

UCH-FC

DOC-B

T649

C 1

ESTUDIOS SOBRE LA METILACION DEL
FACTOR DE ELONGACION EF-Tu
EN MICROORGANISMOS

Tesis entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requerimientos para optar
al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Héctor Manuel Toledo Araya

Profesor patrocinante: Dr. Carlos A. Jerez



02276

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Héctor Manuel Toledo Araya

ha sido aprobada por la Comisión Informante como requisito de Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biológicas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 12 de Diciembre de 1988.

Patrocinante de Tesis:
Dr. Carlos Jerez G.

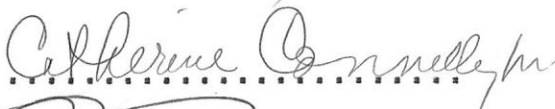

.....

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Tito Ureta


.....

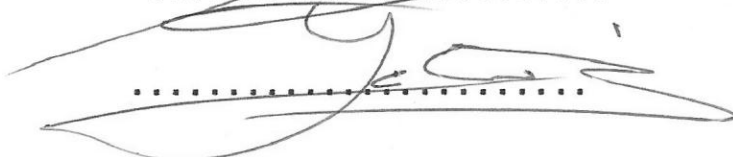
Dra. Catherine Connelly


.....

Dr. Guido Mora


.....

Dr. Ramón Latorre


.....

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio del
Dr. Carlos Jerez, en el Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Chile.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos más sinceros a todas las personas que directa o indirectamente estuvieron ligadas a mi durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Jerez, por su gufa, su espíritu crítico y su amistad.

A los Drs. Jorge Allende, Catherine Connelly, Lionel Gil y a todos sus colaboradores por las facilidades y ayuda prestada.

A mis compañeros de laboratorio Ana Marfa Amaro, Iris Peirano y a la Dr. Elvira Mardones.

Al Sr. José Mondaca y al Sr. Héctor Muñoz por sus asesorías técnicas en los dibujos y fotografías.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica que de algún modo me brindaron su apoyo y colaboración.

INDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xviii
1.-INTRODUCCION.....	1
1.1.- Función del factor de elongación EF-Tu en la síntesis proteica.....	6
1.2.- Estructura del factor de elongación EF-Tu de E. coli.....	10
1.3.- Los genes que codifican el factor de elonga- ción EF-Tu.....	16
1.4.-OBJETIVOS DE LA TESIS.....	21
2.- MATERIALES Y METODOS.....	22
2.1.- Reactivos.....	22
2.2.- Cepas de Microorganismos.....	23
2.3.- Medios de cultivo.....	23
2.3.1.- Medio mínimo M-9 para E. coli.....	25
2.3.2.- Medio rico para E. coli.....	25
2.3.3.- Medio mínimo de Spizizen para B. subtilis.....	25
2.3.4.- Medio mínimo TMLM para B. stearothermophilus...	26
2.3.5.- Medio rico para B. stearothermophilus.....	26
2.3.6.- Medio de Hutner para E. gracilis.....	26
2.4.- Amortiguadores utilizados en la preparación de los extractos celulares.....	27
2.4.1.- Amortiguador A. (Lavado de células).....	27
2.4.2.- Amortiguador B. (Ruptura de células).....	27
2.4.3.- Amortiguador C. (Lavado de ribosomas).....	27

2.4.4.- Amortiguador D. (Lavado de <i>E. gracilis</i>).....	27
2.5.- Crecimiento y marcación de células.....	28
2.5.1.- Crecimiento de bacterias para los ensayos de metilación <i>in vivo</i>	28
2.5.2.- Crecimiento de <i>E. coli</i> en condiciones limi- tantes de metionina.....	29
2.5.3.- Crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia de etio- nina.....	32
2.5.4.- Crecimiento y marcación de <i>E. gracilis</i> para estudiar la metilación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del EF-Tu.....	33
2.5.5.- Crecimiento de <i>E. gracilis</i> W ₁₀ BSmL.....	34
2.5.6.- Crecimiento de <i>E. coli</i> en medio rico.....	34
2.6.- Ruptura de células y obtención de extractos celulares.....	35
2.6.1.- Ruptura de células de <i>E. coli</i> crecidas en condiciones de submetilación.....	35
2.6.2.- Preparación de un extracto crudo para amino- acilación del tRNA de <i>E. coli</i>	35
2.6.3.- Preparación de extractos de células de <i>E.</i> <i>gracilis</i>	36
2.6.4.- Obtención de cloroplastos.....	37
2.6.5.- Preparación de extractos de cloroplasto.....	38
2.7.- Métodos electroforéticos.....	38
2.7.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	38
2.7.1.1.- Geles cilíndricos de poliacrilamina al 10 %	
2.7.1.2.- Geles en placa de poliacrilamida al 10 %	39
2.7.1.3.- Geles en placa de poliacrilamida en gra- diente entre el 7 y el 15 %	40
2.7.1.4.- Electroforesis bidimensional de O'Farrell.....	41
2.7.2.- Mapa peptídico <i>in situ</i> mediante proteólisis limitada en presencia de SDS.....	41
2.7.3.- Preparación de las muestras para electrofo- resis.....	42
2.7.4.- Tinción de los geles con azul de coomassie.....	43
2.7.5.- Autorradiografías.....	43
2.7.6.- Electroforesis de alto voltaje.....	44
2.8.- Procedimientos inmunológicos.....	45
2.8.1.- Obtención de antisuero polivalente contra EF-Tu.....	45

2.8.2.-	Inmunodifusión de Ouchterlony.....	46
2.8.3.-	Inmunoprecipitación en solución.....	46
2.8.4.-	Medición de la concentración de EF-Tu por la técnica de inmunopresión.....	46
2.9.-	Determinación de la radiactividad.....	48
2.9.1.-	Determinación de la radiactividad en los geles de poliacrilamida cilíndricos.....	48
2.9.2.-	Determinación de la radiactividad en cromatogramas y electroforetogramas.....	48
2.9.3.-	Determinación de la radiactividad retenida en filtros.....	49
2.9.4.-	Determinación de la incorporación total de aminoácidos radiactivos en las proteínas.....	49
2.10.-	Métodos cromatográficos.....	50
2.10.1.-	Cromatografía descendente en papel.....	50
2.10.2.-	Cromatografía en placa fina de poliiminocelulosa.....	51
2.10.3.-	Preparación de GDP-Sepharose.....	51
2.10.3.1.-	Activación de la Sepharose.....	51
2.10.3.2.-	Acoplamiento del brazo de diaminoctano a la Sepharose activada.....	52
2.10.3.3.-	Unión del GDP a la aminoctil-Sepharose.....	52
2.11.-	Ensayos de actividades.....	53
2.11.1.-	Ensayo de metilación in vitro del EF-Tu.....	53
2.11.2.-	Determinación de la disociación de nucleótidos.....	54
2.11.3.-	Determinación de la actividad GTPasa.....	55
2.11.4.-	Síntesis y metilación de proteínas in vitro en un sistema dependiente de DNA.....	56
2.12.-	Purificación de los factores de elongación EF-Tu y EF-Ts de E. coli.....	57
2.12.1.-	Purificación preparativa del factor EF-Tu metilado y submetilado de E. coli.....	57
2.12.2.-	Purificación preparativa del factor EF-Tu de E. coli mediante cromatografía de afinidad.....	58
2.12.3.-	Purificación preparativa del factor EF-Tu de E. coli por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico.....	63
2.12.4.-	Purificación parcial del factor de elongación EF-Ts de E. coli MRE 600.....	69

2.13.- Otros precedimientos.....	73
2.13.1.- Análisis de los aminoácidos metilados.....	73
2.13.2.- Cuantificación del EF-Tu sintetizado in vitro a partir de DNA.....	74
2.13.3.- Digestión trípica del EF-Tu.....	75
2.13.4.- Aminoacilación del tRNA total de <i>E. coli</i>	75
2.13.5.- Determinación de la concentración de pro-teínas.....	77
3.- RESULTADOS.....	78
3.1.- Metilación in vivo del factor de elongación EF-Tu en varios microorganismos.....	78
3.1.1.- Metilación in vivo del EF-Tu, en <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. stearothermophilus</i>	78
3.1.2.- Metilación del factor de elongación EF-Tu de cloroplasto de <i>E. gracilis</i>	89
3.2.- Desarrollo de sistemas para la metilación in vitro del factor de elongación EF-Tu.....	99
3.2.1.- Sistema dependiente de DNA.....	99
3.2.2.- Desarrollo de sistemas que emplean EF-Tu submetilado artificialmente como sustrato para la metilación.....	106
3.2.3.- Presencia del Factor EF-Tu metilado en el ensayo de metilación in vitro.....	113
3.3.- Efecto de la metilación sobre algunas propiedades del factor de elongación EF-Tu.....	127
3.3.1.- Metilación in vivo del factor EF-Tu durante el ciclo de crecimiento de <i>E. coli</i> D-10.....	127
3.3.2.- Efecto de la metilación sobre la sensibilidad del factor EF-Tu a la degradación proteolítica.....	132
3.3.3.- Efecto de la metilación sobre la actividad biológica del EF-Tu.....	139
3.3.3.1.- Efecto de la metilación del EF-Tu en su capacidad de intercambio de nucleótidos.....	139
3.3.3.2.- Efecto de la metilación del EF-Tu en la actividad GTPasa del factor.....	153

4.- DISCUSION.....	160
4.1.- Metilación del factor de elongación EF-Tu en varios microorganismos.....	160
4.2.- Sistemas para la metilación in vitro del factor EF-Tu de <i>E. coli</i>	167
4.3.- Efecto de la metilación del EF-Tu sobre su es- tructura y actividad.....	171
4.4.- CONCLUSIONES.....	187
5.- BIBLIOGRAFIA.....	189

LISTA DE ABREVIATURAS

aaRNA	: Acido ribonucleico de transferencia aminoacilado
ATP	: Adenosina 5'trifosfato
CTP	: Citidina 5'trifosfato
DNAasa	: Desoxirribonucleasa
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
EF-G	: Factor de elongación EF-G
EF-Tu	: Factor de elongación EF-Tu
EF-TuE	: Factor de elongación EF-Tu proveniente de células crecidas en etionina
EF-TuL	: Factor de elongación EF-Tu de células cosechadas en la fase estacionaria tardía (metilado)
EF-TuM	: Factor de elongación EF-Tu de células cosechadas en la mitad de la fase logarítmica (submetilado)
EF-Ts	: Factor de elongación EF-Ts
GTP	: Guanosina 5'trifosfato
GDP	: Guanosina 5'difosfato
Lis(Me)	: <i>E</i> -N-monometililisina
Lis(Me2)	: <i>E</i> -N-dimetilisina
Lis(Me3)	: <i>E</i> -N-trimetilisina

Met(0) : Metionina sulfóxido
Met(02) : Metionina sulfona
OD : Densidad óptica
PMSF : Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
POPOP : 1,4-bis (2(5-feniloxazolil)) benceno
PPO : 2,5 - difeniloxazol
S-AdoMet : S-Adenosil metionina
SDS : Sulfato disódico de dodecilo
TCA : Acido tricloroacético
TEMED : N,N,N',N' tetrametilendiamina
Tris : Tris-(hidroximetil)-aminoetano
tRNA : Acido ribonucleico de transferencia
UTP : Uridina 5' trifosfato

Lista de Esquemas y Figuras

	Pág.
Figura 1.- Mecanismo de acción del factor de elongación EF-Tu en la síntesis de proteínas...	7
Figura 2.- Modelo preliminar del EF-Tu basado en los estudios de cristalografía de rayos X.....	14
Figura 3.- Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> D-10 en medio que permiten la submetilación artificial.....	30
Figura 4.- Purificación del EF-Tu por cromatografía de afinidad.....	61
Figura 5.- Diferentes separaciones cromatográficas en la purificación del EF-Tu de <i>E. coli</i>	66
Figura 6.- Determinación de la pureza de los EF-Tu purificados de <i>E. coli</i> mediante electroforesis.....	70
Figura 7.- Metilación <i>in vivo</i> de proteínas en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>	80
Figura 8.- Presencia en <i>B. subtilis</i> de una proteína inmunoprecipitable con suero antiEF-Tu de <i>E. coli</i>	83
Figura 9.- Metilación del EF-Tu de <i>B. stearothermophilus</i> y otros microorganismos.....	86
Figura 10.- Análisis de los aminoácidos metilados presentes en el EF-Tu de cloroplasto de <i>E. gracilis</i> metilado <i>in vivo</i>	92
Figura 11.- Metilación <i>in vitro</i> del factor de elongación EF-Tu de cloroplasto de <i>E. gracilis</i> .	96
Figura 12.- Síntesis y metilación <i>in vitro</i> del EF-Tu en un sistema dependiente de DNA.....	100
Figura 13.- Análisis de los aminoácidos metilados presentes en el EF-Tu sintetizado <i>in vitro</i> .	104

Figura 14.- Efecto de la concentración de proteínas de los sobrenadantes S150 en la incorporación de grupos metilo a las proteínas totales.....	108
Figura 15.- Cinética de metilación <i>in vitro</i> de las proteínas totales y del EF-Tu en extractos submetilados artificialmente.....	111
Figura 16.- Identificación del EF-Tu como producto metilado <i>in vitro</i>	114
Figura 17.- Identificación del EF-Tu metilado <i>in vitro</i> mediante inmunoprecipitación con suero antiEF-Tu.....	117
Figura 18.- Cuantificación de los productos metilados <i>in vitro</i> de bajo peso molecular que inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu.....	121
Figura 19.- Determinación del patrón de péptidos, por proteólisis <i>in situ</i> , de los polipéptidos metilados de bajo peso molecular inmunoprecipitados con suero antiEF-Tu.....	125
Figura 20.- Metilación <i>in vivo</i> del EF-Tu de <i>E. coli</i> durante su ciclo de crecimiento.....	129
Figura 21.- Proteólisis <i>in situ</i> del EF-Tu metilado y submetilado con proteasa V8 de <i>S. aureus</i> ...	134
Figura 22.- Degradación triptica del EF-Tu metilado y submetilado.....	137
Figura 23.- Cuantificación de la desaparición del EF-Tu por digestión con tripsina.....	140
Figura 24.- Unión del ^3H GDP a 0° al EF-TuE presente en diferentes extractos crudos.....	143
Figura 25.- Disociación de nucleótidos por diferentes preparaciones purificadas del EF-Tu.....	146
Figura 26.- Disociación de GDP del EF-Tu a 0° en presencia y en ausencia de EF-Ts.....	149
Figura 27.- Efecto de la metilación del EF-Tu sobre la actividad GTPásica del factor.....	155

Figura 28.- Efecto de la kirromicina sobre la disociación del GDP del EF-Tu a 37°......158

Figura 29.- Mecanismo de edición.....182

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla I .- Cepas de microorganismos y medios de cultivo.....	24
Tabla II .- Comparación del sitio de metilación in vivo del factor de elongación EF-Tu de <i>E. coli</i> con la región del factor elongación de cloroplasto de <i>E. gracilis</i>	91
Tabla III.- Determinación de la capacidad de unión de GDP por el EF-Tu con distintos grados de metilación.....	152
Tabla IV .- Comparación del sitio de metilación in vivo del factor de elongación EF-Tu de <i>E. coli</i> con secuencias similares de los factores de varios organismos.....	164

RESUMEN

El factor de elongación EF-Tu es una de las proteínas más abundantes tanto en las células procarióticas como eucarióticas. Este factor tiene una función clave en la traducción al promover la unión del aminoacil-tRNA, dependiente de GTP, al sitio A del ribosoma durante el ciclo de elongación de la biosíntesis de proteínas. Este factor no sólo es interesante por su importante función biológica sino que también por la diversidad de moléculas con las cuales interactúa. Entre ellas se cuentan el aminoacil-tRNA, el GTP, GDP, el factor de elongación EF-Ts, los antibióticos kirromicina y pulvomicina y algunos componentes ribosomales. Además se ha descrito que esta proteína es metilada tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium*. Esta modificación se encuentra sólo en la lisina-56, en *E. coli*, pudiendo ser mono- o dimetil lisina. Sin embargo, actualmente no se conoce la función de esta modificación post-traducciona del EF-Tu. En este trabajo hemos abordado el estudio de algunos aspectos de la metilación del factor de elongación EF-Tu en diversos organismos.

Encontramos que tanto el EF-Tu de cloroplastos de *Euglena gracilis* como posiblemente el factor de la bacteria termofílica *Bacillus stearothermophilus* son metilados. En

cambio en el EF-Tu de *Bacillus subtilis* no fue posible establecer la presencia de aminoácidos metilados.

Los resultados obtenidos con el EF-Tu de cloroplastos constituyen otra característica de tipo bacteriano para el aparato traduccional de estos organelos, lo que apoya la hipótesis de su posible origen endosimbiótico.

Estos estudios comparativos y los de otros autores nos indicaron un cierto grado de conservación para la metilación del factor de elongación EF-Tu en algunas bacterias y en los cloroplastos, lo que sugiere un posible papel de importancia para la metilación de las proteínas del aparato traduccional.

