ (lacZYA-arg F), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_K⁻ m_K⁺), *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

2. MEDIOS DE CULTIVO

Para *Saccharomyces cerevisiae*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento, mantenimiento y análisis fenotípico de las cepas empleadas fueron los siguientes:

- **YEPD:** Extracto de levadura (BD Bacto)1%, bactopectona (Difco) 2%, glucosa 2%.
- **YEPG:** Extracto de levadura (BD Bacto)1%, bactopectona (Difco) 2%, galactosa 2%.

Materiales y Métodos

- **Medio mínimo 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%.
- **Medio mínimo SC (*Standard Complete*):** Su composición es la misma que el SD al que se ha añadido, además, una mezcla de suplementos nutricionales al 0,2% entre los que se encuentran los L-aminoácidos proteinógenos y algunas bases nitrogenadas.
- **Medio mínimo SCGal (*Standard Complete Galactose*):** Su composición es la misma que el SC, pero en lugar de glucosa como fuente de carbono se le añade galactosa.
- **Medio 5-FOA:** YNB-AA-AS (BD Difco) 0.145%, sulfato de amonio 0.5%, glucosa 2%, uracilo 0.2 mM, suplementado con 0.1% de 5-fluoroorotic acid monohydrate (Apollo scientific).

Todos los medios se prepararon con agua destilada y cuando fue preciso se les añadió agar a una concentración final del 2% para solidificarlos.

En experimentos con mutantes auxotróficos de *S. cerevisiae*, los medios se suplementaron con los aminoácidos apropiados en las siguientes cantidades de cada uno de ellos:

- 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.
- Triptófano 40 mM: 10 ml/l ó 0.1 ml/placa.
- Uracilo 20 mM: 10 ml/l ó 0.25 ml/placa.
- Inositol 200mM: 1 ml/l ó 0.1 ml/placa.

En los ensayos realizados para estudiar el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* en presencia de antibióticos, se suplementaron placas de YEPD con las siguientes concentraciones de antibióticos:

- Paromomicina 150-500 µg/ml
- Anisomicina 10 µg/ml y 25 µg/ml
- Cicloheximida 0.025 y 0.05 µg/ml

Para seleccionar colonias de *S. cerevisiae* que habían incorporado el gen que confiere resistencia a geneticina se suplementaron placas de YEPD con geneticina (G418 sulphate) a una concentración final de 200 µg/ml. De igual forma, cuando se seleccionaron colonias que habían incorporado el gen que confiere resistencia a nourseotricina, las placas de YEPD se suplementaron con este antibiótico en una concentración final de 100 µg/ml.

Para realizar los diferentes experimentos, las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas, se incubaron tanto en medio líquido como en medio sólido, a las temperaturas de 18°, 28° y 37°C, dependiendo del experimento. Además, los cultivos en medio líquido, se incubaron con agitación orbital constante de 250 rpm (revoluciones por minuto). En el caso de los cultivos líquidos, el crecimiento se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro.

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%.

Todos estos medios se prepararon con agua destilada y cuando fue preciso solidificarlos, se les añadió agar a una concentración final del 2%.

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.

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 DNA se emplearon vectores *shuttle* con capacidad de replicación en *E.coli* y en *S. cerevisiae* (contienen secuencias de replicación autónoma, ARS).

- **YCplac**: Son una serie de vectores que derivan de pUC19 (Norrander *et al.*, 1983) 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.
- **YEplac**: Son una serie de vectores autorreplicativos multicopia que no portan secuencias centroméricas y que derivan de pUC19 (Gietz and Sugino, 1988). Además contienen una secuencia de replicación procedente del plásmido de 2 micras (2 μ) de *S. cerevisiae*. En este trabajo se han utilizado **YEplac195** (2 μ , *URA3*) e **YEplac181** (2 μ , *LEU2*).
- **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

Los plásmidos utilizados durante este estudio se recogen en la **tabla II de los Anexos**.

A continuación se describe cómo se generaron los principales plásmidos utilizados durante este trabajo:

- Clonación del alelo *RPL16B Δ i* en plásmidos centroméricos

Primero clonamos el gen *RPL16B* de *S. cerevisiae*, amplificándolo mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad usando como molde DNA genómico de la cepa YIL133c (*Arp116a::KanMX4, RPL16B*) y los oligonucleótidos *PromL16B* y *O1235* (**Tabla III de los anexos**). En primer lugar se amplificó un fragmento de DNA de 1807 bp que contiene una copia funcional del gen *RPL16B* con la ORF de 598 bp, el intrón de 449 bp y dos secuencias flanqueantes de la ORF de 408 bp en 5' y de 353 bp en 3', usando como molde DNA genómico de la cepa YIL133c (*Arp116a::KanMX4, RPL16B*) y los oligonucleótidos *PromL16B* y *O1235* (**Tabla III de los anexos**). Este alelo se clonó en los vectores centroméricos YCplac111 (*CEN4, LEU2*) e YCplac33 (*CEN4, URA3*) (Gietz y Sugino 1988), utilizando las endonucleasas de restricción *SpeI* y *PstI*, originando los plásmidos pAG1 y pAG2. A continuación, para construir el alelo *RPL16B Δ i*, se digirió este plásmido pAG1 con las enzimas de restricción *SpeI* y *Bpu10i* y sustituimos ese fragmento por uno generado por PCR con los cebadores *PromL16B* y *L16Bint*, el cual contiene el promotor de *RPL16B* y la primera parte de la ORF, pero carece ya del intrón, dando lugar al plásmido pAGH1. El alelo *RPL16B Δ i* se subclonó también en el vector YCplac33 (*CEN4, URA3*) generando el plásmido pAGH2. Los alelos *RPL16B* y *RPL16B Δ i* amplificados y clonados como se ha descrito, se secuenciaron para verificar la ausencia de posibles mutaciones ocurridas durante la PCR o la subclonación (Materiales y Métodos).

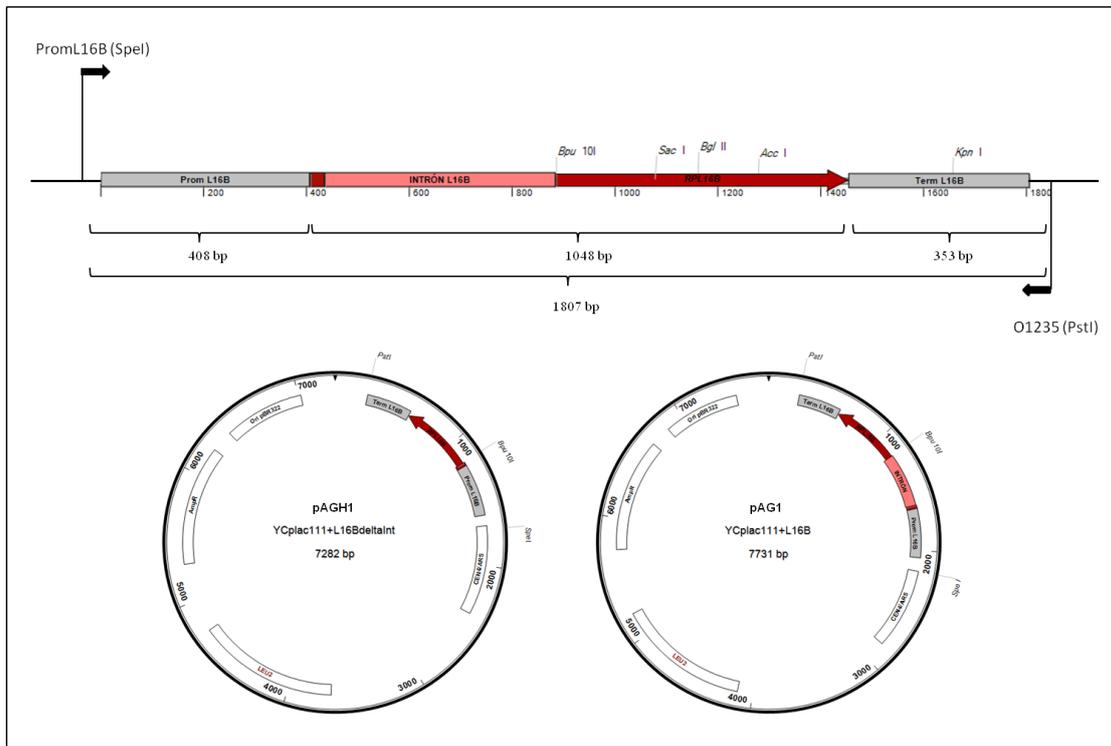


Figura 57. Esquema de la construcción de los plásmidos pAG1 y pAGH1. En la parte superior se muestra el alelo *RPL16B* amplificado con los oligos indicados y posteriormente clonado en los sitios de corte de las endonucleasas de restricción señaladas, generándose el plásmido pAG1. A partir de este plásmido se eliminó el intrón generándose el plásmido pAGH1

- Clonación de los alelos *rpl16bΔ_i* fusionados al epítipo FLAG

En primer lugar, para generar los alelos *rpl16bΔ_i** fusionados a FLAG se realizó una PCR con un oligonucleótido complementario al promotor de *RPL16B* (*PromL16B*) y otro oligonucleótido que contiene la secuencia que codifica para el epítipo, más el codón de parada, la secuencia complementaria a los últimos codones de la ORF de *RPL16B* y los primeros de la secuencia de terminación de la transcripción en 3' de la ORF (*L16B-FLAG*). A continuación se usó el producto amplificado como cebador junto con un oligonucleótido complementario a la región 3' de la secuencia de terminación (*O1235*) para amplificar por PCR los alelos completos, que se clonaron en el plásmido YCplac111 (*CEN4*, *LEU2*), aprovechando los sitios de corte para las endonucleasas *SpeI* y *PstI* presente tanto la secuencia de los oligonucleótidos y en el vector.