Se desarrollaron dos sistemas de metilación in vitro del factor de elongación EF-Tu. El primero, consistió en un sistema dependiente de DNA, en el que se utilizó metionina-³⁵S o S-Ado(metil-³H)Met y el DNA del fago λ rif^{d18}, el cual tiene el gen *tufB* que codifica para el factor EF-Tu de *E. coli*. En este sistema se obtuvo por primera vez la síntesis y la metilación del EF-Tu, en forma eficiente, encontrándose mono- y dimetilisina. El segundo sistema desarrollado empleó como sustrato el EF-Tu submetilado artificialmente. Para ello se crecieron las células de *E. coli* en un medio en que la metionina se encontraba limitante, o en un medio mínimo suplementado con etionina, en reemplazo de la metionina. Como dador de grupos

metilos se utilizó S-Ado(metil-³H)Met. Con estos sistemas también se obtuvo la metilación del EF-Tu, encontrándose mono- y dimetilisina. Estos resultados sugieren que en todos los sistemas de metilación in vitro desarrollados, el factor EF-Tu se metilaría como in vivo.

Mediante estos sistemas, pusimos en evidencia además de la metilación in vitro del factor EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis*, la presencia de una enzima metiltransferasa de EF-Tu tanto en *E. coli* como en los cloroplastos.

Esta actividad metiltransferasa resultó ser altamente inestable y no fue posible purificar la enzima, por lo que se caracterizó en forma preliminar sólo en extractos crudos de *E. coli*.

El grado de metilación in vivo del factor EF-Tu de *E. coli* varió en las distintas etapas del crecimiento de la bacteria, alcanzándose la máxima incorporación de grupos metilo hacia la mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Estos resultados nos sugirieron una posible función biológica para la modificación post-sintética del factor.

Con el propósito de estudiar la posible función de la metilación en la estructura o actividad del EF-Tu se compararon algunas propiedades de preparaciones altamente purificadas del EF-Tu metilado (EF-TuL), obtenido de *E. coli* LBE1001 crecidas hasta la fase estacionaria tardía de la

curva de crecimiento, y de dos preparaciones de EF-Tu submetilado: EF-TuM, obtenido de *E. coli* MRE600 crecidas hasta la mitad de la fase logarítmica y EF-TuE, obtenido de células crecidas en presencia de etionina.

Cuando el factor EF-TuL, metilado, se trató con tripsina, presentó una menor velocidad de degradación comparado con los factores submetilados EF-TuM y EF-TuE. Estos resultados sugieren que la metilación de la lisina-56 del EF-Tu, que se encuentra en una región expuesta de la molécula, protegería a la proteína del ataque proteolítico.

Al medir la velocidad de disociación de los nucleótidos GDP y GTP en las distintas preparaciones de EF-Tu, ésta pareció no estar afectada por la metilación. Sin embargo, la actividad GTPasa, que presenta el EF-Tu estimulada por aa-tRNA en presencia de kirromicina, se encontró significativamente aumentada cuando el EF-Tu estaba metilado.

Este efecto de la metilación sobre la actividad GTPasa del EF-Tu podría tener una importancia fisiológica para la bacteria, ya que la actividad GTPasa está directamente correlacionada con la fidelidad en el proceso de traducción mediado por los ribosomas.

ABSTRACT

The elongation factor EF-Tu is one of the most abundant cellular proteins in both prokaryotic and eukaryotic cells. This factor plays a central role during translation by promoting the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the ribosomes during the elongation cycle of protein biosynthesis. In addition, this protein factor is interesting because it interacts with aminoacyl-tRNA, GTP, GDP, elongation factor EF-Ts, the antibiotics kirromycin and pulvomycin and some components of the ribosome. The elongation factor EF-Tu has been found methylated in both *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. This modification takes place in the lysine-56 in *E. coli* and it can be mono- or dimethyllysine. However, the function of this post-translational modification is at present unknown. In this work we have studied some aspects of the EF-Tu methylation in several microorganisms.

We found that both the EF-Tu from chloroplasts from *Euglena gracilis* and possibly the factor from the thermophilic *Bacillus stearothermophilus* were methylated *in vivo*. However, we could not find methylated amino acids in the factor from *Bacillus subtilis*.

The similarity between the results obtained with the chloroplast EF-Tu and those with *E. coli* support the possible endosymbiotic origin for the organelle.

These comparative studies, together with evidence from other investigators, suggested some degree of conservation for the methylation of EF-Tu from some eubacteria and from chloroplast, indicating a possible important role for the methylation of proteins from the translational apparatus.

We developed two *in vitro* systems to study EF-Tu methylation. The first was a DNA-dependent system employing ³⁵S-methionine, S-Adenosyl(methyl-³H)Methionine and λ rif^d18 DNA, coding for EF-Tu from *E. coli*. With this system, we obtained for the first time, the efficient synthesis and methylation of EF-Tu, in which mono- and dimethyllysine were found. The second system employed artificially undermethylated EF-Tu, obtained by growing *E. coli* at limiting methionine concentration or in the presence of ethionine instead of methionine. S-Ado(methyl-³H)Met was used as a methyl group donor. By using these systems, we found both mono- and dimethyllysine in EF-Tu. Therefore, the methylation of EF-Tu resembled that obtained *in vivo* with all the *in vitro* systems developed.

These *in vitro* systems were useful not only in showing the *in vitro* methylation of the EF-Tu from chloroplasts but allowed us to confirm the presence of an EF-Tu

methyltransferase both in *E. coli* and chloroplasts from *E. gracilis*.

However, the methyltransferase activity was highly unstable and it was only possible to make a preliminary characterization by using crude extracts from *E. coli*.

The degree of *in vivo* methylation of EF-Tu changed during the growth phase of the bacteria, having a maximum value towards the half of the logarithmic growth phase these results suggested a possible biological role for the post-synthetic modification of EF-Tu.

To study the possible effect of methylation on the structure or function of EF-Tu, we compared some properties of highly purified methylated EF-Tu (EF-TuL) obtained from *E. coli* LBE 1001 grown up to the late stationary growth phase and those of two undermethylated EF-Tu purified preparations: EF-TuM, from *E. coli* MRE 600 grown up to half of the logarithmic growth phase and EF-TuE, from cells grown in the presence of ethionine.

When the methylated EF-TuL was tested in the presence of trypsin, it showed a greatly reduced degradation rate compared with the two undermethylated EF-Tu factors (EF-TuM and EF-TuE). These results suggested that the methylation of the Lys-56 present in an exposed region of the EF-Tu molecule, would protect the protein from proteolytic attack.

The methylation of EF-Tu appeared not to affect the rate of GDP and GTP exchange. However, the aaRNA-stimulated GTPase activity measured in the presence of kirromycin, was greatly stimulated when the EF-Tu was methylated.

This effect of methylation upon the EF-Tu GTPase activity could be physiologically important since the GTPase activity is directly correlated with the fidelity of the ribosome mediated translation process.

1.- INTRODUCCION

La estructura primaria de una proteína está determinada por la secuencia de los aminoácidos que la constituyen. Sin embargo, esta estructura puede ser modificada post-traduccionalmente mediante uniones covalentes específicas de grupos químicos a los residuos aminoácidos que la constituyen. (Alix, J. H. y Hayes, D., 1983; Paik, W. K y Kim, S., 1980). Estas modificaciones post-sintéticas son de especial interés ya que pueden alterar la estructura terciaria de la proteína, lo que podría provocar cambios en su función.

La metilación de proteínas ha sido de especial interés durante los últimos 20 años y se ha investigado en forma activa en procesos tales como: la quimiotaxis bacteriana, la exocitosis, la regulación de la expresión de genes, la contracción muscular, el transporte de electrones y la síntesis del transportador de grupos acilo (carnitina) (Alix, J. H y Hayes, D., 1983; Paik, W. K. y Kim, S., 1980).

Nuestro laboratorio se ha interesado en los últimos años en efectuar un estudio comparativo de la metilación de las proteínas del aparato traduccional en distintas especies, ya que éste presenta una serie de características comunes en todos los seres vivos y

desempeña en ellos la misma función (Nierhaus, N. H., 1982). Los componentes ribosomales se han encontrado altamente conservados en muchas especies (Wittmann, H. G., 1982). Además, regiones de los genes que codifican el factor de elongación EF-Tu son altamente conservadas dentro de los procariontes (Filer, D. y Furano, A. V., 1980). Por otro lado, muchos componentes del aparato traduccional presentan metilaciones post-sintéticas. Algunas proteínas ribosomales son metiladas en *Escherichia coli* (Alix, J. H. y Hayes, D., 1974; Chang, F. N. y col., 1974; Chang, C. N. y Chang, F. N., 1975), en *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Alteromonas espejiana* y en *Halobacterium cutirubrum* (Mardones, E. y col., 1980; Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984) y esta modificación parece ser altamente conservada (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984). Los eucariontes presentan varios de los componentes del aparato traduccional metilados (Chang, F. N. y col., 1976; Hernández, F. y col., 1978). El RNA ribosomal y varios tRNA también son metilados en numerosas especies (Nierhaus, K. H., 1982; Isono, K., 1980).

No está claro aún el papel que juegan estas modificaciones en la estructura y función de las proteínas. El único caso en el cual se ha establecido claramente la función que cumple la metilación de una proteína, es en la carboximetilación de las proteínas de

membrana, MCPs, que se encuentran implicadas en la quimiotaxis (Koshland Jr. D. E., 1980). Recientemente se ha comprobado que la trimetilación de la lisina 115 de la calmodulina, provoca una disminución de la estimulación en los niveles de activación de la NAD quinasa. Estos resultados proporcionan por primera vez un antecedente claro sobre un efecto funcional de la trimetilación de la lisina en una proteína (Roberts, D. M. y col., 1986).

Por otra parte, el alto grado de conservación de la metilación de las proteínas ribosomales en distintas especies, establecido en nuestro laboratorio (Mardones, E. y col., 1980; Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984) sugiere que esta modificación química de las proteínas ribosomales puede tener una importante función.

Se ha descrito también que, los factores de iniciación IF-3 (Brauer, D. y Wittmann-Liebold, B., 1977) y de elongación EF-Tu de *E. coli* son proteínas metiladas (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979; Ohba, M. y col., 1979; L'Italien, J. J. y col., 1979). Además, el EF-Tu se metila *in vitro* (Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985).

El EF-1 α , el factor de elongación eucariótico homólogo al EF-Tu de los procariontes, también se ha descrito metilado en varias especies (Amons, R. y col., 1983; Coppard, N. J. y col., 1983; Fonzi, W. A. y col., 1985; Hiatt, W. R. y col., 1982; van Hemert, F. J. y col., 1983).

Con el propósito de ampliar nuestro estudio comparativo de la metilación de las proteínas del aparato traduccional, hemos extendido el análisis de la metilación al factor EF-Tu en distintas especies y hemos analizado la posible relación entre esta modificación post-sintética y la función de la proteína.

Por muchos años se ha trabajado en los mecanismos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de proteínas y en forma especial en la relación estructura-función de los factores de elongación que participan en este proceso.

Se han realizado importantes estudios en torno al factor de elongación EF-Tu de *E. coli*, el que juega un papel central durante la síntesis proteica. Es esta una molécula que ofrece un modelo atractivo para dilucidar problemas como la interacción entre proteínas y los ácidos nucleicos, debido a que el EF-Tu es capaz de formar un complejo ternario con el aminoacil-tRNA (aa-tRNA) y GTP, el cual desempeña un papel esencial en la biosíntesis de las proteínas (Lucas-Lenard, J. y Limpmann, F., 1971; Miller, D. L. y Weissbach, H., 1977; Kaziro, Y., 1978).

El EF-Tu también se considera como una proteína transductora de energía, debido a su actividad hidrolítica de GTP (GTPasa). El EF-Tu comparte esta propiedad con muchas otras proteínas con función similar, que están involucradas en diversos procesos, tales como: la

replicación del DNA, el sistema de autoensamblaje de los microtúbulos o microfilamentos y en la transmisión de la señal por parte de los receptores hormonales y en los fotorreceptores. En todos estos sistemas el mecanismo básico parece ser muy similar (Allende, J. E., 1988).

Además de su actividad más importante, cual es la participación en la síntesis de proteínas, el EF-Tu desempeña una multiplicidad de funciones. Participa en la replicación del bacteriófago RNA $Q\beta$ de *E. coli* constituyendo una de las cuatro subunidades que forman el complejo replicativo de la $Q\beta$ replicasa del bacteriófago (Blumenthal, T. y col., 1972).

También se ha sugerido que el EF-Tu es un regulador positivo en la síntesis del RNA ribosomal (Travers, A., 1973).

Por otra parte, existen evidencias que el EF-Tu se encuentra asociado a la membrana interna de *E. coli* (Jacobson, G. R. y Rosenbusch, J. P., 1976) lo que ha permitido especular acerca de una posible función estructural del factor en la bacteria (Beck, B. D. y col., 1978), aunque la localización inmunocitoquímica del EF-Tu en *E. coli* no ha permitido confirmar esta asociación a la membrana (Schilstra, M. J. y col., 1984).

1.1.- Función del factor de elongación EF-Tu en la síntesis proteica

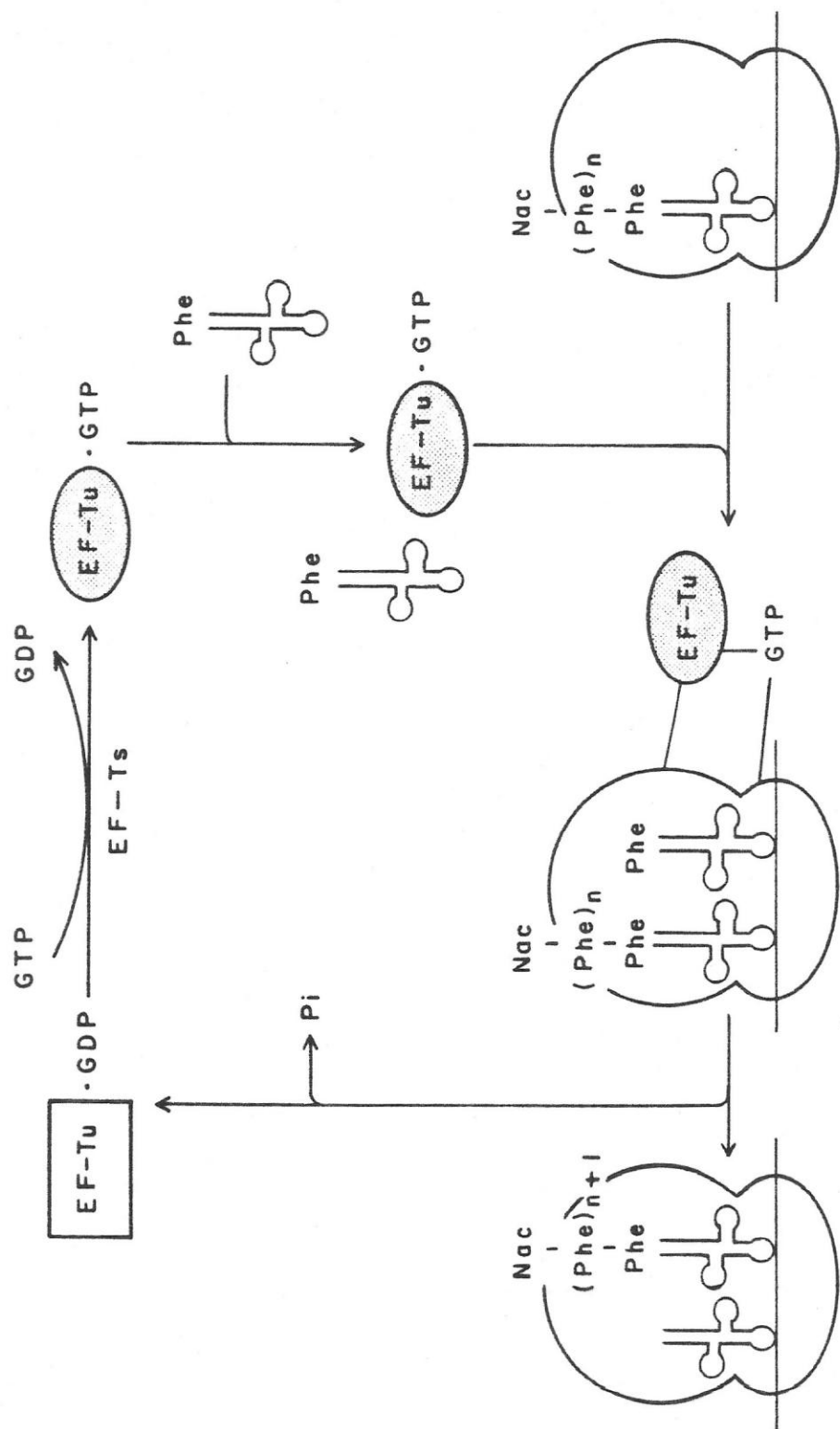
La función principal del EF-Tu es la de promover la unión del aa-tRNA al sitio A del ribosoma (ver figura 1). Esta unión sólo es posible cuando el EF-Tu forma un complejo binario con GTP, del tipo EF-Tu·GTP y no como EF-Tu·GDP ya que éste último complejo no interactúa con el aa-tRNA para formar el complejo ternario (EF-Tu·GTP·aa-tRNA). El complejo ternario es el transportador del aa-tRNA al sitio A del ribosoma donde se encuentra la información codificada por el mRNA, de modo que el aminoácido es colocado en el orden correcto durante su incorporación en la cadena polipeptídica (Clark, B. F. C., 1980). El complejo binario EF-Tu·GTP se une preferencialmente al tRNA aminoacilado, mientras que el EF-Tu·GDP no interactúa con el tRNA aminoacilado ni con el tRNA desacilado (Kaziro, Y., 1983).

Esto sugiere que el GTP altera la conformación del EF-Tu al unirse a él, de modo de facilitar la interacción con el aa-tRNA y con el ribosoma (Allende, J. E., 1988; Clark, B. F. C. y col., 1984; Douglas, J. y Blumenthal, T., 1979) (figura 1).

Al unirse el complejo EF-Tu·GTP·aa-tRNA al sitio A del ribosoma, el GTP es hidrolizado simultáneamente,

Figura 1.- Mecanismo de acción del factor de elongación EF-Tu en la síntesis de proteínas.

En el diagrama, el rectángulo representa la conformación del EF-Tu inducida por el GDP y las elipses achuradas la conformación inducida por el GTP (adaptado de Kaziro, Y., 1983).



generándose GDP y fosfato inorgánico. La hidrólisis del GTP aparentemente es requerida para liberar el EF-Tu·GDP del ribosoma, produciéndose un cambio conformacional del EF-Tu que no favorece la interacción con los ribosomas (Clark, B. F. C. y col., 1984; Douglas, J. y Blumenthal, T., 1979).

Además, el factor EF-Tu cumple una importante función en la fidelidad de la selección del aa-tRNA y en la edición ("proofreading") durante la síntesis proteica, eventos que dependen de las interacciones entre el EF-Tu y el ribosoma exclusivamente. Estas interacciones determinan la velocidad de hidrólisis del GTP y la velocidad de disociación del complejo EF-Tu·GDP del ribosoma (Thompson, R. C. y col., 1986), como se analizará en la sección Discusión.

El complejo binario EF-Tu·GTP es regenerado mediante el intercambio del GDP por GTP, reacción que es mediada por la participación de un segundo factor de elongación, el factor EF-Ts (Clark, B. F. C., 1980; Hachmann, J. y col., 1971; Weissbach, H. y col., 1970). Esto permite que el EF-Tu recupere la conformación que le permitirá realizar un nuevo ciclo de unión del aminoácido a la cadena polipeptídica creciente (figura 1).

Al parecer, la reactividad de la molécula de EF-Tu es modulada a través de transiciones secuenciales en su conformación producidas por el intercambio de GDP y GTP, en

la formación del complejo binario con el EF-Tu (Douglas, J. y Blumenthal, T., 1979).

La importancia funcional del EF-Tu, en la biosíntesis de las proteínas, ha estimulado la investigación de la estructura y de los dominios funcionales de la molécula, del mismo modo que la identificación y expresión de los genes que la codifican.

1.2.- Estructura del factor de elongación EF-Tu de E. coli.

El EF-Tu es la proteína más abundante en *E. coli*, pudiendo alcanzar niveles del 5 al 10 % de la proteína total de la célula dependiendo de las condiciones de crecimiento de la bacteria (Furano, A. V., 1975). Esta cantidad relativamente alta del EF-Tu es igual a la cantidad de aa-tRNA presente en la célula. La razón EF-Tu : EF-Ts : EF-G : proteínas ribosomales es 6:1:1:1, de acuerdo a la alta concentración del EF-Tu en *E. coli*.

El EF-Tu es una proteína monomérica cuya estructura primaria ha sido determinada y comprende 393 aminoácidos con un peso molecular de 43.225 (Arai, K. y col., 1980; Laursen, R. A. y col., 1977; Laursen, R. A. y col., 1981). Su extremo N-terminal corresponde a una serina que se encuentra acetilada, y el C-terminal puede ser glicina o serina, esto porque es la única proteína en *E. coli* que se

encuentra codificada por dos genes diferentes localizados en distintas regiones del mapa genético (tuf A y tuf B) (Furano, A., 1978; Jaskunas, S. R. y col., 1975) (ver más adelante).

Posee una lisina ubicada en la posición 56 que está metilada, al igual que el factor de elongación EF-Tu de *Salmonella typhimurium* (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979; L'Italien, J. J. y Laursen, R. A., 1979; Ohba y col., 1979). Este aminoácido se encuentra como monometil lisina y dimetil lisina cuando el EF-Tu es sintetizado y metilado tanto *in vivo* (Van Noort, J. M. y col., 1986) como *in vitro* (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979; L'Italien, J. J. y col., 1979; Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985; Toledo, H. en esta tesis).

El factor EF-Tu es hidrolizado rápidamente por tripsina, generando un fragmento A (59-393) y dos fragmentos más pequeños D (1-44) y F (45-58). A mayor tiempo de reacción se producen los fragmentos B (59-263) y C (264-393) (Laursen, R. A. y col., 1981; Nakamura, S. y col., 1977). Esta hidrólisis rápida que genera el fragmento F sugiere que la región comprendida entre los aminoácidos 44 al 58 está particularmente expuesta. Nuestros resultados que muestran la accesibilidad de la enzima metilante a la lisina 56 confirman que esta región se encuentra expuesta

(Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985; Toledo, H., en esta tesis).

La proteína contiene tres residuos de cisteína: la cisteína 81, que de acuerdo a los estudios de inhibición de la unión del aa-tRNA con N-tosil-L-fenilalanilclorometano (TPCK) (Jonak, J. y col., 1982) está relacionada con la unión del aa-tRNA; la cisteína 137 se encuentra asociada a la unión de GDP/GTP; y la cisteína 255 que se encuentra oculta en la estructura de la proteína (Clark, B. F. C. y col., 1984).

Otros aminoácidos importantes de destacar son: la histidina 66, que según los experimentos de entrecruzamiento entre el EF-Tu y el ϵ -bromoacetil-L-isil-tRNA está involucrada en la interacción del aa-tRNA con el EF-Tu (Johnson, A. E. y col., 1978; Rubin, J. R. y col., 1981); el ácido aspártico 138, el cual se encuentra en el dominio de unión de GDP y GTP. Su reemplazo por asparragina, mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida, incrementa la afinidad del factor mutado por la xantosina 5' difosfato (XDP) y concomitantemente disminuye la afinidad por GDP (Hwang, Y-W y Miller, D., 1987).

La sustitución de la alanina 375 por treonina, como ocurre en una cepa mutante de *E. coli*, le confiere al EF-Tu resistencia al antibiótico kirromicina, el cual es un inhibidor de la biosíntesis de proteínas que actúa

impidiendo la liberación del EF-Tu • GDP del ribosoma (Parmeggiani, A. y Swart, G. W. M., 1985; Pingoud, A. y col., 1982; Wolf, H. y col., 1974).

Estudios de difracción de rayos X muestran que en la molécula de EF-Tu se pueden reconocer tres dominios (figura 2) (Rubin, J. R. y col., 1981).

El dominio I o "tight", como se le ha denominado, está altamente estructurado e incluye 180 aminoácidos, desde la isoleucina 60 al glutámico 240. En él está el sitio de unión para GDP y posee una alta proporción de estructura secundaria. El plegamiento de este dominio muestra 5 estructuras paralelas, el que es extendido por una sexta antiparalela (Rubin, J. R. y col., 1981). Los segmentos se encuentran conectados a través de 6 estructuras α hélice. Las estructuras β constituyen un núcleo central hidrofóbico. Rodeando éste núcleo central, las estructuras α hélice ofrecen una eficiente interfase al solvente (figura 2 B).

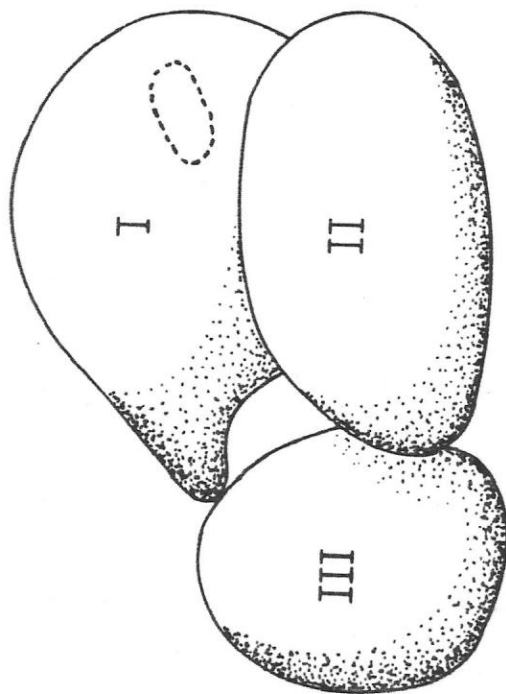
El dominio II o dominio "loose" contiene alrededor de 100 residuos, los cuales forman varias estructuras β pero ninguna α hélice. Este dominio está conectado con las hélices I y II del dominio I y ambos se encuentran covalentemente unidos a través del segmento formado de los residuos 44 al 58 que contiene la lisina-56 metilada, la que como ya se ha dicho, estaría en una región altamente



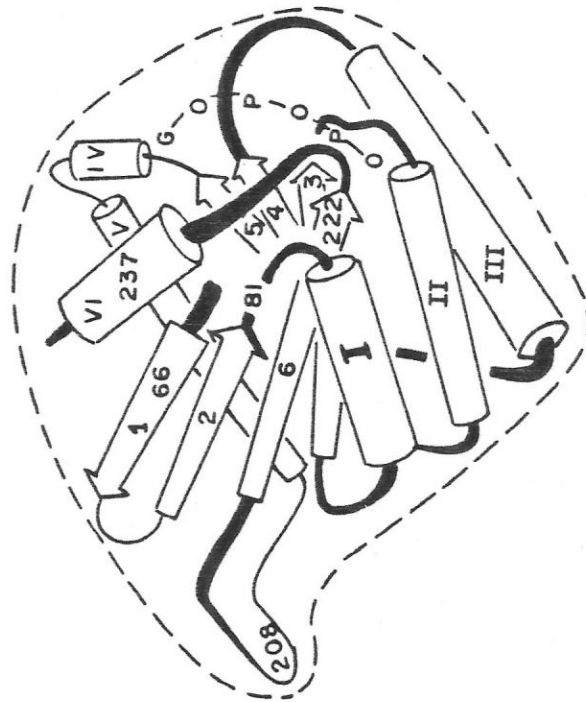
Figura 2.- Modelo preliminar del EF-Tu basado en los estudios de cristalografía de rayos X.

A) Representación tridimensional de los dominios del EF-Tu·GDP a baja resolución. La posición del sitio de unión del GDP se señala por la región delimitada mediante la línea cortada. Los dominios I, II y III se describen en el texto.

B) Elementos de estructura secundaria encontrados en el dominio "tight" (I). Las flechas representan las estructuras β , desde el N-terminal al extremo C-terminal. Los cilindros representan las estructuras α -hélice (tomado de Duieterwinkel, F. J., 1984).



A



B

expuesta de la molécula. El resto de las interacciones son debidas a interacciones hidrofóbicas y puentes salinos.

La densidad electrónica en el dominio III o dominio "floppy" hace difícil definirlo debido a la aparente falta de estructura secundaria. Este se encuentra unido al dominio II a través del residuo 300, que corresponde a una prolina (Clark, B. F. C. y col., 1984; Bosch, L. y col., 1983).

1.3.- Los genes que codifican el factor de elongación EF-Tu.

Existen dos genes que codifican EF-Tu en *E. coli* (Furano, A., 1978; Jaskunas, S. R. y col., 1975). El gen *tuf A*, que se encuentra en la región *str* del mapa genético, a los 73 minutos, y el gen *tuf B*, en la región *rif*, a los 88 minutos.

La unidad transcripcional donde se encuentra el gen *tuf A* contiene además tres genes que codifican el factor de elongación EF-G (*fus*) y las proteínas ribosomales S12 (*rpsL*) y S7 (*rpsG*), los cuales son cotranscritos en la dirección *rpsL*, *rpsG*, *fus* y *tuf A* (Jaskunas, S. R. y col., 1977).

Los cuatro genes se encuentran bajo el control de un promotor común (Jaskunas, S. R. y col., 1975; Post, L. A. y col., 1978). A pesar de ello, el EF-G y las proteínas ribosomales (S7 y S12) se expresan en cantidades

equimolares, mientras que el EF-Tu se expresa 3,5 veces más. Esto sugiere que algún tipo de señal localizada cerca del gen tuf A es responsable de su mayor expresión (An, G. y col., 1982; Zegel, J. M. y Lindahl, L., 1982).

El otro "locus" que codifica para el EF-TuB contiene además cuatro genes de tRNA que codifican el tRNA^{Thr4} (thrU), el tRNA^{Tyr2} (tyrU), el tRNA^{Gly2} (glyT) y el tRNA^{Thr3} (thrT), además del gen tuf B, los que se cotranscriben en el mismo orden en una única unidad transcripcional (Lee, J. S. y col., 1981; Hudson, L. y col., 1981).

El estudio de los genes del EF-Tu ha permitido contar con fagos λ transductores, tales como el fago λ rif^{d18} que contiene el gen tuf B y el fago λ fus³ que contiene el gen tuf A. El empleo del DNA de estos fagos ha sido muy útil para estudiar la síntesis y regulación de la expresión del EF-Tu in vitro (Chu, F. y col., 1976; Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985). Estos sistemas no sólo permiten estudiar la síntesis de las proteínas codificadas en el DNA del fago sino que también su modificación post-traducciona in vitro (Jerez, C. y Weissbach, H., 1980; Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985).

El gen tuf A se expresa 3,5 veces más que el gen tuf B (Reech, S. y Pedersen, S., 1978). Tanto in vivo como in vitro el EF-Tu se sintetiza en proporción de 6 a 8 veces

mayor que las proteínas ribosomales (Furano, A. V., 1975; Zarucki-Schulz, T. y col., 1979).

Se determinó primero la secuencia nucleotídica del gen tuf A (Yokota, T. y col., 1980), encontrándose una completa coincidencia entre la secuencia de aminoácidos deducida del DNA y la estructura primaria de la proteína, que había sido determinada a partir de la mezcla de los productos EF-TuA y EF-TuB (Arai, K. y col., 1980). Del análisis de la secuencia nucleotídica se determinó que el C-terminal para el producto del gen tuf A es glicina (GGC), mientras que para el producto del gen tuf B es serina, como se dedujo de su secuencia (An, G. y Friesen, J. D., 1980).

Al comparar los productos de la digestión triptica del EF-TuB con los productos obtenidos de la digestión con tripsina del EF-TuA se encontró que no existía una divergencia significativa entre ambas proteínas (Furano, A. V., 1977). Hecho que se confirma al comparar la secuencia de ambos genes, observándose una marcada conservación entre ellos. Existen sólo trece posiciones diferentes, dos de las cuales reemplazan la primera posición de sendos codones, correspondientes a los codones de iniciación (tuf A: GUG; tuf B: AUG) y a los codones para el C-terminal (tuf A: GGC; tuf B: AGC). Las otras once diferencias reemplazan la tercera posición del codón, de modo que no se afecta la información para el aminoácido.

La duplicación de los genes *tuf* se ha descrito en *E. coli* K12, *E. coli* B y en *Salmonella typhimurium* (Furano, A. V., 1978). También, se ha descrito bacterias que poseen un sólo gen *tuf*, como *Bacillus subtilis* (Smith, I. y Pares, P., 1978) y la arqueobacteria *Methanococcus vannielii* (Lechner, K. y Bock, A., 1987).

El que existan bacterias con un solo gen, junto al hecho que la inactivación del gen *tuf* B en *E. coli* inhibe levemente el crecimiento de la bacteria, no permite establecer claramente la necesidad funcional de ésta duplicación.

Con respecto a la conservación de los genes de *E. coli*, estos presentan una divergencia muy baja al comparar con los de bacterias no relacionadas. A través de experimentos de hibridación del DNA, se ha podido establecer una alta homología entre diferentes bacterias (Filer, D. y Furano, A. V., 1980). Además, existe una extensa homología entre el gen *tuf* de *E. coli* y el gen de EF-Tu que contiene el DNA de cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* (Watson, J. C. y Surzycki, S. J., 1982).