- Clonación de los alelos *rpl16bΔCT* fusionados al epítipo FLAG

Para clonar los alelos de delección en 3' de parte de la ORF de *RPL16B* en fase con el epítipo FLAG, se utilizó un plásmido generado en un estudio sistemático previo (Ohmayer *et al.* 2013) que lleva el promotor del gen *RPS28* seguido de la ORF de distintas proteínas

ribosómicas, junto con el epítipo FLAG clonados en el vector de alto número de copias YEplac195 (2 μ , *URA3*). Este plásmido contiene tras el promotor *RPS28* dos sitios de reconocimiento para las endonucleasas *BamHI* y *PstI*, de manera que se puede clonar un fragmento con el alelo de interés en fase con el epítipo FLAG bajo el control del promotor fuerte de *RPS28*. Para ello, se sintetizaron por PCR el alelo *RPL16B Δ _i* y los alelos truncados *rpl16b Δ CT*, usando como cebadores oligonucleótidos con sitios de reconocimiento de las endonucleasas *BamHI* y *PstI* (*L16B-BamHI*, *L16B-Pst-Rev*, *K147-Pst-Rev*, *K170-Pst-Rev*) y que permiten amplificar únicamente la ORF de L16B, y los fragmentos generados se clonaron como se indica anteriormente en el vector YEplac195 (2 μ , *URA3*).

3.3 Transformación y obtención de DNA plasmídico 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 DNA tanto lineal como plasmídico.

Las cantidades de DNA utilizadas para la transformación oscilaban entre 300 ng y 600 ng si se trataba de DNA plasmídico, y entre 500 ng y 1 μ g si se trataba de un fragmento lineal de DNA.

Para recuperar los plásmidos que portaban los distintos transformantes de *S. cerevisiae* se utilizó la técnica de Yeast Plasmid Release descrita por (Filetici et al., 1985).

3.4 Transformación y obtención de DNA plasmídico de *E. coli*

Para amplificar plásmidos se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α , siguiendo el protocolo diseñado por (Hanahan, 1983).

Las preparaciones rápidas a pequeña escala de DNA plasmídico a partir de células de *E. coli* se realizaron mediante el procedimiento descrito por (Holmes and Quigley, 1981). Para obtener preparaciones de DNA plasmídico sin RNA ni proteínas se emplearon las columnas comerciales Nucleospin® Plasmid de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Obtención de DNA total de *S. cerevisiae*

La obtención de DNA total de *S. cerevisiae*, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por (Hoffman and Winston, 1987).

3.6 Técnicas de manipulación del DNA

a) Reacciones enzimáticas:

Los diversos tratamientos enzimáticos a los que se sometió el DNA se realizaron según los procedimientos generales descritos por (Sambrook and Russell, 2001) y teniendo en cuenta en cada caso las recomendaciones hechas por las diferentes casas comerciales. 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 DNA, así como para la construcción de moléculas recombinantes.
- Ligación: Se utilizó la ligasa del fago T4 de Thermo para la inserción de fragmentos de DNA en diferentes vectores.
- Reacciones de Desfosforilación: La eliminación del grupo fosfato en 5' en los casos en los que el vector poseía extremos compatibles o romos se llevo a cabo usando la fosfatasa alcalina (FastAP) de Thermo, evitándose así la autoligación.
- Extremos romos: Para la crear extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5', se empleó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (DNA Polymerase I Large Klenow de Promega)

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

El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por tratamiento con endonucleasas de restricción o purificados por diversos medios, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarosa D-1, Sigma) cuya concentración variaba entre el 0.5% y el 1.5% (p/v), según el tamaño de los fragmentos de DNA 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. El mismo tampón TAE 1X se empleó para el desarrollo de la electroforesis, que se realizó a un voltaje constante de 50-120 V. Para la visualización del DNA se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

La purificación de fragmentos de DNA 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.

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

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó la técnica de PCR para amplificar diversos fragmentos de DNA, o para la introducción de mutaciones en el alelo *RPL16B*.

- Amplificación de las ORFs de *RPL16A*, *RPL16B* y *RPL16BΔi* para su posterior clonación en plásmidos centroméricos.
- Construcción de alelos mutantes de *RPL16B* fusionados al epítipo FLAG.
- Amplificación de las ORFs de *MAK5*, *EBP2*, *RRP14*, *BRX1*, *SSF1* Y *MAK16*
- Construcción de los alelos *rpl16bΔi-FLAG*
- Construcción de un alelo *NOC2* fusionado al epítipo TAP (*Tandem Affinity Purification*).
- Comprobación de que la integración del alelo *NOC2::TAP* había tenido lugar en el locus adecuado del genoma de *S. cerevisiae*.
- Ensayos de mutagénesis al azar y dirigida.

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de DNA 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 DNA polimerasa utilizada en cada caso.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde plásmidos (10-50 ng), fragmentos lineales de DNA (10-200 ng), o colonias aisladas de *S. cerevisiae*, resuspendiendo éstas en 10μl de agua Milli Q estéril y calentando la mezcla a 94°C durante 10 minutos, antes de preparar la reacción.

Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos que en cada caso se señalan en la sección de Resultados, en una concentración final de 50 μM. Se usó una mezcla de los 4 desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche) en una concentración final de 50 μM.

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.

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.

Por último, para purificar los fragmentos de DNA resultantes se utilizaron los reactivos y columnas proporcionados en el Kit Nucleospin® *Gel & PCR Clean up* de Macherey-Nagel.

d) PCR cuantitativa (qPCR)

En un primer paso se sintetizó cDNA a partir de las muestras de RNA total obtenido a partir de células cultivadas en medio YEPD hasta fase exponencial. Para ello se trataron 2 µg de RNA total con DNasa I (1 U/µl, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y de ellos, se utilizó 1 µg para llevar a cabo una reacción de retrotranscripción con el kit comercial *iScript™ Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad).

Posteriormente, se realizó una reacción de PCR en la que se utilizaron los reactivos del paquete comercial *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time, Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante y los requerimientos específicos del equipo CFX96 Real-time System (Bio-Rad) que se usó como termociclador. El fluorocromo intercalante utilizado para la cuantificación del DNA de las muestras es el SYBR® Green. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 30 segundos a 95°C, 40 ciclos (5 segundos a 95°C para la desnaturalización, y 30 segundos a 60°C para el anillamiento y la extensión) y un ciclo de disociación, para comprobar la obtención de un único producto de amplificación en la reacción.

Para poder cuantificar la cantidad de un gen en la muestra de cDNA, es necesario realizar una recta patrón, representando el ciclo umbral de amplificación exponencial (Cq), frente a la cantidad relativa de DNA. En la recta se representan 5 diluciones seriadas de 10 en 10 a partir de una muestra de cDNA total. A cada punto de esta recta se le otorga un valor arbitrario a partir de los cuales el equipo estima la cantidad de DNA presente en las muestras problema. Los datos se analizaron utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad).

e) Mutagénesis al azar:

La obtención de alelos mutantes de *RPL16BΔi* se llevó a cabo mediante mutagénesis al azar *in vitro*, utilizándose 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 y reactivos suministradas por el Kit y se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones del Kit:

El alelo *RPL16BΔi* clonado en el plásmido YCplac111 (*CEN*, *LEU2*) se amplificó por PCR con la polimerasa de baja fidelidad (Mutazyme II DNA-polymerase) empleando como cebadores los oligonucleótidos *L16BmutF* y *L16BmutR* (**Tabla III de los anexos**) y

optimizando optimizando el número de ciclos y la cantidad de molde para generar mutaciones con baja frecuencia, de 1 a 4 por clon. Así, se obtiene un conjunto de moléculas mutantes, las cuales se utilizan como cebador para amplificar el plásmido completo mediante PCR con una DNA-polimerasa de alta fidelidad (PfuUltra Hi-Fi DNA polymerase). Para eliminar el DNA molde se trata el producto de PCR con la enzima de restricción *DpnI*, una endonucleasa que digiere específicamente el DNA metilado y hemimetilado procedente del plásmido molde y no los productos mutados amplificado *in vitro*. Tras eso, con los vectores resultantes, se transforman las células competentes de *E. coli* DH5 α , obteniéndose así una genoteca de plásmidos mutados.

f) Mutagénesis Dirigida:

Para generar deleciones en el extremo 3' de la ORF de *RPL16B*, que den lugar a truncaciones en la región carboxi-terminal de la proteína, se llevaron a cabo varios ensayos de mutagénesis dirigida *in vitro*. Para ello se utilizaron las enzimas y reactivos suministrados por el Kit “QuickChange Lighting” de Agilent®, siguiéndose el protocolo descrito en el manual de instrucciones del Kit. Los oligonucleótidos que se utilizaron para generar los codones de parada se encuentran en la **tabla III de los anexos**.

g) Secuenciación de DNA:

La determinación de la secuencia nucleotídica de los distintos fragmentos de DNA, señalados anteriormente a lo largo de esta memoria, fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación automática de DNA de la Universidad de Salamanca. Entre otros se secuenciaron:

- Los plásmidos portadores de alelos *RPL16A*, *RPL16B* y *RPL16B_{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 *F1L16A*, *F2L16A*, *F3L16A*, *R1L16A*, *R2L16A* y *R3L16A* (para *RPL16A*), *F1L16B*, *PromL16B*, *F4L16B*, *F5L16B*, *R1L16B*, *O1235* y *R4L16B* (para *RPL16B* y para *RPL16B_{Δi}*).

- Los alelos *rpl16b_{Δi}** de los plásmidos obtenidos tanto por mutagénesis al azar como por mutagénesis dirigida, para comprobar qué mutaciones portaban los alelos *RPL16B_{Δi}*. Se utilizaron los oligonucleótidos *PromL16B* y *O1235*.

- Los plásmidos generados portadores de alelos mutantes fusionados al epítipo FLAG para asegurarnos de su correcta clonación. Se utilizaron los oligonucleótidos *PromL16B* y *O1235*.

h) Oligonucleótidos empleados en distintas reacciones de PCR y secuenciación del DNA:

En la **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.