Estas observaciones, junto a las similitudes estructurales encontradas entre los factores de diferentes especies de *Streptomyces* y el EF-Tu de *E. coli* (Weiser, J. y Mikulik, K., 1981) más la alta homología que presenta el EF-Tu de cloroplasto de *Euglena Gracilis* con el de *E. coli*,

deducida de la secuencia de nucleótidos (Montandon, P. E. y Stutz, E., 1983), pueden implicar la existencia de una fuerte presión selectiva que opera de modo de preservar ciertas secuencias del gen *tuf* entre los procariontes.

La multifuncionalidad del EF-Tu y su capacidad de interactuar con diferentes ligandos, hacen de ésta proteína un modelo ideal para estudios de relación estructura y función.

1.4.-Objetivos de la Tesis

En este trabajo, hemos analizado la metilación del factor EF-Tu en relación a su papel más importante, cual es la síntesis de proteínas. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar comparativamente la metilación del factor de elongación EF-Tu en diferentes bacterias, incluyendo el cloroplasto como de un posible origen bacteriano.
- 2.- Desarrollar sistemas de metilación del factor de elongación EF-Tu in vitro.
- 3.- Identificar la enzima responsable de la metilación del factor de elongación EF-Tu en *E. coli*.
- 4.- Analizar la función de la metilación del factor de elongación EF-Tu en la síntesis de proteínas.

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Reactivos

La (metil-³H)metionina (85 Ci/mmol), el S-Adenosil-L-(metil-³H)-metionina (85 Ci/mmol), (8-³H)-Guanosina 5' -difosfato (10,8 Ci/mmol), (8-³H)-Guanosina 5' -trifosfato (10 Ci/mmol), L-(³⁵S)metionina (1000 Ci/mmol) y el "Amplify" se adquirieron en Amersham International. La glucosa, cianocobalamina, ácido málico, ácido glutámico, sacarosa, tiamina, ácido nicotínico, ácido uridílico, glicerol, EDTA, biotina, 2-mercaptoetanol, PMSF, alúmina, acrilamida, bisacrilamida, urea, TEMED, riboflavina, Tris, Tricine, diaminoctano, azul de Coomassie, SDS, ninhidrina, ATP, GTP, CTP, UTP, fosfoenolpiruvato, PPO, POPOP, tRNA total de *E. coli*, DNAasa DN-100, RNAasa, piruvato quinasa, lisozima, aminoácidos, ϵ -N-monometilisina, sulfona de metionina, sulfóxido de metionina, S-AdoMet, etionina, DEAE-Sephadex A50, Sephadex G-100, Sepharose 4B-200, bromuro de cianógeno, borohidruro de sodio y placas cromatográficas de polietilenimino celulosa se adquirieron en Sigma Chemical Co. ϵ -N-trimetilisina se obtuvo de Calbiochem-Behring. La bactotripton y el extracto de levaduras se adquirieron en Difco. Ácidos, solventes

orgánicos y sales minerales se adquirieron en Merck. La piridina fue obtenida de Riedel de Haen. El papel filtro 3 MM, papel filtro N°1 y los discos de fibra de vidrio (2,5 cm de diámetro) GF/C, se adquirieron en Whatman. Los filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell; grado: BA85; 2,5 cm de diámetro; 0,45 micrones) y las películas radiográficas Kodak X-Omat AR5 se adquirieron en VWR. La kirromicina fue gentilmente donada por B. Kraal

2.2.- Cepas de Microorganismos

Escherichia coli D-10 (met, rel), fue gentilmente cedida por D. Hayes; *Escherichia coli* LBE 1001, un tipo silvestre de la cepa de *E. coli* K12 y *Escherichia coli* MRE 600 (RNAasa⁻), fueron gentilmente donadas por B. Kraal; *Bacillus subtilis* BR 151 (met, lis, trp), se ha mantenido en nuestro laboratorio por varios años; *Bacillus stearothermophilus* 1063 str^r, fue donada por S. Fanestock; *Euglena gracilis* variedad bacillaris, donada por G. Mora y J. Schiff; *Euglena gracilis* W₁₀ BS_mL, cedida por B. Gómez y J. Schiff.

2.3.- Medios de cultivo

Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento para los diferentes microorganismos se resumen en la Tabla I. Los medios mínimos se utilizaron para obtener células

Tabla I
Cepas de microorganismos y medios de cultivo

Microorganismo	Medios de cultivo	Temperatura de crecimiento
Escherichia coli D-10 (met, rel)	a) mínimo M-9	37°
	b) mínimo M-9 suplementado con etionina	37°
	c) medio rico	37°
Escherichia coli LBE 1001	a) mínimo M-9	37°
	b) medio rico	37°
Escherichia coli MRE 600 (RNAasa ⁻)	a) mínimo M-9	37°
Bacillus subtilis BR 151 (met, lis, trp)	a) medio Spizizen	37°
Bacillus stearothermophilus 1063 str ^r (met)	a) mínimo TMLM	60°
Euglena gracilis	a) medio Hutner	30°
Euglena gracilis W ₁₀ BSmL	a) medio Hutner	30°

marcadas radiactivamente o para obtener el factor de elongación EF-Tu submetilado. Los medios ricos se utilizaron para obtener células no marcadas o factor de elongación EF-Tu metilado.

2.3.1.- Medio mínimo M-9 para E. coli. Contenia por litro: 10 g de NH_4Cl , 3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 y 0,5 g de NaCl . El pH se ajustó a 7 y después de esterilizado, el medio se suplementó con 65 mg de MgSO_4 , 4 g de glucosa y 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina o etionina.

Las soluciones de glucosa y el MgSO_4 se autoclavaron independientemente, en tanto que las soluciones de metionina y de etionina se esterilizaron mediante filtración, a través de filtros Nalgen (0,4 micrones).

2.3.2.- Medio rico para E. coli. Contenia por litro de medio: bactotripton 10 g y NaCl 5 g. La solución se esterilizó mediante autoclavado.

2.3.3.- Medio mínimo de Spizizen para B. subtilis. Contenia por litro: 14 g de K_2HPO_4 , 6 g de KH_2PO_4 , 1 g de citrato trisódico $\times 2$ de H_2O , 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mg de $\text{MgSO}_4 \times 7$ de H_2O . Después de esterilizado se suplementó con 5 g de glucosa, que se esterilizó independientemente por autoclavado, y con 10 $\mu\text{g/ml}$ de triptofano, 20 $\mu\text{g/ml}$ de lisina y 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina, que se esterilizaron mediante filtración.

2.3.4.- Medio mínimo TMLM para B. stearrowthermophilus.
Contenfa por litro: 42 mg de histidina, 100 mg de isoleucina, 52 mg de metionina, 126 mg de valina, 400 mg de ácido glutámico, 1 mg de biotina, 1 mg de ácido nicotínico, 1 mg de tiamina, 5 mg de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ de H}_2\text{O}$, 50 μg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ de H}_2\text{O}$, 162 μg de MnCl_2 , 2 g de glucosa, 1 g de NH_4Cl , 1 g de NaCl , 400 mg de MgSO_4 y 50 ml de amortiguador fosfato 1,8 M pH 7,7.

El volumen final se ajustó con agua desionizada y la solución se esterilizó por filtración. El pH final de este medio fue de 7,3.

2.3.5.- Medio rico para B. stearrowthermophilus. Contenfa por litro: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levaduras, 5 g de NaCl , 10 g de glucosa y 0,1 mg de MnCl_2 . El pH final se ajustó a 7 con KOH 1 N. La solución se esterilizó por autoclavado.

2.3.6.- Medio de Hutner para E. gracilis. Contenfa por litro: 0,4 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de MgSO_4 ; 0,2 g de CaCO_3 ; 5 g de ácido glutámico; 2 g de ácido málico; 5 mg de FeCl_3 ; 0,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 0,44 ml de una mezcla de metales trazas. Después de esterilizada esta solución se suplementaba con 4 ml de una mezcla de antibióticos y vitaminas. La mezcla de metales trazas contenfa por litro de solución:

28 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ x6 de H_2O ; 24,8 g de MnSO_4 x1 de H_2O ; 52,8 g de ZnSO_4 x7 de H_2O ; 0,8 g de CuSO_4 x5 de H_2O ; 0,36 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ x4 de H_2O ; 4,8 g de CoSO_4 x7 de H_2O ; 0,37 g de Na_3VO_4 x16 de H_2O ; 1,14 g de H_3BO_3 .

La mezcla de antibióticos y vitaminas contenía:

6 mg de tiamina; 3 mg de cianocobalamina y $2,4 \times 10^6$ unidades de penicilina sódica. Estos tres últimos compuestos se disolvieron en 300 ml de H_2O , se filtraron en condiciones estériles y se guardaron congelados a -20°C .

2.4.- Amortiguadores utilizados en la preparación de los extractos celulares

2.4.1.- Amortiguador A. (Lavado de células): Tris HCl 10 mM pH 7,8; KCl 50 mM; MgCl_2 10 mM; EDTA 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; glicerol 10 % (v/v).

2.4.2.- Amortiguador B. (Ruptura de células): Tris HCl 50 mM pH 7,5; MgCl_2 20 mM; KCl 0,2 M; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 6 mM; PMSF 3,5 mM; glicerol 5 % (v/v).

2.4.3.- Amortiguador C. (Lavado de ribosomas): Tris HCl 10 mM pH 7,5; acetato de magnesio 10 mM; NH_4Cl 0,5 M; 2-mercaptoetanol 6 mM.

2.4.4.- Amortiguador D. (Lavado de *E. gracilis*): Tris HCl 50 mM pH 7,8; MgCl_2 40 mM; NH_4Cl 75 mM.

2.5.- Crecimiento y marcación de células

2.5.1.- Crecimiento de bacterias para los ensayos de metilación in vivo

Para los experimentos de metilación *in vivo* del factor de elongación EF-Tu de eubacterias, se creció cada tipo de célula en su correspondiente medio mínimo (ver Tabla I). Los cultivos se hicieron en 100 ml de medio, a la temperatura adecuada (ver Tabla I) y con agitación, hasta la fase semilogarítmica de crecimiento para impedir la esporulación del *B. subtilis* y del *B. stearothermophilus*. En ese momento las células se cosecharon en forma estéril, mediante centrifugación a 9.000 rpm por 10 min a 5° en un rotor Beckman JA-14. El sedimento de células se lavó dos veces con su correspondiente medio mínimo de cultivo, carente de metionina, y posteriormente, se resuspendió en 50 ml del mismo medio, pero sin metionina. De cada una de estas suspensiones celulares se tomaron dos alícuotas de 5 ml, para cada microorganismo. A una de estas alícuotas se le agregó 1 mg de cloramfenicol y se prosigió la incubación de ambas por 8 min a 30° en el caso de *E. coli* y del *B. subtilis* o a 50° en el caso del *B. stearothermophilus*. Luego se tomó 1 ml de cada una de las alícuotas anteriores y se las suplementó con (metil-³H)metionina, de modo tal que la

concentración final del isótopo fue de $2,2 \mu\text{M}$, y se continuó la incubación por 30 min.

De cada alícuota de cultivo, incubada en ausencia o en presencia de cloramfenicol y de (metil- ^3H)metionina, se tomaron finalmente fracciones de $300 \mu\text{l}$. Una de estas fracciones se diluyó 10 veces con acetona fría (para detener posibles actividades metilasas). Las células se cosecharon mediante centrifugación. Los precipitados celulares se lavaron y se guardaron a -70° (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979). El crecimiento celular se siguió midiendo la absorbancia a 660 nm , en un espectrofotómetro Zeiss, durante todo el proceso.

2.5.2.- Crecimiento de E. coli en condiciones limitantes de metionina

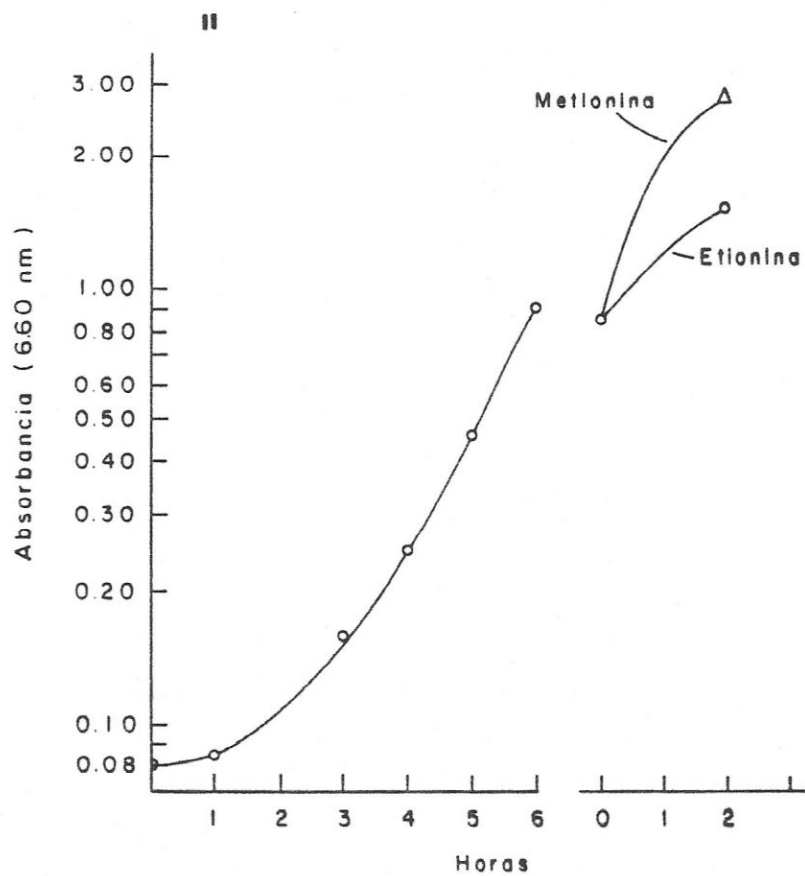
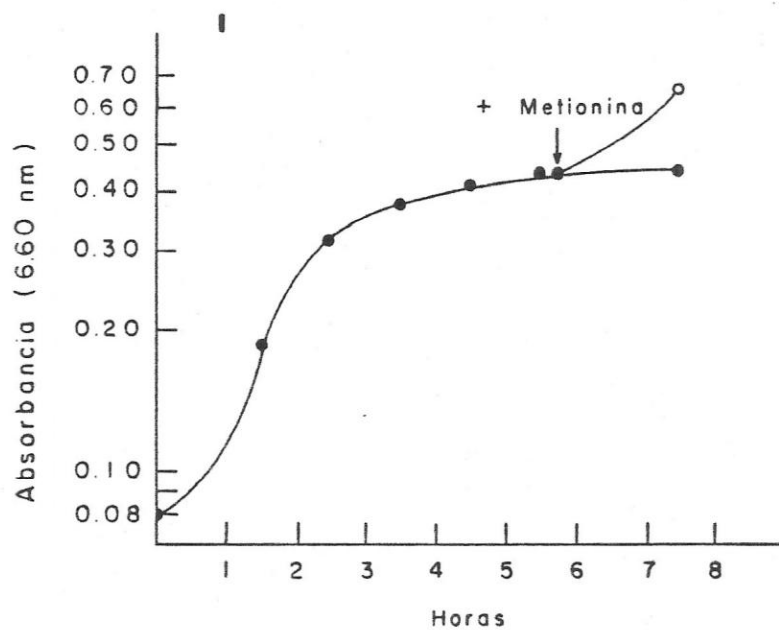
Se creció *E. coli* D-10 en medio mínimo suplementado con sólo $0,8 \mu\text{g/ml}$ de metionina, con agitación y a 37° (Chang, C. N. y Chang, F. N., 1974). En estas condiciones, al cabo de 1,5 h se agotó la metionina en el medio, a juzgar por el cese en el incremento en la absorbancia del cultivo medida a 660 nm en un espectrofotómetro Zeiss (figura 3 I). Se confirma que la metionina se agotó en el medio ya que al suplementarlo con $20 \mu\text{g/ml}$ del aminoácido, las células recuperaron su crecimiento. Sin embargo, manteniendo el cultivo por 1,5 h después del agotamiento de

Figura 3.- Curvas de crecimiento de E. coli D-10 en medio que permiten la submetilación artificial.

I.- Se creció E. coli D-10 en medio mínimo suplementado con 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de metionina (o no), con agitación y a 37°. Durante 6 horas el cultivo se mantuvo bajo las mismas condiciones (o no) o se suplementó con 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina (o no).

II.- Se creció E. coli D-10 en medio mínimo suplementado con 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina, con agitación y a 37°. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,8 U/ml, las células se cosecharon mediante centrifugación a 15.000 g por 20 min a 4°. Después de lavarlas, 2 veces, con el medio de cultivo sin metionina, se transfirieron al mismo medio pero suplementado con 20 $\mu\text{g/ml}$ de etionina y se continuó el cultivo en las mismas condiciones por 2 h más (o no) o bien se suplementaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina ().

El crecimiento de las células se siguió midiendo la variación de la absorbancia del cultivo a 660 nm en un espectrofotómetro Zeiss.



la metionina, se obtiene una preparación de células submetiladas, las que se cosecharon en forma estéril mediante centrifugación a 10.000 rpm por 20 min a 4°, en un rotor Sorvall GSA.