3.7 Técnicas de manipulación y análisis de RNA

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

El RNA total de *S. cerevisiae* se preparó siguiendo el protocolo descrito por (Hinnebusch, 1985) para analizar preferentemente las cantidades netas de diferentes mRNA, o siguiendo el protocolo fenol-ácido (Schmitt *et al.*, 1990), para analizar los niveles de los rRNA. La estimación de la concentración del RNA 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 µg/ml en el caso del RNA (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.

b) Electroforesis de RNA en geles capilares:

La calidad y cantidad de los rRNA maduros se valoró analizando ~1 µg del RNA total disuelto en 10 µl de agua MiliQ (100 ng/ µl) por electroforesis capilar en gel utilizando chips de RNA y un bioanalizador (Agilent Bioanalyzer®) en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca.

c) Hibridación de RNA:

- **Detección de secuencias de RNA 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 RNAs de alto peso molecular (tanto rRNA como mRNA), 10-12 µg de RNA total o un volumen fijo de muestra (10 µl), se secaron mediante una centrifuga conectada a una bomba de vacío y se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos en 10 µl de tampón de carga para RNA (formamida desionizada al 50%, formaldehído al 16.2% [de una solución stock al 37%] y MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico] 0.02 M). Después, se añadieron 2 µl de tampón de electroforesis 6X (Azul de bromofenol 0.25% (p/v), glicerol 30%

Materiales y Métodos

(v/v), agua DEPC 0.1% (dietilpirocarbonato) y 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml preparado con agua DEPC) por cada 10 µg de RNA. Los RNAs se resolvieron en función de su tamaño mediante 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 7.0 para la electroforesis, y en condiciones de recircularización del mismo entre los dos electrodos para evitar su 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 (dodecilsulfato sódico) al 1%. Para visualizar el RNA se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 20 minutos en solución alcalina (NaOH 0.01 M, NaCl 3 M), y se transfirieron durante 4-5 horas a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) en la misma solución alcalina según el procedimiento descrito por (Sambrook and Russell, 2001). Para finalizar se lavaron las membranas en 6X SSC (citrato sódico salino) durante 5 minutos, se dejaron secar a temperatura ambiente y los RNAs se fijaron utilizando un UV-Stratalinker 2400.

- Para analizar los rRNAs de bajo peso molecular, las muestras que contenían ~5 µg de RNA total, se secaron mediante una centrífuga conectada a una bomba de vacío y se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos en 15 µl de tampón de carga (formamida al 90%, EDTA 1 mM pH 8.0, azul de bromofenol 0.1% y xilencianol 0.1%). A continuación, los RNAs se separaron por electroforesis durante ~5 horas a 220 V en geles del 6-8% de acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 8 M, TEMED (tetrametiletilendiamina) al 0.037%, APS (persulfato amónico) al 0.07%, preparados en TBE 1X (Tris 0.09 M, ácido bórico 0.09 M, EDTA 0.02 M pH 8.3). Posteriormente los RNAs 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 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 RNAs ribosómicos 25S y 18S y la eficiencia de las transferencias. Para ello las membranas se sumergen en una solución de ácido acético al 5% durante 15 minutos. Posteriormente se añade azul de metileno, el cual 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 RNA se realizó mediante

hibridación con sondas específicas de DNA marcadas radiactivamente.

- Los fragmentos de DNA de doble cadena utilizados como sondas se marcaron radiactivamente 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 DNA *in vitro*. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de las distintos componentes (Roche), utilizándose como molécula radiactiva [α -³²P]-dCTP (Perkin Elmer) con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Para purificar las moléculas de DNA marcadas se utilizaron columnas MicroSpin™ G-25 (GE Healthcare).

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

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 DNA (sondas genómicas de doble cadena) – RNA:

Las membranas se pre-hibridaron durante 1 hora o más, a 65°C en 10 ml del tampón Church and Gilbert, que contiene 0.25 M tampón fosfato pH 7.1-7.2, BSA (albúmina de suero bovino) al 1%, EDTA 10 mM y SDS al 7% (Church and Gilbert, 1984), y 150 μ g/ml de ssDNA desnaturizado. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 65°C, durante aproximadamente 16 horas en 5 ml del mismo tampón Church and Gilbert al que se le añadió la sonda correspondiente desnaturizada marcada radiactivamente, junto con 150 μ g/ml de ssDNA. Los lavados de las membranas se realizaron con una solución que contenía 0.1X SSC y 0.1% SDS durante 30 y 40 minutos a 65°C.

- Hibridaciones de DNA (oligonucleótidos) – RNA:

Se pre-hibridaron las membranas durante 1-2 horas a 52°C en 10 ml de tampón Church and Gilbert (Church and Gilbert, 1984) y después se hibridaron en 5 ml del mismo tampón Church and Gilbert junto con las sondas correspondientes desnaturizadas 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 una solución 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 equipo M35 X-OMAT Processor (Kodak).

d) Ensayos de *Primer Extension*:

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

Con cantidades equivalentes a ~3 µg de cada RNA total purificado, se amplificaron los extremos 5' de las especies precursoras 27S pre-rRNA, utilizando una transcriptasa reversa (Superscript® III Reverse Transcriptase, Invitrogen) y el oligonucleótido **E-C2**, (**Tabla IV de los Anexos**) marcado radiactivamente con 50 µCi de [γ -³²P]-ATP (6000 Ci/mmol) (Perkin Elmer), utilizando la polinucleótido kinasa del fago T4 (Thermo). Cada reacción de retrotranscripción que contenía además del híbrido oligo-RNA, 10 u de la enzima, dNTPs 10 mM (Roche) y 20 u de RNAsin (Promega), se incubó durante 90 minutos a 46°C. Posteriormente se trató cada reacción con 6 µl de NaOH 1 M y 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0, manteniéndose estas reacciones a 55°C durante 30 minutos, para hidrolizar el RNA del híbrido DNA-RNA. A continuación se añadió a la mezcla de reacción 6 µl de HCl 1 M y el DNA se precipitó con 4 µl de glicógeno 5 mg/ml, 30 µl de NH₄OAc 7.5 M y 250 µl de Etanol 100%.

Después, se resuspendieron las muestras en el tampón de carga (95% formamida, 0.05% xilencianol, 0.05% azul de bromofenol en EDTA 20 mM pH 8.0) y se separaron por electroforesis durante 6 horas y media a 450 V en geles del 6% de acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 8 M, TEMED al 0.06%, APS al 0.1%, preparados en 1X TBE. El gel se colocó sobre un papel Whatman™ (3MM) y se secó durante 90 minutos a 80°C gracias a una bomba de vacío. Finalmente, se expuso en pantallas BAS-III (Fuji) durante 12-24 horas, pudiéndose

cuantificar la radiación emitida utilizando un Phosphorimager (Personal Molecular Imager, Bio-Rad).

3.8 Marcado de Pulso y Caza de rRNAs precursores y maduros con [5,6-³H] uracilo :

Para llevar a cabo los marcajes de pulso y caza con uracilo tritiado, las cepas se incubaron en SD a 28°C, y bien se mantuvieron a esta temperatura hasta un $OD_{600\text{ nm}} = 1.0$, o se transfirieron durante 8 horas a 37°C, hasta alcanzar esa misma densidad óptica.

Las células se recogieron y se resuspendieron en 1ml de SD, al que se le añadió 100 μCi de [5,6-³H] uracilo (Perkin Elmer) durante 2 minutos (Pulso).

Para realizar las “cazas” se diluyeron 200 μl de las células marcadas uracilo tritiado en 1.8 ml de SD+Ura (1 mg/ml), que se incubaron durante el tiempo indicado en cada experimento a 28°C o 37°C. A tiempo 0 y una vez transcurrido el tiempo de caza, las células se lavaron con agua miliQ enfriada en hielo, se recogieron y se congelaron en nitrógeno líquido.

Posteriormente se extrajeron los RNAs totales siguiendo el método de fenol ácido (Schmitt *et al.*, 1990).

La incorporación de uracilo tritiado se midió en un contador de centelleo, y se resolvieron 20.000 cpm en geles de agarosa al 1.2% con formolaldehído al 4%, ó poliacrilamida al 7% con urea 8M, tal como se especifica en el apartado anterior. Tanto las transferencias a membranas cargadas positivamente, como la fijación de los RNAs a las mismas, se llevó a cabo de la misma manera descrita para los ensayos de Northern blot.

Las membranas se expusieron en pantallas BAS-TR2040s, específicas para detectar la emisión del tritio, y se leyeron en un phosphorimager (Personal Molecular Imager, Bio-Rad). Posteriormente las membranas se expusieron en películas autorradiográficas Hyperfil[®] MP (Amersham Biosciences), con pantallas intensificadoras especiales para tritio (Transcreen LE, Kodak).

3.9 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 totales a partir de cultivos celulares en las condiciones de crecimiento que se detallan en la sección de resultados. a los que se añadió cicloheximida en una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$. Para preparar los extractos se utilizó el siguiente tampón de

Materiales y Métodos

lisis: Tris HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 30 mM, 2% de Heparina, 10% de cicloheximida, agua DEPC. Después, se cargaron 10 DO de cada extracto en gradientes de sacarosa (7% - 47%) preparados en un tampón de que contiene Tris HCl 50 mM (pH 7.5), NH₄Cl 50 mM, MgCl₂ 12 mM, DTT(ditiotreitol) 1 mM, 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, se obtuvo el perfil utilizando un equipo ISCO UA-6 con una continua monitorización de A₂₅₄, con los siguientes parámetros:

- Para separar las subunidades ribosómicas 40S y 60S, se emplearon tampones con bajas cantidades de Mg²⁺ y en ausencia de cicloheximida (Foiani *et al.*, 1991). Para obtener los extractos celulares se utilizó el siguiente tampón de lisis: Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, agua DEPC) y azida sódica 1 M (NaN₃). 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, en una ultracentrífuga Beckman a 4°C. Finalmente se obtuvo el perfil con una continua monitorización de A₂₅₄ usando el equipo ISCO UA-6, con los parámetros:

3.10 Técnicas de manipulación y análisis de proteínas

a) Obtención de extractos proteicos:

Se prepararon extractos totales de proteínas de *S. cerevisiae* por extracción con ácido tricloroacético (TCA) como se describe en (Reid and Schatz, 1982), donde tras recoger las células se resuspenden en 1 ml de TCA al 20% , se rompen con bolas de vidrio (Ø 0.75–1 mm) utilizando una FastPrep FP120 (Bio101 Savant), se lavan con 200 µl de TCA al 5%, y se recoge el lisado de células mediante centrifugación a 3.000 rpm. A continuación se pesa la biomasa del precipitado que 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 200 mM y trazas de azul de bromofenol) para tratar de igualar la cantidad de proteína presente en todas las muestras. Finalmente se añadió Tris-Base 2 M y se desnaturalizaron las muestras por calor a 100°C durante 5 minutos, antes de congelarlas a -80°C hasta su uso.

b) Determinación de la cantidad de proteína:

La determinación de la concentración total de proteínas se realizó siguiendo la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo *protein assay dye* (BioRad) y un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 595 nm. Como referencia, se utilizó una recta patrón realizada con BSA a diferentes concentraciones.

c) **Detección de proteínas:**

Los extractos celulares preparados se desnaturalizaron por calor a 100°C y se centrifugaron durante 1 minuto. 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). A continuación, las proteínas de los geles se **electrotransfirieron** 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) 10 mM (pH 11.0) en frío durante 1 hora a 300 mA. Para comprobar si la transferencia había ocurrido correctamente, las membranas se tiñieron con *Rojo Ponceau* (Sigma).

Posteriormente las membranas se trataron con una solución de **bloqueo** TBST (Tris-HCl 20 mM (pH 7.6), NaCl 137 mM, Tween 20 0.1%) con BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y después se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios indicados en la sección de resultados. Para visualizar las proteínas de interés, se empleó el kit Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) que permite detectar la señal de quimioluminiscencia emitida por la acción de la peroxidasa asociada al anticuerpo secundario (HRP, *horseradish peroxidase*). Finalmente, las membranas se expusieron en películas CP-BU NEW (Agfa) que se revelaron en un equipo M35 X-OMAT Processor, Kodak.

d) **Purificación por afinidad de pre-partículas ribonucleoproteicas usando microesferas de sefarosa conjugadas con anticuerpo anti-FLAG:**

La inmunoprecipitación de proteínas unidas al epítipo FLAG con micro-esferas de sefarosa conjugadas con un anticuerpo anti-FLAG se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Neueder *et al.*, 2010 con las siguientes modificaciones:

El pellet de células correspondiente a 250 ml de cultivo con un $DO_{600} = 0.8-1.0$ se resuspendió en 1.5 ml de buffer A200 frío (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 1 mM DTT, 2 mM Benzamidina, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsufonilo) y RNAsin 0.04 U/ μ l) por gramo de pellet. Después se preparó un lisado celular agitando vigorosamente la suspensión celular con 1.4 ml de bolas de vidrio (\varnothing 0.75–1 mm) en un agitador IKA VibraX VXR a 4°C durante 15 minutos seguido de 2 minutos en hielo. Este paso se repitió dos veces. El extracto proteico se limpió de los restos celulares con dos pasos de centrifugación, de 5 y 10 minutos a 14.000 rpm respectivamente, siendo ambos a 4°C. A continuación se determinó la concentración de proteína por Bradford y se añadió Triton X-100 y Tween 20 a una concentración final de 0.5% (m/v) 0.1% (m/v), respectivamente. En este punto

se retiró un 1% (v/v) del lisado tanto para análisis de “western blot” como de “northern blot” (fracción “Input”). Las microesferas de sefarosa conjugadas con el anticuerpo anti-FLAG (anti FLAG-coupled M2 Beads, Sigma) se equilibraron en buffer A200 con 0.5% Triton X-100 y 0.1% Tween 20 y posteriormente se incubaron 100 µl de estas microesferas con la misma cantidad de proteína de cada muestra durante 1 hora a 4°C. Después de la incubación las bolas se lavaron 7 veces (1x1 ml, 5x2 ml y 1x10 ml) con buffer A200 frío en una columna de 10 ml de BioRad. Finalmente un 10% de las bolas se separaron para ser usadas como muestra en ensayos de “western blot” y del 90% restante se extrajo RNA que se utilizó en ensayos de “northern blot” como previamente se ha descrito.

e) **Purificación por afinidad de pre-partículas ribonucleoproteicas usando microesferas magnéticas conjugadas con IgG:**

El factor de biogénesis de ribosomas Noc2 fusionado al epítipo TAP y las partículas pre-ribosómicas asociadas se purificaron a partir de extractos celulares en un solo paso usando bolas magnéticas conjugadas a IgG de conejo siguiendo el protocolo descrito por Oeffinger *et al.*, 2007. El pellet de células correspondiente a 1 l de cultivo con un $DO_{600} = 0.8-1.0$ se resuspendió en 1.5 ml de buffer A200 frío (20 mM Tris HCl pH 8.0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 1 mM DTT, 2 mM Benzamidina, 1 mM PMSF y RNAsin 0.04 U/µl) por gramo de pellet y a continuación se rompió de la misma forma que en el caso anterior. Se procedió de igual manera que en el experimento anterior, excepto que la misma cantidad de cada extracto celular se incubó con 200 µl de microesferas magnéticas (1 mm BcMag, FC-102, Bioclone) conjugadas a IgG (suero de conejo, I5006-100MG, Sigma) durante 1 hora a 4°C. Las microesferas se lavaron cuatro veces con 1 ml de buffer A200 y se retiró el 20% de la suspensión para análisis de RNA por “northern blot”. El resto de la suspensión se lavó dos veces con 1 ml del buffer AC (100 mM NH_4OAc pH 7.4, 0.1 mM $MgCl_2$) para eliminar los restos de sales de las muestras. Finalmente las proteínas unidas se eluyeron dos veces con 500 µl una solución de $NH_4 OH$ 500 mM durante 20 minutos a temperatura ambiente y ambas fracciones se juntaron y se liofilizaron durante la noche para posteriores procesos de espectrometría de masas.

f) **Análisis comparativos MALDI TOF/TOF (iTRAQTM):**

Estos análisis se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jakob *et al.*, 2012 y Ross *et al.*, 2004. Las muestras de proteína liofilizada se resuspendieron en 20 µl de buffer de disolución (kit de marcaje iTRAQTM, Invitrogen) y se redujeron con 5 mM Tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) a 60°C durante una hora. Además, las cisteínas se bloquearon con 10 mM metil-metanotiosulfonato (MMTS) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las proteínas se digirieron con tripsina durante 20 h a 37°C, se marcaron con diferentes

combinaciones de los cuatro reactivos de iTRAQ™ siguiendo las instrucciones del kit (Invitrogen) y se mezclaron y liofilizaron.

Las mezclas con los péptidos diferentemente marcados durante 2 horas se incubaron en 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) y se cargaron en un sistema de HPLC nano-flow que tenía una columna C18-Pep-Mep (LC-Packings). Los péptidos se separaron en un gradiente del 5% al 95% de buffer B (80% acetonitrilo/0.05% TFA) y las fracciones se mezclaron con 5 volúmenes de una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA, Sigma) y se colocaron ordenadamente en un chip MALDI con un sistema denominado Probot system (Dionex).

Los análisis MS/MS se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer operando en modo reflector de iones. Estos análisis se evaluaron buscando en la base de datos de secuencias proteicas NCBIInr, con el motor de búsqueda Mascot (Matrix Science) implementado en el software GPS Explorer (Applied Biosystems). La intensidad del láser se ajustó a la condición del mismo y a la concentración de la muestra. Los ocho picos de péptidos más intensos por punto se detectaron en el modo MS y se fragmentaron posteriormente, dando el respectivo espectro MS/MS.

Finalmente, el área de los picos de los iones “reporter” iTRAQ™ se interpretó y se corrigió con los software GPS Explorer (Applied Biosystems) y Excel (Microsoft), calculándose un ratio medio iTRAQ de todos los péptidos para una proteína dada.

g) Medida de la actividad β -galactosidasa de proteínas de fusión (GCN4::LacZ, HIS4::LacZ y PGK::LacZ):

La actividad β -galactosidasa se cuantificó siguiendo el protocolo descrito por Lee *et al.* 2007:

Partiendo de cultivos celulares en fase exponencial ($DO_{600} = 0.8$) se prepararon extractos proteicos según el protocolo descrito por (Burke, 2000) utilizando tampón de lisis (Tris-HCl 0.1 M, glicerol al 20%, β -mercaptoetanol al 0.007%), 6.25 μ l de PMSF 40 mM y bolas de vidrio (\emptyset 0.75–1 mm). Después se añadió a 100 μ l de cada extracto 400 μ l de buffer Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40 mM, KCl 10 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, pH 7.0) (Miller, 1972) y cada reacción se incubó con 100 μ l ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) a una concentración 4 mg/ml a 30°C hasta que el color de las muestras viró a amarillo, momento en el que la reacción se detuvo añadiendo con 250 μ l de Na_2CO_3 1 M. Posteriormente se determinó la concentración de proteína de cada extracto mediante el método de Bradford y se calculó la **actividad β -galactosidasa** como nanomoles de ONPG hidrolizado por minuto y por miligramo total de proteína según la siguiente fórmula:

Materiales y Métodos

$$\text{Actividad } \beta\text{-Gal: } \frac{\text{Abs}_{420 \text{ nm}} \times 0.85 / 0.0045}{\text{tiempo (min)} \times \text{vol.extracto (ml)} \times \text{prot. total } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}$$

Donde 0.85 ml es el volumen final de reacción y se considera que una absorbancia a 420 nm de 1 equivale a una concentración 0.0045 nmol/ml.

Para inducir la **desrepresión del CGBA**, los cultivos se incubaron a 28°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.4$ y posteriormente se añadió sulfometuron metilo a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ durante 6 horas.

Bibliografía

- 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
- Abraham A. K. and Pihl A. 1983. Effect of protein synthesis inhibitors on the fidelity of translation in eukaryotic systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **741**: 197-203
- 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
- Aitken C. E. and Lorsch J. R. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol.* **19**: 568-76
- 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
- Alkalaeva E.Z., Pisarev A.V., Frolova L.Y., Kisselev L.L. and Pestova T.V. 2006. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**: 1125–1136.
- 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
- Altvater M., Chang Y., Melnik A., Occhipinti L., Schütz S., Rothenbusch U., Picotti P. and Panse V.G. 2012. Targeted proteomics reveals compositional dynamics of 60S pre-ribosomes after nuclear export. *Mol Syst Biol.* **8**:628.
- Andersen C.B., Becker T., Blau M., Anand M., Halic M., Balar B., Mielke T., Boesen T., Pedersen J.S., Spahn C.M., Kinzy T.G., Andersen G.R. and Beckmann R. 2006. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* **443**: 663–668.
- 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-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 19748-53
- Asano K., Krishnamoorthy T., Phan L., Pavitt G.D. and Hinnebusch A.G. 1999. Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *EMBO J.* **18**(6):1673-88.
- 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
- 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
- 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