2.5.3.- Crecimiento de E. coli en presencia de etionina

E. coli D-10 crecidas con agitación y a 37° en medio mínimo suplementado con 20 µg/ml de metionina, se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento ($OD_{660\text{ nm}} = 0,8 \text{ U/ml}$). Las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 4° con el mismo medio de cultivo pero sin metionina. Luego se resuspendieron en el medio mínimo suplementado con 20 µg/ml de etionina para dar una densidad óptica medida a 660 nm igual a 0,75-0,8 U/ml y se continuó la incubación a 37° por 1,5 h con agitación (figura 3 II). Luego las células se cosecharon y se lavaron 2 veces con la solución de lavado (Alix, J-H. y Hayes, D., 1974).

El aparente incremento de la absorbancia del cultivo en presencia de etionina se debió a un aumento en el tamaño de las bacterias (Smith, R. C. y Salmon, W. D., 1965). Hubo muy poca división celular, a juzgar por el número de células contadas en una cámara de Petroff-Hausser y Helder. Al inicio del cultivo en presencia de etionina se determinaron

4×10^9 células/ml y al cabo de 90 min de incubación, la cantidad fue de 5×10^9 células/ml.

2.5.4.- Crecimiento y marcación de E. gracilis para estudiar la metilación in vivo e in vitro del EF-Tu

Para estudiar la metilación in vivo del factor de elongación EF-Tu de cloroplastos en *E. gracilis*, las células se crecieron en 50 ml de medio Hutner hasta la fase semilogarítmica de crecimiento, a la temperatura adecuada (ver Tabla I) y con agitación, en presencia de luz artificial (con 4 tubos fluorescentes de 20 Watts cada uno, para el caso de la *E. gracilis* variedad bacillaris). El crecimiento celular se siguió midiendo, en matraces con tubo lateral, la absorbancia con filtro rojo (660 nm) en un fotocolorímetro Klett-Summerson, o bien contando el número de células en una cámara de Petroff-Hausser y Helder. Cuando las células alcanzaron la fase semilogarítmica de crecimiento se tomaron alícuotas de 5 ml del cultivo, las que se suplementaron con 1 mCi de (metil- ^3H)metionina y se continuó la incubación en las condiciones ya descritas por 24 h. Luego de este período las células se cosecharon mediante centrifugación y se lavaron dos veces con la solución de lavado.

Para los experimentos de metilación in vitro del EF-Tu de cloroplastos, las células se crecieron en las mismas

condiciones, salvo que los cultivos se hicieron en 2 litros de medio Hutner.

2.5.5.- Crecimiento de E. gracilis W₁₀BSmL

La *E. gracilis* W₁₀BSmL se creció en el medio Hutner en las mismas condiciones descritas para la *E. gracilis* variedad bacillaris, pero en ausencia de luz artificial, ya que esta mutante carece de cloroplastos.

2.5.6.- Crecimiento de E. coli en medio rico

E. coli LBE 1001 se creció en medio rico hasta la fase estacionaria tardía, durante 15 h a 37° con agitación. Las células se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron 2 veces con solución de lavado y se rompieron como se describe en 2.6.1.

Para obtener una fuente de enzimas con el propósito de aminoacilar el tRNA total de *E. coli*, se creció *E. coli* MRE 600 en medio rico y se cosecharon las células en la fase logarítmica tardía.

2.6.- Ruptura de células y obtención de extractos celulares

2.6.1.- Ruptura de células de E. coli crecidas en condiciones de submetilación

Las células crecidas en condiciones submetilantes, es decir en presencia de cantidades limitantes de metionina o en presencia de etionina, se lavaron 2 veces con la solución de lavado, se rompieron mediante molienda con alúmina (1:2,5 p/p) y se resuspendió el macerado en 1 volumen de amortiguador de ruptura de células (2.6.2). El homogeneizado se centrifugó 2 veces a 30.000 g por 20 min a 4° (S30). El S30 se centrifugó entonces a 150.000 g por 4,5 h a 4° (S150). El S150 obtenido se dializó a 4° contra 2 litros de amortiguador de metilación (ver 2.11.1) por 2 h, con un cambio de amortiguador.

2.6.2.- Preparación de un extracto crudo para aminoacilación del tRNA de E. coli

Se rompieron 7 g de E. coli MRE 600 mediante molienda en un mortero con alúmina (1:2,5 p/p) hasta obtener una pasta homogénea. Este macerado se resuspendió en 14 ml de amortiguador de ruptura (Tris HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, KCl 200 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM, PMSF 3,5 mM y glicerol 5% v/v) y se centrifugó dos veces a 30.000 g por

20 min. Al sobrenadante obtenido (S30) se le agregó DNAasa hasta una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se centrifugó a 150.000 g por 4 h. El sobrenadante (S150) se dializó contra 2 litros de un amortiguador que contenía: Tris HCl 10 mM pH 7,5, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM. De esta forma se obtuvo una preparación cruda de aminoacil-tRNA sintetasa.

2.6.3.- Preparación de extractos de células de E. gracilis

Para inmunoprecipitar el EF-Tu de cloroplasto, las células marcadas radiactivamente en la sección 2.5.4, se rompieron resuspendiéndolas en amortiguador de inmunoprecipitación (Tris HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM y Tritón X-100 1%), mediante sonicación (30 seg a 200 Watts por 4 veces, con intervalos de 1 min cada vez).

En los experimentos de metilación in vitro en que se utilizó extracto total de *E. gracilis* variedad bacillaris como de la mutante $W_{10}\text{BSmL}$, las células también se crecieron hasta la fase semilogarítmica de crecimiento. Los precipitados celulares se resuspendieron en 1 volumen de amortiguador de metilación y la suspensión se sonicó por 20 seg a 200 Watts por 4 veces, con intervalos de 1 min cada vez, en un sonicador Braunsonic 1510. El homogeneizado se centrifugó 2 veces sucesivas a 30.000 g por 20 min a 4°

para descartar los restos celulares y el sobrenadante se utilizó para los ensayos de metilación de los extractos totales *in vitro*.

2.6.4.- Obtención de cloroplastos

Las células de *E. gracilis* crecidas en 2 litros de medio Hutner, se lavaron y se rompieron mediante molienda con perlas de vidrio (75-150 micrones), resuspendiéndolas en un volumen de amortiguador KTM15 (Tris HCl 50 mM pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl₂ 15 mM y sacarosa 0,25 M) igual al peso del precipitado celular obtenido. El homogeneizado se centrifugó a 700 g por 3 min y el sobrenadante de esta centrifugación se recentrifugó a la misma velocidad por 2 min y luego a 1.200 g por 10 min. El precipitado, que corresponde a los cloroplastos crudos, se resuspendió en 2 volúmenes de amortiguador KTM15 homogeneizando suavemente. Este homogeneizado se centrifugó nuevamente a 700 g por 5 min para sedimentar los restos celulares y los núcleos contaminantes. El sobrenadante, que contenía los cloroplastos, se centrifugó a 1.200 g por 15 min. Estos últimos dos pasos se repitieron dos veces para obtener cloroplastos puros (Avandhani, N. G. y Buetow, D. E., 1972).

2.6.5.- Preparación de extractos de cloroplasto

Los cloroplastos purificados se resuspendieron en amortiguador de metilación (ver 2.11.1) y se sonicaron durante 15 seg a 200 Watts por 4 veces con intervalos de 1 min , a 0°. El homogeneizado resultante se centrifugó a 14.000 g en una centrifuga Eppendorf a 4° y el sobrenadante se utilizó para los experimentos de metilación del EF-Tu de cloroplastos.

2.7.- Métodos electroforéticos

2.7.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

2.7.1.1.- Geles cilíndricos de poliacrilamina al 10 %

Para analizar el EF-Tu metilado in vitro e inmunoprecipitado se realizaron geles cilíndricos de poliacrilamida, de 9 cm, en las condiciones siguientes:

acrilamida al 10 %, bisacrilamida al 0,27 %, Tris HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 0,1 %, TEMED al 0,15 % y persulfato de amonio al 0,05 %

Una vez polimerizados los geles se aplicaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis a temperatura ambiente y a una intensidad de corriente constante de 1 mA por tubo hasta que la muestra penetró en el gel y posteriormente se continuó la electroforesis a una

intensidad de corriente constante de 3 mA por tubo, durante aproximadamente 4 h.

2.7.1.2.- Geles en placa de poliacrilamida al 10 %

Para el análisis del EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis* se realizaron geles de poliacrilamida en placas de vidrio en las condiciones siguientes:

Gel de separación: acrilamida al 10 %, bisacrilamida al 0,27 %, glicerol al 1 %, Tris HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,037 % y TEMED al 0,03 %

Se dejó polimerizar por 2 a 3 h y se adicionó el gel de concentración.

Gel de concentración: acrilamida al 3 %, bisacrilamida al 0,08 %, Tris HCl 0,125 M pH 6,8, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,03 % y TEMED al 0,01 %.

Una vez polimerizado el gel de concentración se aplicaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis a temperatura ambiente y a un voltaje constante de 55 Volt, durante toda la noche.

2.7.1.3.- Geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %

Para el análisis del factor EF-Tu metilado *in vivo* como *in vitro* en extractos de células o inmunoprecipitado se realizaron geles de poliacrilamida en gradiente en placas de vidrio en las condiciones siguientes:

Gel de separación: se prepararon dos soluciones que contenían, a) acrilamida al 7 %, bisacrilamida al 0,185 %, glicerol al 0,9 %, Tris HCl 0,375 M, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,034 % y TEMED al 0,027 %, y b) acrilamida al 15 %, bisacrilamida al 0,4 %, glicerol al 4 %, Tris HCl 0,375 M, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,034 % y TEMED al 0,027 %.

Ambas soluciones se mezclaron con la ayuda de un aparato para la preparación de soluciones en gradiente de concentración, marca Buchler.

Se dejó polimerizar durante 2 a 3 h y se egragó el gel de concentración, que se preparó igual que en el caso anterior.

Una vez que polimerizó el gel de concentración se aplicaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis a temperatura ambiente y a un voltaje constante de 55 Volt, durante toda la noche.

En todos los sistemas electroforéticos, ya sea en geles cilíndricos o en placa y con SDS, el amortiguador electrolítico que se utilizó contenía Tris 0,025 M, glicina 0,19 M y SDS al 0,1 %, el pH de la solución era 8,9. Una vez que finalizó la electroforesis los geles se tiñeron con azul de coomassie (Laemmli, U. K., 1970).

2.7.1.4.- Electroforesis bidimensional de O'Farrell

Para la determinación de pureza del EF-Tu purificado mediante cromatografía de afinidad se realizó geles bidimensional de O'Farrell en las condiciones descritas por O'Farrell (O'Farrell, P. H., 1975).

2.7.2.- Mapa peptídico in situ mediante proteólisis limitada en presencia de SDS

El método de proteólisis limitada consiste en la digestión parcial de una proteína que ha sido aislada a partir de un gel de poliacrilamida/SDS, mediante alguna proteasa en un amortiguador que contiene SDS. Bajo estas condiciones se produce una digestión parcial estable y los péptidos se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 %, en presencia de SDS (0,1 %), en placas de vidrio. El patrón de péptidos generados, altamente reproducible, es característico de la proteína sustrato y de la enzima proteolítica empleada.

El procedimiento consistió en cortar de un gel previamente seco la banda de proteína apropiada, la que se depositó en los pocillos de muestra del gel de concentración (4 cm de largo). El trozo de gel se hidrató *in situ* por 20 min con 20 μ l de una solución que contenía: Tris HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 %, glicerol 10 %, EDTA 0,001 M, 2-mercaptoetanol 0,043 M y trazas de azul de bromofenol. Después, a las muestras se les agregó 10 μ l de proteasa (1 μ g de proteasa V8 de *S. aureus*) en la misma solución anterior y se continuó la incubación por 35 min. Finalizado este período, se realizó la electroforesis aplicando 25 voltios por 2,5 h, aumentando posteriormente el voltaje a 60 voltios y se prosiguió la electroforesis en la forma habitual (Cleveland, D., 1983).

2.7.3.- Preparación de las muestras para electroforesis

Las muestras líquidas como las sólidas, antes de ser aplicadas a los geles de poliacrilamida, se mezclaron con solución de muestra de Laemmli que contenía Tris HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol al 0,001 % (Laemmli, U. K., 1970). Se hirvieron inmediatamente por 5 min en un baño de agua hirviente y se centrifugaron por 1 min en la centrifuga

Eppendorf, para remover el material insoluble. El sobrenadante se aplicó a los geles de poliacrilamida.

2.7.4.- Tinción de los geles con azul de coomassie

Los geles cilíndricos se sumergieron en una solución que contenía ácido acético glacial al 9,2 %, metanol 45,4 % y azul de coomassie al 0,07 % y se incubaron por 1,5 h a 57°. Posteriormente se destiñeron colocándolos en una solución de ácido acético al 7,5 % y metanol al 5 % e incubándolos durante toda la noche a 37°.

Mientras que los geles en placa se sumergieron en una solución que contenía ácido acético glacial al 7 %, metanol al 50 % y azul de coomassie al 0,2 % y se incubaron por 1 h a 37°. Posteriormente se destiñeron colocándolos en una solución de ácido acético glacial al 7 % y metanol al 20 % e incubándolos por aproximadamente 4 h a 37°, realizando cambios de la solución cada 30 min.

2.7.5.- Autorradiografías

Con el fin de localizar las bandas de proteínas radiactivas en los geles de poliacrilamida en placa, se realizaron autorradiografías. Para esto se incubaron los geles con Amplify durante 30 min a 37°, se secaron al vacío y se expusieron a películas autorradiográficas Kodak X-Omat AR-5 a -70°, en chasis herméticos con doble

pantalla intensificadora. El tiempo de exposición de las autorradiografías varió dependiendo de la cantidad y tipo de isótopo presente en las proteínas. Finalmente las películas se revelaron y se fijaron.

2.7.6.- Electroforesis de alto voltaje.

Se realizó en papel Whatman 3 MM de 53 x 20 cm, durante 1 h a 2.000 volts, en amortiguador borato de sodio 0,05 M pH 9,3. Bajo estas condiciones todos los aminoácidos básicos migran juntos, pero el sistema permite separar éstos de los aminoácidos neutros metilados, de la metionina y sus productos de oxidación. Como marcador se utilizó 6 μ g de azul de bromofenol. Las muestras junto con 10 μ g de cada uno de los estándares se aplicaron a 22 cm de uno de los extremos del papel.

Una vez aplicadas las muestras, el papel se empapó con amortiguador borato y se colocó entre dos láminas gruesas de polietileno (41 x 50 cm) las que se ubicaron a su vez entre 2 placas de vidrio del mismo tamaño para mantener estirado el papel durante la electroforesis. Todo este sistema se colocó sobre una placa de cobre refrigerada con agua circulante, quedando los extremos del papel conectados a los electrodos y cubetas que contenían el amortiguador borato, mediante un trozo adicional de papel Whatman 3 MM (20 x 13 cm). La localización de los aminoácidos y la

determinación de la radiactividad se hizo de la misma forma descrita que para la cromatografía descendente.

2.8.- Procedimientos inmunológicos

2.8.1.- Obtención de antisuero polivalente contra EF-Tu

Como fuente de antígeno se utilizó EF-Tu purificado mediante cromatografía de afinidad, el que se resuspendió en 1 ml de solución salina de Hanks balanceada, sin Mg^{+2} ni Ca^{+2} , en una concentración de 100 $\mu g/ml$. Esta solución se mezcló en una proporción de 1:1 con adyuvante completo de Freund, en la primera inmunización y con adyuvante incompleto de Freund para las tres inmunizaciones siguientes y se sometió a abundante emulsificación mediante jeringas. La emulsión se inyectó, 1 vez por semana, subcutáneamente en cuatro sitios en conejos hembra blancos New Zealand. La sangre obtenida de los conejos se dejó a 37° toda la noche. Después de la coagulación el suero se obtuvo por centrifugación a baja velocidad (10.000 g por 10 min) y se inactivó la acción del complemento por incubación del suero a 56° por 20 min. El suero resultante se tituló, se dividió en alícuotas y se guardó a -20°.

2.8.2.- Inmunodifusión de Ouchterlony

Se utilizó el método de inmunodifusión de Ouchterlony en placas de agar al 1 % en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,5. La cavidad central contenía 10 μ l de suero antiEF-Tu y las cavidades periféricas cantidades variables de los extractos que se analizaron.

2.8.3.- Inmunoprecipitación en solución

Para inmunoprecipitar el EF-Tu en solución se tomaron alícuotas de 50 μ l de muestra más 100 μ l del correspondiente antisuero en Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M y Tritón X-100 1 % (solución C) en un volumen final de 200 μ l (Morrissey, J. J. y col., 1976). Las mezclas de reacción se incubaron a 37° por 4 h y luego se enfriaron a 4°. Los inmunoprecipitados se sedimentaron mediante centrifugación, luego se lavaron 2 veces con 200 μ l de solución C y se disolvieron como fue descrito por Zarucki-Schulz (Zarucki-Schulz, T. y col., 1979).