- Ball S. 2011. Diamond Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. **2011**: 487-91
- Ban N., Beckmann R., Cate J.H., Dinman J.D., Dragon F., Ellis S.R., Lafontaine D.L., Lindahl L., Liljas A., Lipton J.M., McAlear M.A., Moore P.B., Noller H.F., Ortega J., Panse V.G., Ramakrishnan V., Spahn C.M., Steitz T.A., Tchorzewski M., Tollervey D., Warren A.J., Williamson J.R., Wilson D., Yonath A. and Yusupov M. 2014. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol*. **24**:165-9.
- Bange G., Murat G., Sinning I., Hurt E. and Kressler D. 2013. New twist to nuclear import: when two travel together. *Commun Integr Biol*. **6**: e24792
- 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., Gadai O., Lessmann T., Petfalski E., Tollervey 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., 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 A., Poddar D., Robinet P., Smith J. D., Febbraio M., Baldwin W. M., 3rd and Mazumder B. 2014. Ribosomal protein L13a deficiency in macrophages promotes atherosclerosis by limiting translation control-dependent retardation of inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **34**: 533-42
- Baudin-Baillieu A., Fabret C., Liang X. H., Piekna-Przybylska D., Fournier M. J. and Rousset J. P. 2009. Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acid Res*. **37**: 7665-77
- 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
- Baxter-Rosheck J. L., Petrov A. N., and Dinman J. D. 2007. Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PLoS One*. **2**: e174
- Becker T., Franckenberg S., Wickles S., Shoemaker C.J., Anger A.M., Armache J.P., Sieber H., Ungewickell C., Berninghausen O., Daberkow I., Karcher A., Thomm M., Hopfner K.P., Green R. and Beckmann R. 2012. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**: 501–506.
- Beltrame M., Henry Y. and Tollervey 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
- Benne R. and Hershey J.W.B. 1978. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*. **253**: 3078-3087
- 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
- Boeke J. D., LaCrout 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
- 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
- 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
- Calviño F.R., Kharde S., Ori A., Hendricks A., Wild K., Kressler D., Bange G., Hurt E., Beck M. and Sinning I. 2015. Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nat Commun.* **7**:6:6510
- 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
- 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
- Carvalho C. M., Santos A. A., Pires S. R., Rocha C. S., Saraiva D. I., Machado J. P., Mattos E. C., Fietto L. G. and Fontes E. P. 2008. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *Plos pathog.* **4**: e1000247
- 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
- Choi S.K., Lee J.H., Zoll W.L., Merrick W.C. and Dever T.E. 1998. Promotion of met-tRNAⁱMet binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. *Science.* **280**(5370):1757-60.
- 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
- Ciganda M., and Williams N. 2001. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rep RNA.* **2**(4): 523-33
- Cole S.E., LaRiviere F. J., Merrick C. N. and Moore M. J. 2009. A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. *Mol Cell.* **34**: 440-50
- 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
- Das P., Basu A., Biswas A., Poddar D., Andrews J., Barik S., Komar A.A. and Mazumder B. 2013. Insights into the mechanism of ribosomal incorporation of mammalian L13a protein during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* **15**:2829-42.
- Dauwerse J. G., Dixon J., Seland S., Ruivenkamp C. A., van Haeringen A., Hoefsloot L. H., Peters D. J., Boers A. C., Daumer-Haas C., Maiwald R., Zweier C., Kerr B., Cobo A. M., Toral J. F., Hoogeboom A. J., Lohmann D. R., Hehr

- U., Dixon M. J., Breuning M.H. and Wieczorek D. Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher-Collins syndrome. *Nat Genet.* **43**: 20-22
- de la Cruz J., Kressler D., Tollervey D. and Linder P. 1998a. 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**(4):1128-40.
- de la Cruz J., Kressler D., Rojo M., Tollervey D. and Linder P. 1998b. Spb4p, an essential putative RNA helicase, is required for a late step in the assembly of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **4**(10):1268-81
- de Las Heras-Rubio A., Perucho L., Paciucci R., Vilardell J. and Leonart 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
- 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
- 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., Yang W., Astrom S., Bystrom A.S. and Hinnebusch A. G. 1995. Modulation of tRNA_i^{Met}, eIF2 and eIF2B expression shows that GCN4 translation inversely coupled to the level of eIF2·GTP·Met-tRNA_i^{Met} ternary complexes. *Mo Cell Biol.* **15**: 6351-63
- 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
- Dez C., Houseley J. and Tollervey D. 2006. Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **25**: 1534-46
- 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**(1):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**(6):3669-76.
- Dinman J. D. 2009. The eukaryotic ribosome: current status and challenges. *J. Biol. Chem.* **284**: 11761-65
- 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
- Dragon F., Gallagher J. E., Compagnone-Post P. A., Mitchell B. M., Porwancher K. A., Wehner K. A., Wormsley S., Settlage 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
- Dunbar D. A., Dragon F., Lee S. J. and Baserga S. J. 2000. A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 13027-32
- 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
- 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
- Eyler D.E. and Green R. 2011. Distinct response of yeast ribosomes to a miscoding event during translation. *RNA* **17**: 925–932.
- 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
- Falco S. C. and Dumas K. S. 1985. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *Genetics.* **109**: 21-35
- Fatica A., Cronshaw A. D., Dlakic M. and Tollervey D. 2002. Ssf1 prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell.* **9**: 341-51
- Fatica A., Oeffinger M., Dlakic M. and Tollervey D. 2003. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol.* **23**: 1798-807
- 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
- Fernandez-Pevida A., Kressler D. and de la Cruz J. 2014. Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*.
- 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
- Filipovska A. and Rackham O. 2013. Specialization from synthesis: how ribosome diversity can customize protein function. *FEBS Lett.* **587(8)**: 1189-97
- Finch A. J., Hilcenko C., Basse N., Drynan L. F., Goyenechea B., Menne T. F., Gonzalez-Fernandez A., Simpson P., D'Santos C. S., Arends M. J., Donadieu J., Bellanné-Chantelot C., Costanzo M., Boone C., McKenzie A. N., Freund S. M., Warren A. J. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* **25**: 917-29

- 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
- 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. 2014a. A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev.* **28**: 198-210
- Gamalinda M. and Woolford J. L., Jr. 2014b. Deletion of L4 domains reveals insights into the importance of ribosomal protein extensions in eukaryotic ribosome assembly. *RNA.* **20**: 1-7
- 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 eIF2alpha kinase activities of GCN2. *J Biol Chem.* **277**: 30675-83
- Garcia-Gomez J. J., Fernandez-Pevida 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
- Gazda H. T., Preti M., Sheen M. R., O'Donohue M. F., Vlachos A., Davies S. M., Kattamis A., Doherty L., Landowski M., Buros 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
- Gerbasi V. R., Weaver C. M., Hill S., Friedman D. B. and Link A. J. 2004. Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functional orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol.* **24**: 8276-87
- Gerhardy S., Menet A.M., Peña C., Petkowski J.J. and Panse V.G.. 2014. Assembly and nuclear export of pre-ribosomal particles in budding yeast. *Chromosoma.* **123**(4):327-44.

- 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
- Gigova A., Duggimpundi S., Pollex T., Sachafer M. and Kos M. 2014. A cluster of methylation in the domain IV of 25S rRNA is required for ribosome stability. *RNA.* **20**: 1632-44
- Gilbert W. V. 2011. Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci.* **36**: 127-32
- Gomez-Herreros F., Rodriguez-Galan O., Morillo-Huesca M., Maya D., Arista-Romero M., de la Cruz J., Chavez S. and Muñoz-Centeno M. C. 2013. Balanced production of ribosome components is required for proper G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **288**: 31689-700
- Goudarzi K. M., Nistér M. and Lindström M. S. 2014. mTOR inhibitors blunt the p53 response to nucleolar stress by regulating RPL11 and MDM2 levels. *Cancer Biol. Ther.* **15**: 1499-514
- Graillie M. and Seraphin B. 2012. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**: 727-35
- 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**(1):43-50.
- 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 intercistronic 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
- Grollman A. P. 1967. Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem.* **242**: 3226-33
- Gunisova S. and Valasek L. S. 2014. Fail-safe mechanism of *GCN4* translational control--uORF2 promotes reinitiation by analogous mechanism to uORF1 and thus secures its key role in *GCN4* expression. *Nucleic Acids Res.* **42**: 5880-93
- Guydosh N.R. and Green R. 2014. Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell.* **156**(5):950-62.
- 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
- 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
- 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
- Heiss N. S., Knight S.W., Vulliamy T. J., Klauck S. M., Wiemann S., Mason P. J., Poustka A., and Dokal I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet*. **19**(1): 32-38
- 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
- Henras A. K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M. F., Chakraborty A. and Gleizes P. E. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes.
- 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
- Hierlmeier T., Merl J., Sauert M., Perez-Fernandez J., Schultz P., Bruckmann A., Hamperl S., Ohmayer U., Rachel R., Jacob A., Hergert K., Deutzmann R., Griesenbeck J., Hurt E., Milkereit P., Baßler J., Tschochner H. 2013. Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acid Res*. **41**(2): 1191-210
- 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. 2011. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. **75**: 434-67
- 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
- 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

- Holmes D. S. and Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**: 193-7
- 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
- Hovanessian A.G. 1991. Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2',5'-oligoadenylate synthetases. *J Interferon Res.* **11**(4):199-205.
- 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
- Hughes J.M., Konings D.A. and Cesareni G. 1987. The yeast homologue of U3 snRNA. *EMBO J.* **6**(7):2145-55.
- 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
- 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
- Ingolia N. T., Ghaemmaghami S., Newman J. R. and Weissman J. S. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* **324**: 218-23
- 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
- Jackson R. J., Hellen C. U. and Pestova T. V. 2012. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv Protein Chem Struct Biol.* **86**: 45-93
- 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
- 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**(2):113-27.
- 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
- Jin A., Itahana K., O'Keefe K. and Zhang Y. 2004. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol cell Biol.* **24**: 7669-80
- 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

- 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
- 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
- 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. 2010. Chaperoning ribosome assembly. *J Cell Biol.* **189**: 11-12
- 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
- Kapasi P., Chaudhuri S., Vyas K., Baus D., Komar A. A., Fox P. L., Merrick W. C. and Mazumder B. 2007. L13a Blocks 48S Assembly: Role of a General Initiation Factor in mRNA-Specific Translational Control. *Cell.* **25**: 113-26
- Kaser A., Bogengruber E., Hallegger M., Doppler E., Lepperdinger G., Jantsch M., Breitenbach M. and Kreil G. 2001. Brix from *xenopus laevis* and brx1p from yeast define a new family of proteins involved in the biogenesis of large ribosomal subunits. *J Biol Chem.* **382**(12):1637-47.
- Kennedy B. K. and Kaeberlein M. 2009. Hot topics in aging research: protein translation, 2009. *Aging Cell.* **8**: 617-23
- Kinzy T. G., Harger J. W., Carr-Schmid A., Kwon J., Shastry M., Justice M. C. and Dinman J. D. 2002. New targets for antivirals: the ribosomal A-site and the factors that interacts with it. *Virology.* **300**: 60-70
- 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
- Koch B., Mitterer V., Niederhauser J., Stanborough T. Murat G. Rechberger G., Bergler H., Kressler D. and Pertschy B. 2012. Yar1 protects the ribosomal protein Rps3 from aggregation. *J Biol Chem.* **287**: 21806-15
- 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
- Koplin A., Preissler S., Ilina Y., Koch M., Scior A. *et al.* 2010. A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosome. *J Cell Biol.* **189**: 57-68
- Kos M. and Tollervey D. 2010. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell.* **37**: 809-20
- Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol.* **108**: 229-41
- Kozak M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* **299**: 1-34
- 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**(4):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., Bange G., Ogawa Y., Stjepanovic G., Bradatsch B., Pratte D., Amlacher S., Strauß D., Yoneda Y., Katahira J., Sinning I. and Hurt E. 2012. Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science*. **338**: 666-71
- 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
- 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
- Lacombe T., García-Gómez J.J., de la Cruz J., Roser D., Hurt E., Linder P. and Kressler D. 2009. Linear ubiquitin fusion to Rps31 and its subsequent cleavage are required for the efficient production and functional integrity of 40S ribosomal subunits. *Mol Microbiol*. **72(1)**:69-84.
- 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 *DIMI* gene responsible for the conserved m(6)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. 2010. A 'garbage can' for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes. *Trends Biochem Sci*. **35**: 267-77
- Lageix S., Rothenburg S., Dever T. E. and Hinnebusch A. G. 2014. Enhanced interaction between pseudokinase and kinase domains in Gen2 stimulates eIF2alpha phosphorylation in starved cells. *PLoS Genet*. **10**: e1004326
- Lamanna A. C. and Karbstein K. 2009. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**: 14259-64
- Lamanna A. C. and Karbstein K. 2011. An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage. *J Mol Biol*. **405**: 3-17
- LaRiviere F. J., Cole S. E., Ferullo D. J. and Moore M. J. 2006. A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell*. **24**: 619-26
- LaRossa R. A. and Scholss J. V. 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J Biol. Chem*. **259**: 8753-7
- 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. 2006. Nsa2 is an unstable, conserved factor required for the maturation of 27SB pre-rRNAs. *J Biol Chem*. **281**: 27099-108
- Lebreton A., Rousselle J.C., Lenormand P., Namane A., Jacquier A., Fromont-Racine M. and Saveanu C. 2008. 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res*. **36(15)**:4988-99
- 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

- Lee B., Udagawa T., Singh C. R. and Asano K. 2007. Yeast phenotypic assays on translational control. *Methods Enzymol.* **429**: 105-37
- Lee A.S., Burdeinick-Kerr R. and Whelan SP. 2013. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**(1):324-9.
- 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., Choesmel 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
- Lemaire P.A., Anderson E., Lary J. and Cole J.L. 2008. Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J Mol Biol.* **381**(2):351-60
- 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
- Lindahl L., Bommankanti 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 B., Han Y. and Qian S. B. 2013. Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. *Mol Cell.* **49**: 453-63
- 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
- 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
- Lygerou Z., Allmang C., Tollervey 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
- 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
- Marquez-Jurado S., Nogales A., Zuñiga S., Enjuanes L. and Almazan F. 2015. Identification of a gamma interferon-activated inhibitor of translation-like RNA motif at the 3' end of the transmissible gastroenteritis coronavirus genome modulating innate immune response. *MBio.* **6**(2) :e00105
- 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
- Martin-Marcos P., Nanda J., Luna R.E., Wagner G., Lorsch J.R. and Hinnebusch A.G. 2013. β -Hairpin loop of eukaryotic initiation factor 1 (eIF1) mediates 40 S ribosome binding to regulate initiator tRNA(Met) recruitment and accuracy of AUG selection *in vivo*. *J Biol Chem.* **288**(38):27546-62
- Mašek T., Valášek L. and Pospíšek M. 2011. Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. *Methods Mol Biol.* **703**:293-309.

- Matsuo Y., Granneman S., Thoms M., Manikas R.G., Tollervey D. and Hurt E. 2014. Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* **505**: 112-16
- Matts R., Levin D. and London I. 1983. Effect of phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2 on the function of reversing factor in the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **80**: 3541-3556
- 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
- Mayer C. and Grummt I. 2006. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* **25**: 6384-91
- Mazumder B., Poddar D., Basu A., Kour R., Verbovetskaya V. and Barik S. 2014. Extraribosomal I13a is a specific innate immune factor for antiviral defense. *J Virol.* **88**: 9100-10
- 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., Harger J. W., Jacobs K. L. and Dinman J. D. 2003. Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. **9**: 982—92
- Meskauskas A., Petrov A.N. and Dinman J.D. 2005. Identification of functionally important amino acids of ribosomal protein L3 by saturation mutagenesis. *Mol Cell Biol*. **25(24)**:10863-74.
- Meskauskas A. and Dinman J. D. 2007. Ribosomal protein L3: gatekeeper to the A site. *Mol Cell*. **25**: 877-88
- Meskauskas A., Russ J. R. and Dinman J. D., 2008. Structure/function analyses of yeast ribosomal protein L2. *Nucleic Acid Res*. **36**: 1826-35
- 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
- Meyer B., Wurm J. P., Kötter P., Leisegang M. S., Schilling V., Buchhaupt M., Held M., Bahr U., Karas M., Heckel A., Bohnsack M. T., Wöhnert J. and Entian K. D. 2011. The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Ψ1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acid Res*. **39(4)**: 1526-37
- 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 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
- 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
- Mitrovich Q.M. and Anderson P. 2000. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C.elegans*. *Genes Dev*. **14**: 2173-84

- Moritz M., Pulaski B.A. and Woolford JL Jr.. 1991. Assembly of 60S ribosomal subunits is perturbed in temperature-sensitive yeast mutants defective in ribosomal protein L16. *Mol Cell Biol.* **11**(11):5681-92.
- Morrissey J. P. and Tollervey D. 1997. U14 small nucleolar RNA makes multiple contacts with the pre-ribosomal RNA. *Chromosoma.* **105**: 515-22
- 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
- Mukhopadhyay R., Ray P. S., Arif A., Brady A. K., Kinter M. and Fox PL. 2008. DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Mol cell.* **32**: 371-82
- 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
- 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
- Occhipinti L., Chang Y., Altvater M., Menet AM., Kemmler S. and Panse VG. 2013. Non-FG mediated transport of the large pre-ribosomal subunit through the nuclear pore complex by the mRNA export factor Gle2. *Nucleic Acid Res.* **41**(17): 8266-79
- Oeffinger M., Fatica A., Rout M.P. and Tollervey D. 2007. Yeast Rrp14p is required for ribosomal subunit synthesis and for correct positioning of the mitotic spindle during mitosis. *Nucleic Acids Res.* **35**(4):1354-66.
- 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
- Ofir-Rosenfeld Y., Boggs K., Michael D., Kastan M. B. and Oren M. 2008. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell.* **32**: 180-89
- 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
- Ohmayer U., Gil-Hernández Á., Sauert M., Martín-Marcos P., Tamame M., Tschochner H., Griesenbeck J. and Milkereit P. 2015. Studies on the Coordination of Ribosomal Protein Assembly Events Involved in Processing and Stabilization of Yeast Early Large Ribosomal Subunit Precursors. *PLoS One.* **12**:e0143768
- 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
- Panasenko O.O. and Collart M. A. 2012. Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol. microbiol.* **83**: 640-53
- 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
- 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

- Pellett S. and Tracy J.W. 2006. Mak16p is required for the maturation of 25S and 5.8S rRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **23**(7):495-506.
- 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
- Peltz S.W., Hammell A.B., Cui Y., Yasenchak J., Puljanowski L. and Dinman J.D. 1999. Ribosomal protein L3 mutants alter translational fidelity and promote rapid loss of the yeast killer virus. *Mol Cell Biol*. **19**(1):384-91.
- 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
- Perez-Fernandez J., Martin-Marcos P. and Dosil M. 2011. Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes. *Nucleic Acid Res*. **39**: 8105-21
- 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
- Petersen N. S. and McLaughlin C. S. 1974. Polysome metabolism in protein synthesis mutants of yeast. *Mol Gen Genet*. **129**: 189-200
- 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
- Petersen N.S. and McLaughlin C.S. 1974. Polysome metabolism in protein synthesis mutants of yeast. *Mol Gen Genet*. **129**(3):189-200.
- Petrov A. N., Meskauskas A., Roshwalb S. C. and Dinman J. D. 2008. Yeast ribosomal protein L10 helps coordinate tRNA movement through the large subunit. *Nucleic Acid Res*. **36**: 6187-98
- 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
- Pisareva V.P., Skabkin M.A., Hellen C.U., Pestova T.V. and Pisarev A.V. 2011. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J*. **30**: 1804–1817.
- 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
- Poddar D., Kaur R., Baldwin W. M., 3rd, and Mazumder B. 2015. L13a-dependent translational control in macrophages limits the pathogenesis of colitis. *Cell Mol 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
- Pratte D., Singh U., Murat G. and Kressler D. 2013. Mak5 and Ebp2 act together on early pre-60S particles and their reduced functionality bypasses the requirement for the essential pre-60S factor Nsa1. *PLoS One* **12**: e82741
- 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

- Rakauskaite 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
- Ray P. S., Arif A., and Fox P. L. 2007. Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*. **32**: 158-64
- 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
- Ripmaster T.L., Vaughn G.P. and Woolford J.L. 1992. A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(23):11131-5.
- Rodriguez-Fonseca C., Amils R. and Garrett R. A. 1995. Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23 S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. *J Mol. Biol*. **247**(2): 224-35
- 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
- Rosado I. V., Kressler D. and de la Cruz J. 2007. Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Res*. **35**: 4203-13
- Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A. and Pappin D. J. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. **12**: 1154-69
- Rout M. P., Blobel G. and Aitchison J. D. 1997. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*. **89**: 715-25
- Rowlands A. G., Panniers R and Henshaw E.C. 1988. The catalytic mechanism of guanine-nucleotide-exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem*. **263**: 5526-5533
- Ruggero D., Grisendi S., Piazza F., Rego E., Mari F., Rao P. H., Cordon-Caro C. and Pandolfi P. P. 2003. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science*. **299**: 259-62
- Sachs A.B., Davis R.W. and Kornberg R.D. 1987. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol*. **7**(9):3268-76.
- 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
- 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*.
- Samuel C.E. 1993. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J Biol Chem*. **268**(11):7603-6
- 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
- Santos-Rosa H., Moreno H., Simos G., Segref A., Fahrenkrog B., Pante N and Hurt E. 1998. Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol*. **18**: 6826-38