2.8.4.- Medición de la concentración de EF-Tu por la técnica de inmunopresión

Las muestras para determinar la concentración de EF-Tu se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa de 9 x 12 cm mediante succión en un aparato de microfiltración

BIO-DOT. Se lavó cada pocillo de muestra con 100 μ l de Na_2CO_3 0,1 M pH 10. Después se incubó la membrana durante 5 min en 30 ml de amortiguador de transferencia y lavado (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,15 M y leche descremada 5 %) y posteriormente 1 h en 90 ml de amortiguador de transferencia y lavado que contenía suero antiEF-Tu (1:100). Luego se lavó la membrana 5 veces con 30 ml del amortiguador sin suero durante 10 min cada vez, con agitación, y se incubó por 1 h con el amortiguador que contenía además 1,5 μ Ci de ^{125}I -proteína A. Después de esta incubación el filtro se lavó 3 veces con 30 ml del amortiguador de transferencia y lavado durante 10 min y 2 lavados de 30 ml con el mismo amortiguador pero sin leche durante 30 min cada vez. Todas las etapas anteriores se desarrollaron a temperatura ambiente. La membrana se secó y se expuso a una película radiográfica por 3 h a -70° . Las cantidades de EF-Tu se determinaron por comparación con una curva estándar de EF-Tu, cuantificando en todos los casos por densitometría de los autorradiogramas.

2.9.- Determinación de la radiactividad

2.9.1.- Determinación de la radiactividad en los geles de poliacrilamida cilíndricos

Los geles de poliacrilamida cilíndricos se cortaron en secciones de aproximadamente 1 mm, cada tajada se colocó en un frasco de centelleo y se les agregó 0,5 ml de H₂O₂ al 30 %. Se calentaron a 70°, hasta disolución del gel (2 a 3 h) y luego se les agregó a cada frasco 5 ml de solución de centelleo para muestras líquidas que contenía: 5 g de PPO, 0,1 g de POPOP, 667 ml de tolueno y 333 ml de tritón X-100.

2.9.2.- Determinación de la radiactividad en cromatogramas y electroforetogramas

a) **Cromatografía en placa fina:** se rasparon las manchas que contenían el nucleótido de interés, colocando el polvo en un frasco de centelleo. Los compuestos radiactivos se eluyeron con 0,7 ml de trietanolamina al 7 % (v/v) durante 10 h a 37°. Luego se agregó a cada frasco 5 ml de solución de centelleo para muestras líquidas.

b) **Cromatografía en papel y electroforesis de alto voltaje:** los cromatogramas y los electroforetogramas se cortaron en tiras de 0,5 x 2,5 cm, las que se introdujeron en frascos de centelleo y se eluyeron como en el caso anterior. Luego se

agregó a cada frasco 5 ml de solución de centelleo para muestras líquidas.

2.9.3.- Determinación de la radiactividad retenida en filtros

La radiactividad retenida tanto en filtros de fibra de vidrio GF/C como en los filtros de nitrocelulosa se determinó colocándolos en sendos frascos de centelleo a los que se les agregó 5 ml de líquido de centelleo para muestras sólidas que contenía: 5 g de PPO, 0,1 g de POPOP en 1.000 ml de tolueno.

2.9.4.- Determinación de la incorporación total de aminoácidos radiactivos en las proteínas

Para medir la incorporación de metionina-³⁵S, (metil-³H)metionina o de grupos metilo en las proteínas totales y en el EF-Tu sintetizado o metilado in vitro, se emplearon alícuotas de las mezclas de reacción o de los inmunoprecipitados resuspendidos. Las alícuotas se agregaron a 2,5 ml de Cl₃CCOOH al 10 %, frío, que contenía 40 µg de albúmina de suero de bovino. Después de hervirlas por 20 min, las muestras se enfriaron y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/C los cuales se lavaron 3 veces con 2,5 ml de Cl₃CCOOH al 10 %, frío, y se determinó la radiactividad retenida en los filtros.

En todos los casos la radiactividad de las muestras se determinó empleando un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300, con una eficiencia de 30 % para ^3H y 60 % para ^{14}C .

2.10.- Métodos cromatográficos

2.10.1.- Cromatografía descendente en papel

Se realizó en papel Whatman N° 1 de 57 x 23 cm durante 15 h a temperatura ambiente. El solvente utilizado fue piridina-acetona- NH_4OH 3 M (50:30:25 v/v/v). Bajo estas condiciones se pueden separar las tres formas de lisina metilada, Lis(Me), Lis(Me₂) y Lis(Me₃). Como marcador se utilizaron 10 μg de *E*-DNP-lisina y 10 μg de cada uno de los estándares señalados en las figuras, los que se mezclaron con 100 μl de la muestra, aplicándose la mezcla a 9 cm de un extremo del papel. La localización de los aminoácidos se reveló con ninhidrina al 0,4 % en acetona, seguido de calentamiento a 70° por 5 min y se determinó la radiactividad contenida en cada uno de estos.

2.10.2.- Cromatografía en placa fina de poliiminocelulosa

Para la determinación de la actividad GTPasa, las muestras se analizaron mediante cromatografía en placa fina de poliiminocelulosa las que se desarrollaron con HCOOH 1 M y LiCl 1 M por aproximadamente 2,5 h. Las posiciones de migración del GDP y del GTP se identificó agregando a las muestras una mezcla de los nucleótidos no radiactivos, los que se visualizaron claramente con luz U. V. (254 nm).

El GTP hidrolizado se determinó a partir de la radiactividad recuperada en la mancha de GDP (van Noort, J. M. y col., 1986).

2.10.3.- Preparación de GDP-Sepharose

2.10.3.1.- Activación de la sepharose

La sepharose húmeda (50 g) lavada con abundante agua fría, se resuspendió en 48 ml de amortiguador fosfato de potasio 5 M, pH 12 y se le agregó 10 g de bromuro de cianógeno disuelto en 40 ml de dioxano, deshidratado con Na₂SO₄. La suspensión se mantuvo con agitación suave durante la reacción, controlando que la temperatura no excediera de 20°. Para contrarrestar el descenso del pH y mantenerlo en 11 se utilizó NaOH 5 N. La reacción se completó después de 12 a 15 min, lo que se detectaba por

el cese de la liberación de protones. La mezcla de reacción se transfirió rápidamente a un embudo Buchner y se lavó con 1,8 litros de amortiguador β -glicerofosfato de sodio 0,1 M pH 7, frío. Todas estas operaciones se realizaron bajo campana con flujo de aire.

2.10.3.2.- Acoplamiento de diaminoctano a la Sepharose activada

El lavado y la adición del ligando (diaminoctano) debe hacerse rápidamente porque la sepharose activada es inestable. Los 50 g de sepharose activada se resuspendieron en 100 ml de diaminoctano 2 M pH 10, disuelto en agua, y se agitó suavemente a 4° por 16 h. Después, la resina se lavó en un embudo Buchner sucesivamente con 2 litros de agua fría, 2 litros de HCl 0,01 N frío, 2 litros de NaOH 0,01 N frío y 2 litros de agua fría.

2.10.3.3.- Unión del GDP a la aminoctil-sepharose

Se disolvió 0,1 mmol de GDP en 1,5 ml de agua y el pH se ajustó a 8,2. Todos los demás pasos se realizaron a 0°. Se agregó 0,11 mmoles de periodato de sodio y la mezcla se mantuvo por 30 min en la oscuridad. Enseguida, la solución se mezcló con 1,5 ml de amortiguador Tricine 0,2 M pH 8,2, NaCl 1 M, 20 ml de aminoctil-sepharose, lavada abundantemente con amortiguador Tricine 0,1 M pH 8,2, NaCl

0,5 M y se completó a 40 ml con el mismo amortiguador. Se incubó por 2 h a 4° con agitación suave. Al término de este período se le adicionó 1,5 ml de borohidruro de sodio 0,3 M en Tricine 0,2 M pH 8,2 y se continuó la incubación por 1 h más. Posteriormente se repitió el último paso y finalmente la resina modificada se lavó con 1 litro de NaCl 4 M frío (Gilham, P. T., 1971).

2.11.-Ensayos de actividades

2.11.1.-Ensayo de metilación in vitro del EF-Tu

La metilación *in vitro* del EF-Tu se realizó bajo las mismas condiciones descritas por Chang y Chang para la metilación *in vitro* de las proteínas ribosomales de *E. coli* (Chang, C. N. y Chang, F. N., 1974), con algunas modificaciones, que se detallan a continuación.

La mezcla de reacción contenía: cantidades variables de proteína (extractos obtenidos de *E. coli* D-10 crecidas en condiciones limitantes de metionina o en presencia de etionina) como fuente de EF-Tu submetilado, 50 µg de proteínas de los extractos usados como fuente de enzima (S150 de *E. coli* D-10 crecidas hasta la fase logarítmica tardía de crecimiento), 20 µCi de S-Ado(metil-³H)Met en 100 µl que contenían Tris HCl 50 mM pH 7,8, NH₄Cl 50 mM, MgCl₂ 20 mM y 2-mercaptoetanol 5mM. Las mezclas de reacción

se incubaron a 37° por 35 min y las reacciones se detuvieron por enfriamiento a 0°.

El EF-Tu metilado se analizó directamente empleando la mezcla de reacción completa o mediante inmunoprecipitación previa, por electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS (0,1 %) (Laemmli, U. K., 1970), seguido de fluorografía. Los geles obtenidos se expusieron a películas radiográficas por diferentes tiempos.

2.11.2.- Determinación de la disociación de nucleótidos

El intercambio de nucleótidos por EF-Tu se midió empleando EF-Tu·GDP en una concentración de 6,6 μ M en amortiguador A (Tris HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 3,5 mM, KCl 75 mM, PMSF 100 μ M y GDP 10 μ M), el cual se marcó por intercambio de nucleótidos a 37° por 30 min empleando ³HGDP o ³HGTP, agregados en una concentración de 3 μ M o 4 μ M, respectivamente. Cuando se realizó el intercambio con GTP, se suplementó la mezcla de incubación con piruvato kinasa 50 μ g/ml y fosfoenolpiruvato 5 mM. Una vez intercambiado el GDP por nucleótido radiactivo desde el EF-Tu·GDP, se enfrió la mezcla a 0° y se midió la disociación del nucleótido radiactivo mezclando rápidamente 30 μ l del EF-Tu nucleótido radiactivo con 10 μ l de una solución 2 mM

en nucleótido no radiactivo. La solución de GTP no radiactiva se preincubó a 37° por 30 min con piruvato quinasa (50 µg/ml) y fosfoenolpiruvato (5 mM), con el propósito de asegurar la presencia de GTP solamente. A los tiempos indicados, las muestras se diluyeron con 3 ml de amortiguador A frío e inmediatamente se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa. La fracción no disociada de EF-Tu nucleótido se calculó a partir de la radiactividad recuperada en los filtros (van Noort, J. M. y col., 1986).

2.11.3.- Determinación de la actividad GTPasa

El ensayo se realizó en un volumen de 40 µl que contenía 100 pmoles de EF-Tu, 6 nmoles de ³HGTP (10 Ci/mmol), 2 nmoles de Kirromicina y cantidades variables de aa-tRNA en Tris HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 3,5 mM, KCl 75 mM, PMSF 100 µM y etanol 6 % (v/v). Después de 60 min de incubación a 37° la mezcla de reacción se enfrió a 0° y de cada muestra se aplicó 2 µl a una placa fina de cromatografía de polietileniminocelulosa para separar los nucleótidos y determinar posteriormente la radiactividad en el GDP formado (van Noort, J. M. y col., 1986a).

2.11.4.- Síntesis y metilación de proteínas in vitro en un sistema dependiente de DNA

La síntesis y metilación del factor de elongación EF-Tu se realizó en un medio de ensayo cuyo volumen final era de 70 μ l y que contenía Tris acetato 15 mM pH 8, dimetilglutarato de sodio 10 mM pH 6, acetato de amonio 35 mM, acetato de potasio 65 mM, acetato de magnesio 13 mM, DTT 2 mM, UTP, CTP y GTP 0,7 mM cada uno, ATP 2,7 mM, fosfoenolpiruvato 30 mM, piruvato Kinasa 0,8 μ g, 2,5 mg de polietilenglicol 6.000, espermidina 0,8 mM, cada uno de los aminoácidos 0,125 mM (excepto la metionina), ^{35}S -metionina (40 pmoles más 2 nmoles de metionina fría), 1,5 nmoles de $\text{N}^{5,10}$ -metenil-tetrahidrofolato, 50 μ g de tRNA de E. coli, 1,5 a 3,0 unidades de A_{260} de lavado ribosomal con NH_4Cl y cantidades saturantes de DNA del fago λ rif^d18 como molde (entre 2 y 5 μ g). El sistema contenía además los siguientes componentes proteicos: 240 μ g de un eluido de DEAE-celulosa con NH_4Cl 0,25 M, 16 μ g de un eluido de DEAE-celulosa con NH_4Cl 1 M y 100 μ g de un lavado ribosomal con NH_4Cl 1 M. Para medir la incorporación de grupos metilo al EF-Tu sintetizado a partir del DNA, se utilizó el mismo medio de incubación ya descrito, excepto que la ^{35}S -metionina se reemplazó por S-Ado(metil- ^3H)Met 136 μM . La mezcla de reacción se incubó a 37° por 60 min. Al cabo

de este período se le agregó 1 μg de DNAasa I y se continuó la incubación a 37° por 10 min. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente y se centrifugó a 12.000 g para eliminar el material insoluble (Zarucki-Schulz, T. y col., 1979; Jerez, C. y Weissbach, H., 1980).

Se emplearon alícuotas de entre 2 y 5 μl del sobrenadante para medir la incorporación total de ^{35}S -metionina en las proteínas totales o de grupos metilo en el EF-Tu sintetizado in vitro, después de hervir las muestras en TCA y determinando la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

2.12.- Purificación de los factores de elongación EF-Tu y EF-Ts de E. coli

2.12.1.- Purificación preparativa del factor EF-Tu metilado y submetilado de E. coli

Como han demostrado van Noort y col. (van Noort, J. M. y col., 1986) y como se verá en la sección Resultados, el EF-Tu se encuentra submetilado en la fase temprana del crecimiento de *E. coli* mientras que en la fase tardía se encuentra totalmente metilado en la Lis-56. Por lo tanto, para establecer si el grado de metilación del factor EF-Tu afecta sus propiedades, se desarrollaron dos procedimientos de purificación preparativos del EF-Tu de *E. coli*,

proveniente de ambos tipos de células. Por otro lado, se procedió también a purificar el EF-Tu a partir de células crecidas en las condiciones ya definidas en Materiales y Métodos, para obtener el factor EF-Tu submetilado artificialmente en presencia de etionina.

2.12.2.- Purificación preparativa del factor EF-Tu de E. coli mediante cromatografía de afinidad

El factor EF-Tu une GDP, formándose un complejo binario EF-Tu·GDP. Por esta propiedad es posible separar fácilmente al EF-Tu del resto de las proteínas presentes en un extracto de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de GDP-sepharose, la que se preparó de acuerdo al procedimiento de Jacobson y Rosenbusch (Jacobson G. R. y Rosenbusch J. P., 1977), (ver sección correspondiente).

Todas las etapas de la purificación se realizaron a 4°, excepto los pasos relacionados con la columna de afinidad los que se desarrollaron a temperatura ambiente.

Se lisaron seis gramos de células mediante maceración con 15 g de alúmina y la pasta resultante se resuspendió en 2 volúmenes de una solución que contenía: $Mg(CH_3COO)_2$ 10 mM, NH_4Cl 60 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM y Tris HCl 10 mM pH 7,4. A esta suspensión se le agregó ribonucleasa y desoxirribonucleasa de modo que la concentración final para

cada enzima fue de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y la suspensión se centrifugó a 16.000 rpm por 30 min en un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante (S30) se centrifugó por 4 h a 45.000 rpm en un rotor Beckman tipo 65. Los dos tercios superiores del sobrenadante resultante (S150) se concentraron mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, colectándose el precipitado obtenido a una saturación de 35-65 %. Este precipitado se resuspendió en 12 ml de amortiguador de columna que contenía: MgCl_2 10 mM, NaCl 0,35 M, 2-mercaptoetanol 5 mM y Tris HCl 50 mM pH 7.8 (Jacobson, G. R. y Rosenbusch, J. P., 1977)

Los siguientes pasos se realizaron a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se mezcló con un volumen igual de GDP-sepharose preparada como ya se describió en 2.10.3. Esta suspensión se introdujo en un tubo de diálisis y se dializó contra 1 litro del amortiguador de columna, durante toda la noche con agitación suave para asegurar una mezcla completa. Luego esta suspensión se empleó para formar una columna (2 por 5 cm) y se colectó toda la solución que pasó a través de ella. Posteriormente esta se lavó con el amortiguador de columna hasta que la absorbancia medida a 280 nm fue mínima y se mantuvo constante. A continuación se eluyó la columna con 1 volumen de columna del mismo amortiguador pero que contenía GDP 100 μM . En seguida se

cerró la llave de paso de la columna y se incubó ésta por 1 h. Después de este período, para promover el intercambio de GDP, se eluyó el EF-Tu de la columna con 5 volúmenes de amortiguador de columna que contenía GDP 100 μ M, colectándose fracciones de 0,5 ml cada una.