- Sauert M., Temmel H. and Moll I. 2015. Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *Biochimie*. **114**: 39-47
- 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., Noaillac-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
- 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
- Schafer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Bottcher B., Aebi U and Hurt E. 2006. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*. **441**: 651-55
- 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
- Schneider-Poetsch T., Ju J., Eyler D.E., Dang Y., Bhat S., Merrick W.C., Green R., Shen B. and Liu JO. 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*. **6**(3):209-217
- Segref A., Sharma K., Doye V., Hellwig A., Huber J., Luhrmann R. and Hurt E. 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J*. **16**: 3256-71
- 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
- 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
- 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. 2011. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci* **108**:E1392–E1398.
- Shoemaker C.J. and Green R. 2012. Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol*. **19**(6):594-601.
- 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
- 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
- Steffen K. K., MacKay V. L., Kerr E. O., Tsuchiya M., Hu D., Fox L. A., Dang N., Johnston E. D., Oakes J. A., Tchao B. N., Pak D. N., Fields S., Kennedy B. K. and Kaerberlein M. 2008. Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell.* **133**: 292-302
- 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., Patchett S., Advani V.M., De Keersmaecker K., Johnson A.W. and Dinman JD. 2014. Bypass of the pre-60S ribosomal quality control as a pathway to oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**(15):5640-5.
- 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
- 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., 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
- Thiel C. T. and Rauch A. 2011. The molecular basis of the cartilage-hair hypoplasia-anaxetic dysplasia spectrum. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **25**: 131-42
- 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
- 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
- Unbehaun A., Borukhv S. I., Hellen C. U. and Pestova T. V. 2004. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* **18**: 3078-93
- Valasek L. S. 2012. 'Ribozomin'--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Curr Protein Pept Sci.* **13**: 305-30
- 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., Lepilus 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., 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
- Veldman G. M., Brand R. C., Kootwijk J. and Planta R. 1980. Some characteristics of processing sites in ribosomal precursor RNA of yeast. *Nucleic Acid Res*. **8**: 2907-20
- 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
- Vyas K., Chaudhuri S., Leaman D. W., Komar A. A., Musiyenko A., Barik S. and Mazumder B. 2009. Genome-wide polysomal profiling reveals an inflammation-response post-transcriptional operon in IFN-γ activated monocytes. *Mol Cell Biol*. **29**: 458-70
- Wan F., Anderson D. E., Barnitz R. A., Snow A., Bidere N., Zheng L., Hegde V., Lam L.T., Staudt L.M., Levens D., Deutsch W. A. and Lenardo M. J. 2007. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell*. **131**: 927-39
- Wan K., Yabuki Y. and Mizuta K.. 2015. Roles of Ebp2 and ribosomal protein L36 in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. **61**(1):31-41.
- 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
- Warner J. R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*. **24**: 437-40
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- Wurm J. P., Meyer B., Bahr U., Held M., Frolow O., Kötter P., Engels J. W., Heckel A., Karas M., Entian K. D. and Wöhnert J. 2010. The ribosome assembly factor Nep1 responsible for Bowen-Conradi syndrome is a pseudouridine-N1-specific methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **38**:2387-98.
- Xiang S., Cooper-Morgan A., Jiao X., Kiledjian M., Manley J.L. and Tong L. 2009. Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature.* **458**: 784–788.
- 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
- 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
- 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
- Young D.J., Guydosh N.R., Zhang F., Hinnebusch A.G. and Green R. 2015. Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell.* **162**(4):872-84.
- Zagulski M., Kressler D., Bécam 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**(3):216-24
- Zemp I., Wild T., O'Donohue M. F., Wandrey F., Wildmann B., Gleizes P. E. and Kutay U. 2009. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J Cell Biol.* **185**: 1167-80
- 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
- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtsov 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

Anexos

Abreviaturas

Δ: deleción

5-FOA: Ácido 5-fluoroorótico

Å: Ångström

cpm: cuentas por millón

CT: Complejo ternario

DR: Desrepresión

eEF: Factor de elongación de la traducción eucariótico

eIF: Factor de inicio de la traducción eucariótico

ES: Expansion segment (segmento de expansión de rRNA)

GCD: General control Derepressed (Efector negativo de la traducción de GCN4)

Gcd-: Fenotipo de desrepresión constitutiva de GCN4

GCN: General Control Non-derepressible (Efector positivo de la traducción de GCN4)

hc: high copy (alto número de copias)

IP: Inmunoprecipitación

iTRAQ: isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation

LOF: Loss of function (pérdida de función)

LSU: Large subunit (subunidad mayor del ribosoma)

NMD: nonsense-mediated RNAm decay (degradación mediada por mRNA sin sentido)

PIC: pre-initiation complex (Complejo de pre-iniciación)

P/M: Cociente Polisomas/Monosomas

PRF: Programmed ribosomal frameshifting (Cambio programado en la fase de lectura)

PTC: Premature termination codon (Codón de terminación prematuro)

R: Represión

RNP: Ribonucleopartículas

RPs: Ribosomal proteins (proteínas ribosómicas)

RPG: Ribosomal protein genes (genes de proteínas ribosómicas)

RPL: Ribosomal protein of large subunit (proteína ribosómica de la subunidad mayor)

RPS: Ribosomal protein of small subunit (proteína ribosómica de la subunidad menor)

Slg: Slow growth (crecimiento lento)

SMM: Sulfometurón metilo

SnoRNA: Small nucleolar RNA (RNA pequeño nucleolar)

SSU: Small subunit (subunidad menor del ribosoma)

TAP: Tandem Affinity Purification (Purificación de afinidad en tándem)

UTR: Untranslated Region (Región no traducida)

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
YNL069c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl16b::KanMX4</i>	Euroscarf
YIL133c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl16a::KanMX4</i>	Euroscarf
TY931	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl16a::His3MX4 rpl16b::KanMX4 [Ycplac111::pGAL::RPL16B_{Δi}]</i>	Pöll <i>et al.</i> , 2009
Hm649	Cepa TY931 + <i>Ycplac33 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm650	Cepa TY931 + <i>RPL16B_{Δi} (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm651	Cepa TY931 + <i>rpl16bΔ51 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm652	Cepa TY931 + <i>rpl16bΔ28 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Hm653	Cepa TY931 + <i>RPL16B_{Δi}-FLAG (2u URA3)</i>	Este estudio
Hm654	Cepa TY931 + <i>rpl16bΔ51-FLAG (2u URA3)</i>	Este estudio
Hm655	Cepa TY931 + <i>rpl16bΔ28-FLAG (2u URA3)</i>	Este estudio
TY931-Noc2TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl16a::His3MX4 rpl16b::KanMX4 (Δrpl16a Δrpl16b) Noc2::TAP GAL-RPL16B_{Δi} (CEN6 LEU2) RPL16B_{Δi} (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
TY931-Noc2-TAP*	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl16a::His3MX4 rpl16b::KanMX4 (Δrpl16a Δrpl16b) Noc2::TAP GAL-RPL16B_{Δi} (CEN6 LEU2) rpl16bΔ51 (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
Cepas con genotipo común <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15DO/MET15DO rpl16a::His3MX4 rpl16b::KanMX4 (Δrpl16a Δrpl16b)</i>		
1. Con alelos silvestres <i>RPL16B</i> y mutantes <i>rpl16b_{Δi}*</i>		

Hm699	<i>RPL16B (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
	<i>RPL16B (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm700	<i>RPL16B_{Δi} (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>RPL16B_{Δi} (CEN6 URA3)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-I8N (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-A23D (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-A37D (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-M86V (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-I8N R93H (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
Hm 717	<i>YEplac181-rpl16bΔ28 (2u LEU2)</i>	
2. Con alelos <i>RPL16B_{Δi}</i> / <i>rpl16b_{Δi}*</i> fusionados al epítipo FLAG en el C-terminal		
	<i>RPL16B_{Δi}-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-I8N-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-A23D-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-A37D-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-M86V-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>rpl16b-I8N R93H-FLAG (CEN6 LEU2)</i>	Este estudio
	<i>YEplac181-rpl16bΔ28-FLAG (2u LEU2)</i>	
Otras Cepas		
H96	MAT α <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ura3-52 [HIS4::LacZ ura3-52]</i>	A.G. Hinnebusch
H117	MAT α <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 [HIS4::LacZ URA3]</i>	A.G. Hinnebusch
H275	MAT α <i>gcn2-101 gcn3-101 his1-29 ino1 ura3-52 [HIS4::LacZ URA3] gcd17</i>	Martín-Marcos et al., 2007
F35	MAT α <i>ura3-52 ino1 can1 [HIS4::LacZ URA3]</i>	G. Luccini

Tabla II. Plásmidos utilizados, descripción y procedencia.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
Con alelos <i>RPL16BΔi</i> / <i>rpl16bΔi</i>*		
pAG1	YCplac111:: <i>RPL16B</i>	Este estudio
pAG2	YCplac33:: <i>RPL16B</i>	Este estudio
pAGH1	YCplac111:: <i>RPL16BΔ_i</i>	Este estudio
pAGH2	YCplac33:: <i>RPL16BΔ_i</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>I8N</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>A23D</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>A37D</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>M86V</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>I8N R93H</i>	Este estudio
pAGH3	YCplac33:: <i>rpl16bΔ51</i>	Este estudio
pAGH4	YCplac33:: <i>rpl16bΔ28</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ51</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ28</i>	Este estudio
pAGH11	YEplac181:: <i>rpl16bΔ28</i>	Este estudio
pAGH10	YEplac181:: <i>rpl16bΔ51</i>	Este estudio
pAGH9	YEplac195:: <i>rpl16bΔ28</i>	Este estudio
pAGH8	YEplac195:: <i>rpl16bΔ51</i>	Este estudio
Con alelos <i>RPL16BΔi</i> / <i>rpl16bΔi</i>* fusionados al epítipo FLAG en el C-terminal		
	YCplac111:: <i>RPL16BΔ_i::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>I8N::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>A23D::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>A37D::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>M86V::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac111:: <i>rpl16bΔ_i</i> , <i>I8N R93H::FLAG</i>	Este estudio
	YCplac33:: <i>RPL16BΔ_i::FLAG</i>	Este estudio
pAGH12	YCplac33:: <i>rpl16bΔ28::FLAG</i>	Este estudio
pAGH5	YEplac195:: <i>pRPS28::RPL16BΔ_i::FLAG</i>	Este estudio
pAGH6	YEplac195:: <i>pRPS28::rpl16bΔ51::FLAG</i>	Este estudio
pAGH7	YEplac195:: <i>pRPS28::rpl16bΔ28::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac181:: <i>rpl16bΔ28::FLAG</i>	Este estudio

pAGH13	YEplac195:: <i>rpl16bΔ28::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac195:: <i>pRPS28:: rpl16b I8N::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac195:: <i>pRPS28:: rpl16b A23D::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac195:: <i>pRPS28:: rpl16b A37D::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac195:: <i>pRPS28:: rpl16b M86V::FLAG</i>	Este estudio
	YEplac195:: <i>pRPS28:: rpl16b I8N R93H::FLAG</i>	Este estudio
Otros plásmidos		
	YCplac111:: <i>RPL16A</i>	Este estudio
TK810	YCplac111:: <i>pGAL::RPL16B_{Δi}</i>	Pöll <i>et al.</i> , 2009
hcDED1	<i>DED1</i> en pFL44D	O. Calvo
hcDHH1	<i>DHH1</i> en pRS426	O. Calvo
hcNOP7	<i>NOP7</i> en YE _{p24}	J.L. Woolford
hcDRS1	<i>DRS1</i> en YE _{p352}	J.L. Woolford
pAS425	<i>PAB1</i> hc (<i>URA3/2μ</i>)	A. Sachs
PC477	<i>FUN12</i> (<i>URA3/2μ</i>)	T. Dever
PC1737	<i>ΔN-FUN12</i> (aa 396-1002) (<i>URA3/2μ</i>)	T. Dever
hcDBP6	<i>DBP6</i> hc (<i>URA3/2μ</i>)	J. de la Cruz
hcSPB4	<i>SPB4</i> hc (<i>URA3/2μ</i>)	J. de la Cruz
hcDOB1	<i>DOB1</i> hc (<i>URA3/2μ</i>)	J. de la Cruz
hcMAK5	<i>MAK5</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcRrp14	<i>Rrp14</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcEBP2	<i>EBP2</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcMAK16	<i>MAK16</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcSSF1	<i>SSF1</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcBRX1	<i>BRX1</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcNSA2	<i>NSA2</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
hcNUG1	<i>NUG1</i> en YEplac195 (<i>URA3/2μ</i>)	Este estudio
P3000	<i>SUI2, SUI3, GCD11</i> y <i>IMT4</i> en YE _{p24}	Asano <i>et al.</i> 1999
	<i>Tif5</i> sc	
	<i>Tif5</i> hc	
	<i>Tif11</i> hc	
	<i>eIF1</i>	
pAG25	pFA6a:: <i>NatMX4</i>	Goldstein <i>et al.</i> , 1999
pBS1479	Plásmido para añadir el epítipo TAP	Rigaut <i>et al</i> 1999
p1877	pRS316:: <i>RPL25::eGFP, URA3</i>	Gadal <i>et al.</i> , 2001

p180	YCp50:: <i>GCN4</i> :: <i>LacZ</i> (con las 4 uORFs)	Hinnebusch, 1985
p226	YCp50:: <i>GCN4</i> :: <i>LacZ</i> (sólo con la uORF 4)	Mueller and Hinnebusch. 1986
p227	YCp50:: <i>GCN4</i> :: <i>LacZ</i> (sin ninguna uORF)	Mueller and Hinnebusch. 1986
pM226	YCp50:: <i>GCN4</i> :: <i>LacZ</i> (La uORF 1 se introduce en <i>GCN4</i> 130 nt)	Grant et al., 1994
p367	pBR322:: <i>HIS4</i> :: <i>lacZ</i> (con ATG como codón de inicio), <i>CEN4 URA3</i>	Cigan et al., 1988
p391	pBR322:: <i>HIS4</i> :: <i>lacZ</i> con UUG como codón de inicio, <i>CEN4 URA3</i>	Cigan et al., 1988

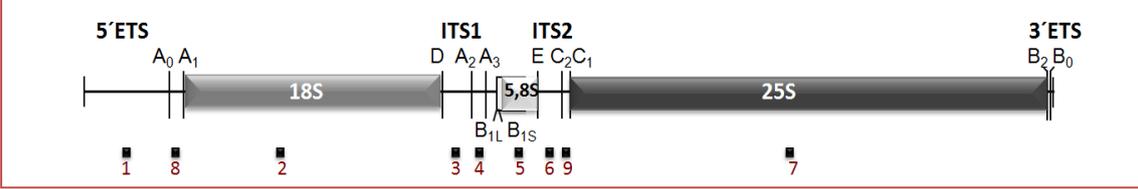
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para clonación, amplificación y secuenciación. Se indica la secuencia y posición respecto al ATG de la secuencia codificadora de cada gen. Se subrayan los sitios de corte para diversas enzimas de restricción que se añadieron en algunos casos.

NOMBRE	SECUENCIA	POSICIÓN
Oligonucleótidos usados para las AMPLIFICACIONES de los alelos <i>RPL16B</i> y <i>rpl16bΔ</i>,		
<i>F1L16B</i>	5'- AC <u>GC</u> GGATCCCGAAAAACCAAGGTGGTAG- 3'	- 784
<i>R1L16B</i>	5'- CGGGGATCCACACACTTCTAATAGACC - 3'	+ 1512
<i>PromL16B</i>	5'- TTTT <u>TA</u> CTAGTTTCAATCCGTACTACTATACAC -3'	- 408
<i>O1235</i>	5'- TTTTTTCTGCAGGAATTACTTGACCGTTACTGC - 3'	+ 1399
<i>L16Bint</i>	5'- TTTTTTCTTTAGCATCAATAACAACGACTGGTT - 3'	+ 7
Oligonucleótidos usados para la AMPLIFICACIÓN del alelo <i>RPL16A</i>		
<i>F1L16A</i>	5'- CGCGGATCCTCTGTGCGTAGCAAGAGAAGGC -3'	- 533
<i>R1L16A</i>	5'- GGCGGATCCACTTAGTACGGGCCATTC - 3'	+ 1157
Oligonucleótidos usados para la AMPLIFICACIÓN de alelos <i>rpl16b Δ</i>,* (por mutagénesis dirigida)		
<i>K147-StopF</i>	5' - GTCTACTTCTGTTGGTTGTAATACGAAGATGTTGTTGC-3'	+ 868
<i>K147StopR</i>	5'- GCAACAACATCTTCGTATTACCAACCAACAGAAGTAGAC- 3'	+ 907
<i>K170-StopF</i>	5' - CGCCGAATATTACGCCAAGTAGAGAGCTTTCACCAAAAAGG - 3'	+ 937
<i>K170-StopR</i>	5'- CCTTTTTGGTGAAAGCTCTCTACTTGGCGTAATATTCGGCC - 3'	+ 978
Oligonucleótidos usados para la SECUENCIACIÓN del alelo <i>RPL16A</i>		
<i>F2L16A</i>	5' - GTCTGTTGAACCAAGTTGTTGTC - 3'	+2

Anexos

F3L16A	5'- TTGTTGTCCACAAGCATTGA - 3'	+ 663
R2L16A	5'- GAATGGACCACGGGTCTTATT - 3'	+ 503
R3L16A	5'- CCAAGATTGAATTTCCCTGCA - 3'	- 137
Oligonucleótidos usados para la SECUENCIACIÓN de los alelos <i>RPL16B</i> y <i>rpl16b_{Δi}</i>		
F3L16B	5'- GGTGATCTCTTCTTAGGCAGAC - 3'	- 187
F4L16B	5'- GACTCCAACATATATTCAATCCAC - 3'	+ 419
F5L16B	5'- TGCTGCTGCTTCTGAATCCGAT - 3'	+ 1013
R4L16B	5'- GACCCAACAAATGATCCTTAGC - 3'	+ 498
L16BmutF	5'- GGTATTAACAACCAACCAACC - 3'	- 30
L16BmutR	5'- GATTGATCACAAATTCATTCATG - 3'	+ 1074
Oligonucleótidos usados para fusionar el epítipo FLAG y el epítipo TAP		
K147-Pst-Rev	5' TTTTTTCTGCAGCCAACCAACAGAAGTAGACAAC 3'	+ 888
K170-Pst-Rev	5' TTTTTTCTGCAGCTTGCCGTAATATTCGGCC	+ 957
L16B-Pst-Rev	5'- TTTTTTCTGCAGGTAACCGAAAGAAGCCAATTG- 3'	+ 1048
L16B-FLAG	5'- GCTTCTTTCGGTTACGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAATTCAT GAAATGAA- 3'	+ 1033
L16B-BamHI	5'- TTTTTTGGATCCATGTCTCAACCAGTCGTTGTTATT- 3'	+1
Noc2-TAP- NAT-F	5'- AAGTGATGATGACAACGAAGATGTTGAAATGTCAGACGCTTCCATGGA AAAGAGAAG - 3'	+ 2091/ <i>Noc2</i>
Noc2-TAP- NAT-R	5'- CTATTGAATTCAAGACAAAAAATCAAATCTTGCTGAGTTGTACGACTCA CTGGG - 3'	+ 2130/ <i>Noc2</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'- AGCCATTCGAGTTTCACTG - 3'
3. D-A ₂	5'- TTAAGCGCAGGCCCGGCTGG - 3'
4. A ₂ -A ₃	5'-TGTTACCTCTGGGCC - 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'

Tabla V. Reguladores positivos y negativos de la traducción de *GCN4*

REGULADORES POSITIVOS	FUNCIÓN
<i>GCN1</i>	Regulador positivo de <i>GCN2</i> formando complejo con <i>GCN20</i>
<i>GCN2</i>	Quinasa específica de eIF2 α
<i>GCN3</i>	Subunidad α de eIF2B
<i>GCN20</i>	Regulador positivo de <i>GCN2</i> formando complejo con <i>GCN1</i>
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 <i>GCD14</i> metilación de la A58 de los ARNt
<i>GCD11</i>	Subunidad ζ de eIF2
<i>GCD13</i>	Subunidad C160 de la ARN Polimerasa III
<i>GCD14</i>	Junto a <i>GCD10</i> 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 <i>GUA1</i> 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