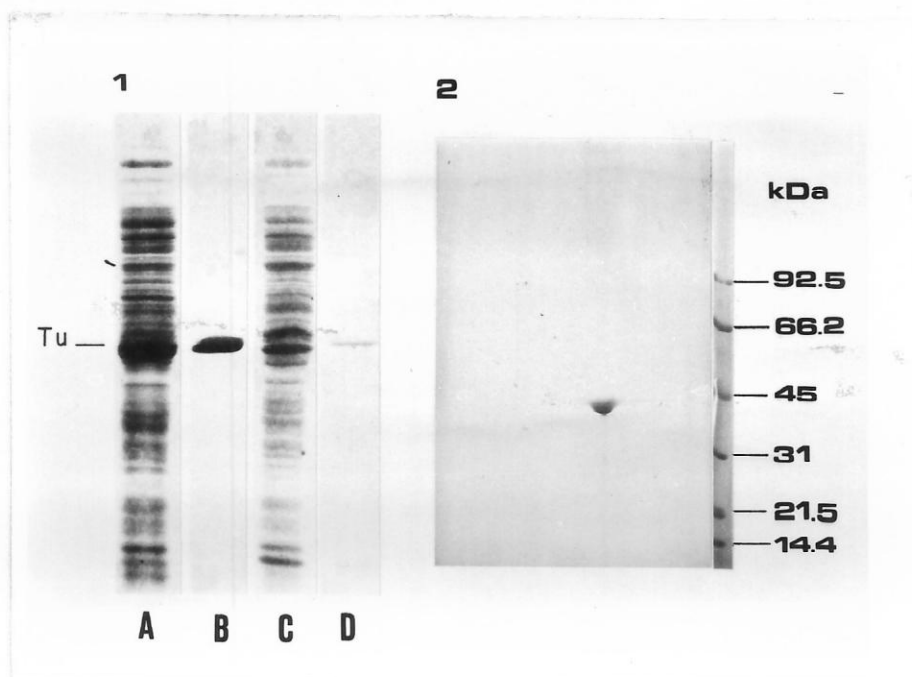
Las fracciones que contenían el EF-Tu, medido por absorbancia a 280 nm o mediante inmunodifusión de Ouchterlony, se juntaron y se precipitaron agregando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una saturación de 65 %. El precipitado obtenido se resuspendió en un amortiguador que contenía: $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM, sacarosa 0,25 M, 2-mercaptoetanol 5 mM y Tris HCl 20 mM pH 7,5 y se guardó a -70° (Smith, I. y Paress, P., 1978).

La figura 4 muestra que este procedimiento permitió obtener el EF-Tu esencialmente puro, a juzgar por la ausencia de otras bandas de proteína cuando se analizó la preparación mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS o cuando se analizó mediante la técnica de electroforesis de O'Farrell. En ambos casos las proteínas se tñeron con azul de coomassie

Sin embargo, la cantidad de EF-Tu obtenida por este procedimiento fue bastante baja y la actividad del factor medida como intercambio de GDP no era mayor al 10 % del teórico. De modo que para los fines de estudiar si la

Figura 4.- Purificación del EF-Tu por cromatografía de afinidad.

Extractos (S150) provenientes de *E. coli* D-10 crecidas en metionina o en etionina se equilibraron con GDP-Sepharose durante 12 h a temperatura ambiente. Enseguida se montaron sendas columnas con el material adsorbido a la GDP-Sepharose y se eluyeron hasta que toda la proteína no unida emergió de las mismas. Posteriormente se eluyeron las columnas con 100 μ M GDP. Se colectaron fracciones y se determinó en ellas la presencia de EF-Tu mediante inmunodifusión de Ouchterlony. Las fracciones que contenían el EF-Tu se concentraron y se sometieron a electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS (0,1 %) o a electroforesis bidimensional de O'Farrell. (1) Proteínas presentes en el S150 de las células crecidas en metionina (A); EF-Tu purificado del S150 anterior (B); proteínas del S150 de las células crecidas en etionina (C) y EF-Tu purificado a partir del S150 anterior (D). (2) Análisis del EF-Tu purificado en 1 A por electroforesis bidimensional de O'Farrell. Se indica la posición del factor EF-Tu purificado estándar. Los números a la derecha representan marcadores de peso molecular, para el gel de segunda dimensión de O'Farrell. El isoelectroenfoco de la primera dimensión se hizo entre pH 5 (a la izquierda) y pH 7 (a la derecha).



actividad del factor EF-Tu era afectada por la metilación de la lisina-56, no resultó ser un método de purificación muy adecuado. Por este motivo se optó por montar un segundo procedimiento de purificación.

Debido al alto grado de pureza del EF-Tu obtenido por esta técnica, este se utilizó para preparar anticuerpos contra el factor en conejos.

2.12.3.- Purificación preparativa del factor EF-Tu de E. coli por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico

Tanto el factor de elongación EF-Tu como el EF-G poseen la capacidad de hidrolizar GTP en presencia de ribosomas. Por lo tanto, para poder estudiar esta actividad del EF-Tu, es necesario no sólo obtener una preparación activa de EF-Tu sino que esta debe estar libre del factor EF-G. La filtración a través de columnas de Sephadex G-100 permite separar ambos factores en presencia de GDP (Wurmbach, P. y Nierhaus, K.H., 1979). Así es posible obtener una completa separación de ambos factores mediante dos filtraciones sucesivas en Sephadex G-100. Otras proteínas contaminantes se eliminan mediante cromatografía en DEAE-Sephadex A-50, en ausencia de GDP (P. Wurmbach y K.H. Nierhaus, 1979).

La purificación se realizó entre 0 y 4°. Las células se lisaron mediante maceración con alúmina, en una proporción de 1 de células y 2,5 de alúmina. La pasta se resuspendió en un volumen de una solución igual a la masa celular. Esta solución contenía: fosfato de potasio 10 mM pH 7,5, cloruro de magnesio 1 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM y DNAasa 1 µg/ml. La alúmina y los restos celulares se eliminaron mediante dos centrifugaciones sucesivas de 20 min cada una, a 30.000 g y el sobrenadante obtenido (S30) se centrifugó durante 4,5 h a 150.000 g. Este sobrenadante se dializó durante toda la noche contra 1 litro de un amortiguador que contenía: Tris clorhídrico 10 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM, realizándose dos cambios del amortiguador. El dializado se centrifugó nuevamente por 4,5 h a 150.000 g. Los tres cuartos superiores de este sobrenadante se utilizaron como fuente de EF-Tu (S150). Al S150 obtenido se le agregó Tris HCl 1M pH 7,8 (1 a 2 ml) para aumentar la capacidad amortiguadora. La solución se saturó en seguida con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta 80 % y se mantuvo con agitación suave durante 30 min. Posteriormente se centrifugó por 30 min a 30.000 g. El precipitado se resuspendió en un mínimo volumen (1 a 3 ml) de amortiguador A/GDP, (Tris HCl 10 mM pH 7,8, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM, KCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,58 mM y glicerol 20 %

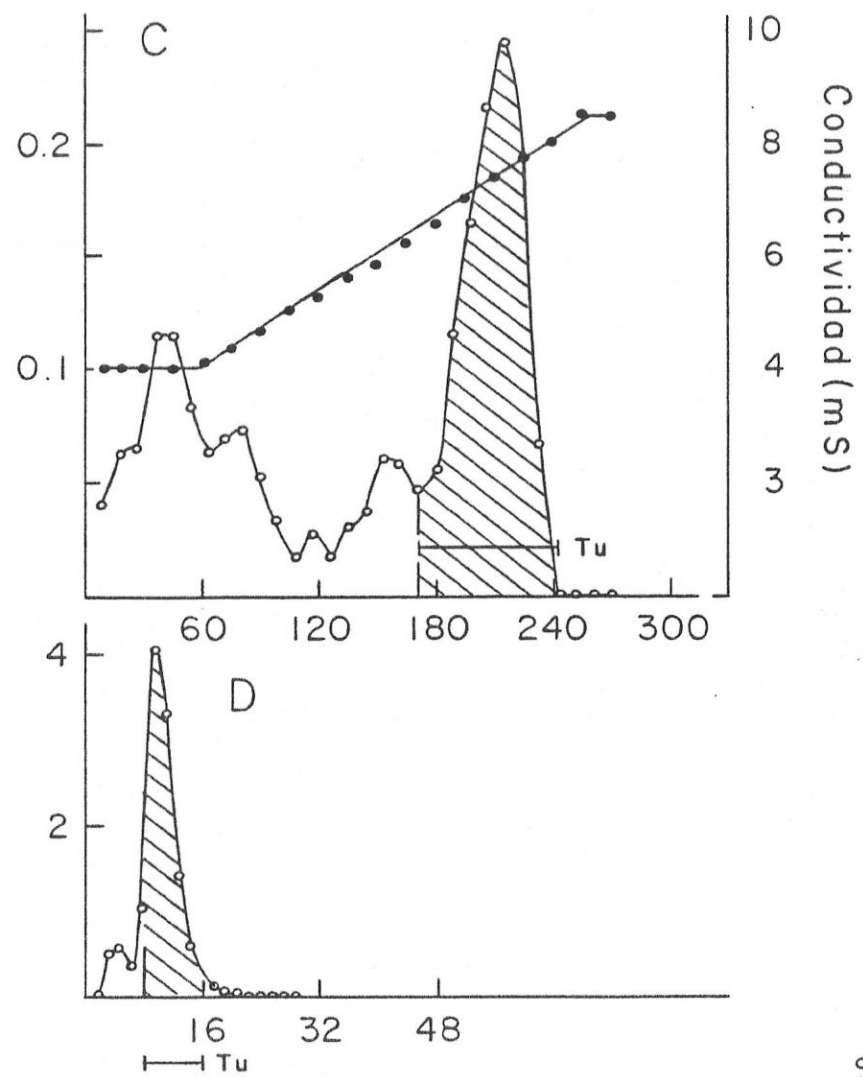
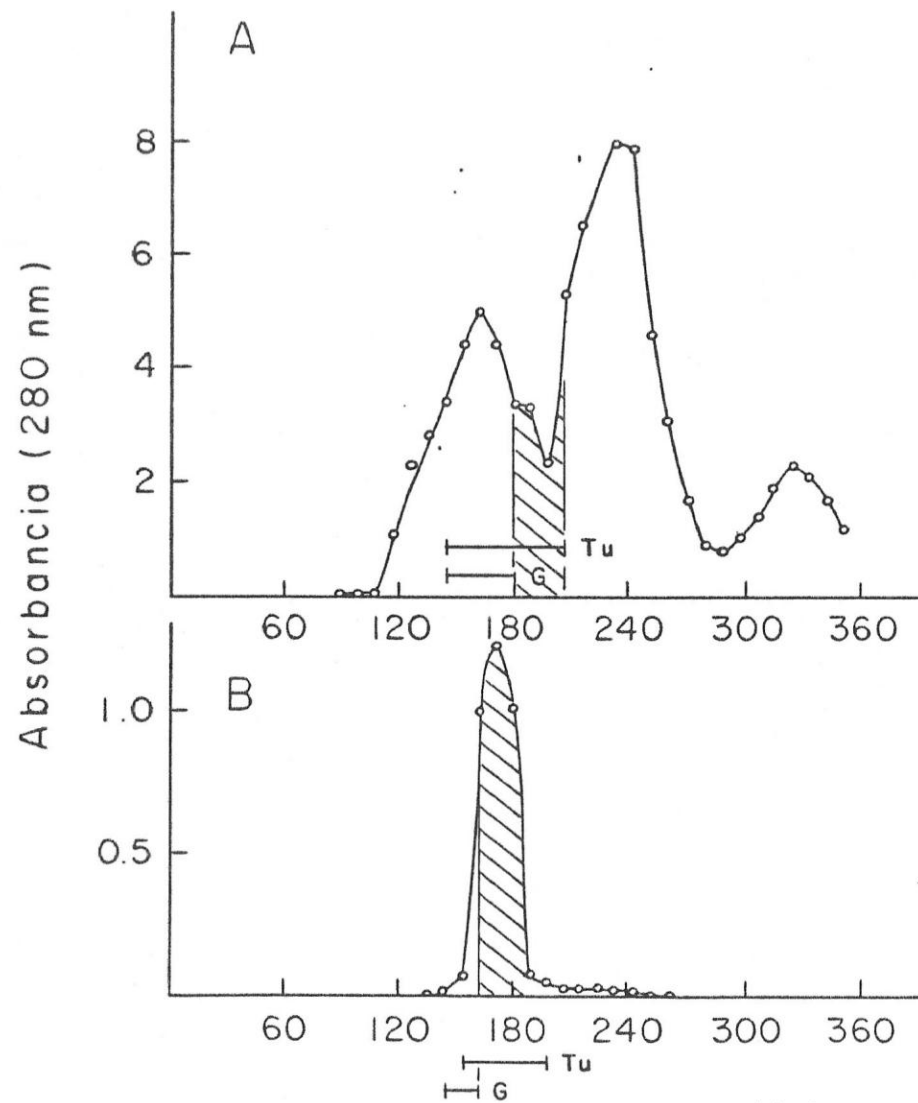
v/v) que contenfa además GDP 20 μ M y se dializó hasta que la solución se aclaró (aproximadamente 2 h), contra dos cambios de 1 litro del mismo amortiguador.

El dializado se aplicó a una columna de Sephadex G-100 (2 x 100 cm) y se colectaron fracciones de aproximadamente 3 ml (100 gotas por fracción; 20 seg por gota). Se leyó la absorbancia a 280 nm y las fracciones que contenfan tanto el EF-Tu como el EF-G se identificaron mediante inmunodifusión de Ouchterlony empleando sueros antiEF-Tu y antiEF-G (cedido gentilmente por H. Weissbach), cada tres fracciones (figura 5 A). Se juntaron las fracciones que contenfan el EF-Tu, evitando al máximo la contaminación con EF-G y se concentraron mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80 % de saturación). El precipitado resultante se resuspendió en 1 a 2 ml del amortiguador A/GDP y se dializó contra el mismo amortiguador. Luego la muestra se sometió a un segundo paso de filtración a través de una columna de Sephadex G-100 (2 x 100 cm) (figura 5 B). Después de la filtración, las fracciones que contenfan el EF-Tu se juntaron, eliminando aquellas que contenfan EF-G.

El conjunto de las fracciones recolectadas se aplicaron directamente, sin ningún paso previo de concentración o diálisis, en una columna de DEAE-Sephadex A-50 (1 x 30 cm) equilibrada con amortiguador A, sin GDP. Las protefnas se eluyeron con un gradiente lineal de 500 ml de KCl entre 0,1

Figura 5.- Diferentes separaciones cromatográficas en la purificación del EF-Tu de E. coli.

Las proteínas se separaron a través de una columna de filtración de Sephadex G-100 (A). Las fracciones que contenía EF-Tu (región achurada) se concentraron y se filtraron nuevamente a través de Sephadex-G100 (B). Las fracciones conteniendo el EF-Tu (región achurada) se juntaron y se sometieron sin concentración previa a cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 (C). Las fracciones que contenían el EF-Tu (región achurada) se concentraron finalmente por una segunda cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 (D). Las barras horizontales indican las fracciones que reaccionaron positivamente con los antisueros que se indican. Las regiones achuradas representan las fracciones que se colectaron en cada separación. Los detalles del procedimiento de purificación del EF-Tu se describen en el texto. (o o) absorbancia a 280 nm; (o o) conductividad.



Volumen eluido (ml)

y 0,4 M en amortiguador A. Se colectaron fracciones de 100 gotas y aquellas que contenían el EF-Tu se identificaron mediante inmunodifusión de Ouchterlony, como en los pasos anteriores (figura 5 C). El EF-Tu eluido de esta cromatografía se encontró libre de EF-G. Con el objeto de concentrar el factor EF-Tu, las fracciones que contenían el factor se juntaron y se dializaron contra 1 litro de amortiguador A por 1 h y luego se aplicaron a una columna de DEAE-Sephadex A-50 (1 x 15 cm), equilibrada con el mismo amortiguador. El factor se eluyó empleando amortiguador A, que contenía KCl 1 M (figura 5 D). Las fracciones que contenían el EF-Tu se juntaron y se dializaron 3 veces durante 1 h cada vez contra 1 litro de amortiguador B (Tris HCl 50 mM pH 7,8, 2-mercaptoetanol 2mM y glicerol 50 % v/v). El factor purificado se guardó a -20°. (Nierhaus, K. H y Dohme, F., 1979; Wurmbach, P. y Nierhaus, K. H., 1979).

El grado de pureza de las preparaciones de EF-Tu obtenidas, se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Primeramente se construyó una curva de calibración empleando EF-Tu 100 % puro (obtenido por cromatografía de afinidad), el que se separó por electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS, y se cuantificó por densitometría de las bandas teñidas. Comparado con estos estándares se pudo

establecer que el grado de pureza fue de al menos un 85 % para las diferentes preparaciones (figura 6), ya que al determinar la pureza en geles sobrecargados (hasta 30 μ g de protefna) se confirmó la presencia de algunos contaminates menores.

2.12.4.- Purificación parcial del factor de elongación EF-Ts de E. coli MRE 600

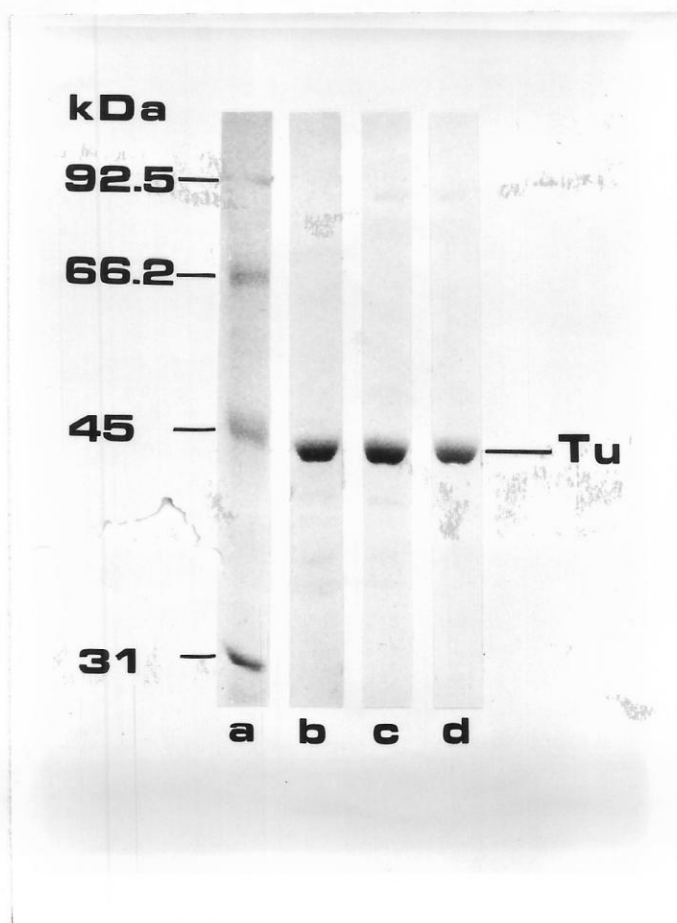
A partir de 63 g de E. coli MRE 600 y mediante el procedimiento de ruptura con alúmina descrito previamente, se obtuvo un extracto que contenfa entre otros, el factor de elongación EF-Ts.

Se obtuvo un S150 el que se saturó con sulfato de amonio sólido hasta un 30 % . El precipitado se eliminó mediante centrifugación. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta 70 % de saturación y el precipitado conteniendo el factor EF-Ts se recuperó por centrifugación. Este se resuspendió en 5 ml de amortiguador I (Tris 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM) y la suspensión se dializó contra el mismo amortiguador. El dializado se centrifugó para retirar el material insoluble.

A continuación se acidificó la solución que contenfa el EF-Ts hasta pH 5 con ácido acético 1 N. La suspensión se mantuvo con agitación suave durante 1 h a

Figura 6.- Determinación de la pureza de los EF-Tu purificados de E. coli mediante electroforesis.

Los EF-TuL (b), EF-TuM (c) y EF-TuE (d) purificados mediante filtración en Sephadex G-100 y cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS (0,1 %). Se aplicó 10 μ g de proteínas de cada muestra al gel, el que se tiñó con azul de coomassie. Los números a la izquierda representan los marcadores de peso molecular en kilodaltons.



0°, se centrifugó y el precipitado se lavó con 5 ml de Tris-acetato 50 mM pH 4,5. El pH del sobrenadante y del lavado, ambos conteniendo el EF-Ts, se ajustó a 7,0 con Tris 1 M y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación.

El sobrenadante de la etapa anterior se calentó por 10 min a 60°, se enfrió, se centrifugó y el sedimento se lavó con 1 ml del amortiguador I. El lavado y el sobrenadante, conteniendo el EF-Ts estable al calentamiento, se juntaron y se saturó la solución con sulfato de amonio sólido hasta un 50 %. El sedimento se descartó y la solución sobrenadante se concentró agregando sulfato de amonio hasta 70 % de saturación. El precipitado se disolvió con 4 ml de amortiguador I que contenía 50 mM KCl y luego se dializó contra la misma solución. El dializado (25,9 mg de proteína/ml) contenía el factor EF-Ts semipurificado libre de contaminación de EF-Tu según se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

2.13.- Otros procedimientos

2.13.1.- Análisis de los aminoácidos metilados

Para analizar la naturaleza de los aminoácidos metilados en el EF-Tu, tanto la proteína sintetizada y metilada *in vitro* como la metilada *in vivo* se inmunoprecipitó y se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS (0,1 %). La banda de EF-Tu se ubicó con las autorradiografías y mediante tinción de los geles con azul de coomassie que contenían EF-Tu estándar, cortándose del gel la región donde migra el EF-Tu. La proteína se extrajo con 6 ml de amortiguador fosfato de sodio 0,01 M pH 6,8 y SDS 0,1 %, mediante agitación, durante toda la noche a 30°. Luego se dializó la proteína extraída y el gel contra 2 litros de agua (3 cambios) para remover el exceso de colorante y de SDS. El dializado se filtró para retirar el gel y luego se liofilizó a sequedad. La proteína se hidrolizó con 2 ml de HCl 6 N en tubos sellados al vacío por 24 a 48 h a 110°. El solvente se eliminó en un evaporador rotatorio BUCHI a 40°. El hidrolizado final se disolvió en un pequeño volumen de etanol al 50 %. Los aminoácidos metilados se analizaron mediante electroforesis de alto voltaje o cromatografía descendente en papel (Chang, C. N. y Chang, F. N., 1975).

2.13.2.- Cuantificación del EF-Tu sintetizado in vitro a partir de DNA

Alicuotas de las mezclas de reacción (20 μ l de las proteínas marcadas con ^{35}S -metionina y 50 μ l de las proteínas ^3H -metiladas), en que se sintetizó *in vitro* el EF-Tu, se trataron con DNAasa, se mezclaron con 5 μ g de EF-Tu y se sometieron a inmunoprecipitación en solución.

Los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS (0,1 %) (Laemmli, U. K., 1970). Los geles se cortaron en secciones de aproximadamente 1 mm y a cada sección se le determinó la radiactividad.

La recuperación del producto sintetizado en este procedimiento se determinó agregando $^3\text{HEF-Tu}$ (gentilmente cedido por H. Weissbach) a través de todo el procedimiento como estándar interno (Zarucki-Schulz, T. y col., 1979). La cantidad de producto sintetizado *in vitro* se calculó de la actividad específica de la metionina usada, del número de metioninas que tiene la proteína (Arai, K. y col., 1980; Laursen, R. A. y col., 1981) y del porcentaje de recuperación del producto (Jeréz, C. y Weissbach, H., 1980).

2.13.3.- Digestión triptica del EF-Tu

Se digirió el EF-Tu (250 $\mu\text{g/ml}$) con tripsina (razón enzima/sustrato, 1/50 p/p) a 0° en un amortiguador que contenía Tris HCl 50 mM pH 7,4, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM, CaCl_2 1 mM y GDP 10 μM . A los tiempos especificados se tomaron alícuotas de 12 μl que se mezclaron con igual volumen de solución de muestra de Laemmli (Laemmli, U. K., 1970) y se calentaron inmediatamente por 5 min en un baño de agua hirviente, para detener la acción de la enzima. Los productos se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 7,5 %, en presencia de SDS (0,1 %) (Nakamura, S. y col., 1977; van Noort, J. M. y col., 1986).

2.13.4.- Aminoacilación del tRNA total de E. coli

Para conseguir el máximo de aminoacilación del tRNA total de E. coli, éste se desaciló previamente por incubación durante 2 h a 37° en Tris HCl 0,1 M pH 8,8, y luego se dializó contra 2 litros de la misma solución por 2 h a 4° (Williams, L. y Freundlich, M., 1969.). La aminoacilación se realizó en un volumen final de 5 ml que contenía 250 μl de Tris HCl 1 M pH 7,5, 25 μl de MgCl_2 1 M, 35 μl de 2-mercaptoetanol 1:10, 125 μl de ATP 0,1 M pH 7, además de 300 μl de una solución 1 mM de cada uno de los

20 aminoácidos, 12,5 mg de tRNA y un volumen óptimo de S150, previamente determinado midiendo la incorporación de (U-¹⁴C)-fenilalanina (513 Ci/mmol) al tRNA total de E. coli

Después de incubar a 37° por 20 min, la reacción se detuvo con 0,5 ml de acetato de potasio al 20 %, pH 6 y 5,5 ml de fenol saturado en agua. Se agitó y la emulsión se separó centrifugándola a 11.000 rpm por 25 min, en un rotor Beckman JA-20. Se tomó la fase acuosa y a la fase fenólica se reextrajo con 2 ml de agua. Ambas fases acuosas se juntaron y se le agregó 1/10 volumen de acetato de potasio al 20 % pH 6 y 3 volúmenes de etanol frío (a -20°) y se dejó precipitar durante 12 h a -20°.

El precipitado se separó mediante centrifugación a 11.000 rpm por 20 min en el rotor Beckman JA-20. El material sedimentado se resuspendió en 3 ml de H₂O más 0,3 ml de acetato de potasio al 20 % pH 6 y 10 ml de etanol frío. Se incubó por 2 h a -20°. El aa-tRNA total se recuperó mediante centrifugación y se lavó con 10 ml de etanol frío. Luego se resuspendió en 0,5 ml de H₂O y se dializó contra 2 litros de H₂O a 5°, durante toda la noche. Se estimó que este RNA total estaba aminoacilado ya que en un ensayo de actividad GTPásica, en presencia de kirromicina, se hidrolizaron cantidades de GTP equivalentes a las reportadas en la literatura (van Noort, J. M. y col., 1986).

En cambio, en presencia del tRNA desacilado no se obtuvo estímulo de la hidrólisis del GTP por el EF-Tu.

2.13.5.- Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry (Lowry y col., 1951), usando seroalbúmina de bovino como estándar.

3.- RESULTADOS

3.1.- Metilación in vivo del factor de elongación EF-Tu en varios microorganismos

3.1.1.- Metilación in vivo del EF-Tu, en E. coli, B. subtilis y B. stearothermophilus

Para un estudio comparativo de la modificación del factor de elongación EF-Tu se utilizaron microorganismos incapaces de sintetizar metionina, los que se emplearon previamente en nuestro laboratorio para el estudio de la metilación de las proteínas ribosomales (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984; Amaro, A.M., 1987; Sanhueza, S., 1987). Como bacteria gram negativa se utilizó *Escherichia coli* D-10 y como bacterias gram positivas se emplearon el *Bacillus subtilis* (cepa BR151) y el *Bacillus stearothermophilus* (cepa 1063 str^r). Además se empleó *Euglena gracilis* variedad bacillaris y la cepa W₁₀ BS mL, con el propósito de extender el estudio al factor EF-Tu de cloroplasto, ya que este organelo ha sido considerado como de un posible origen bacteriano (Gray, M. W. y Doolittle, W. F., 1982).

Todos los microorganismos se crecieron en sus respectivos medios mínimos, descritos en Materiales y Métodos, hasta la mitad de la fase exponencial de

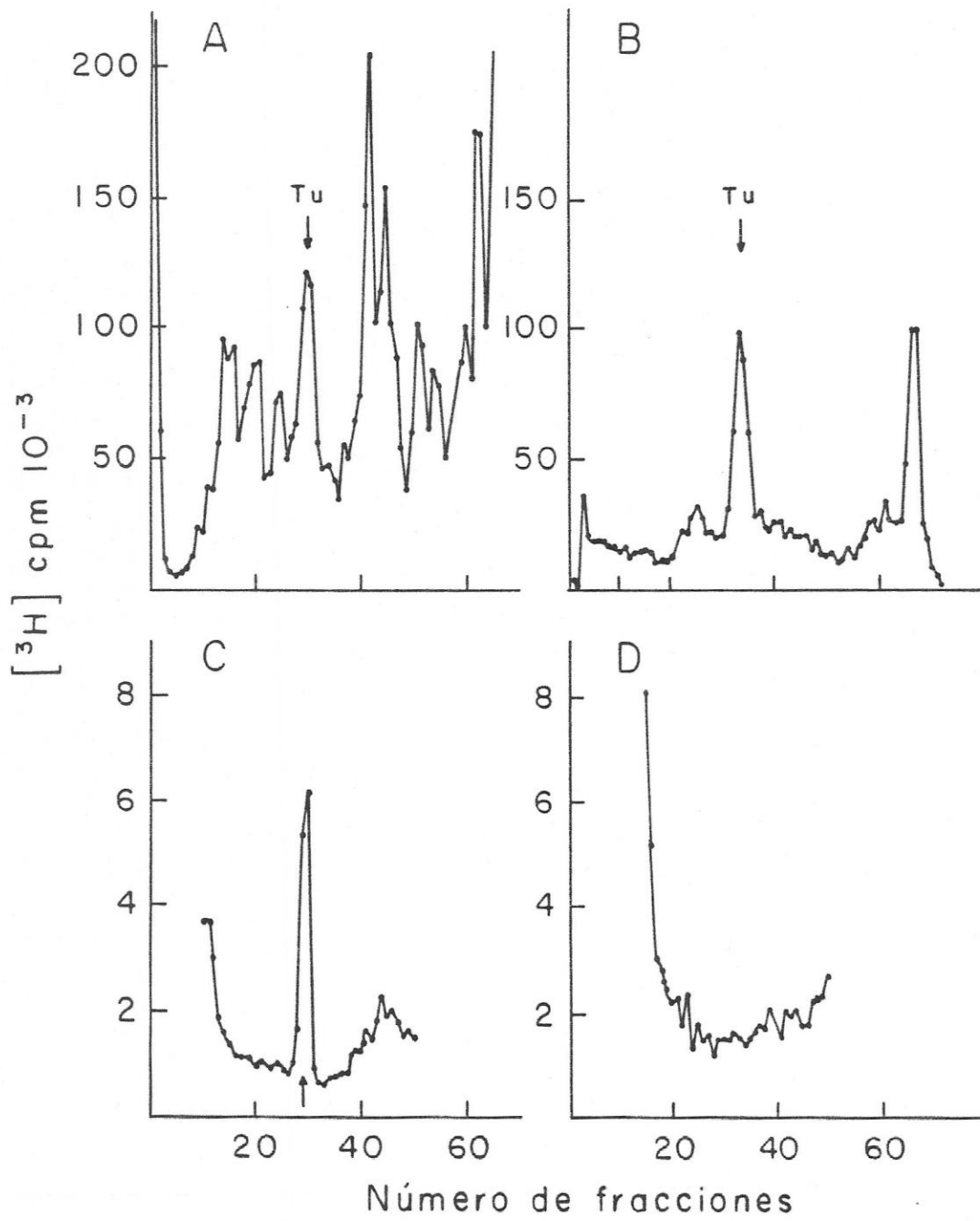
crecimiento, de modo de evitar la esporulación del *B. subtilis* y del *B. stearothermophilus*. Luego las células de cada microorganismo se lavaron y resuspendieron en igual volumen de sus respectivos medios de cultivo pero en ausencia de metionina.

Las células se incubaron en presencia de (metil-³H) metionina y en ausencia o en presencia de cloramfenicol para detectar la incorporación total del aminoácido en las proteínas o la incorporación de grupos metilo respectivamente.

La figura 7 muestra los perfiles de incorporación del aminoácido radiactivo a las proteínas totales de *E. coli* (A) y de *B. subtilis* (B). Cuando las células se trataron previamente con cloramfenicol (C y D), se observó el efecto inhibitorio del antibiótico en la síntesis total de las proteínas. En esta condición se pudo apreciar además la presencia de un pico de radiactividad que comigró con un estándar de EF-Tu en el caso de *E. coli* (C), de acuerdo a la metilación del factor de elongación EF-Tu descrita previamente en esta bacteria (Ohba, M. y col., 1979; Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K, 1979). Sin embargo, en el caso del *B. subtilis* (D), después del tratamiento con cloramfenicol no se observa ningún pico de radiactividad en la región donde migra el factor de elongación EF-Tu. Para comprobar que en las condiciones empleadas el *B.*

Figura 7.- Metilación in vivo de proteínas en E. coli y B. subtilis.

Se creció *E. coli* y *B. subtilis* hasta la mitad de la fase logarítmica de crecimiento en sus respectivos medios mínimos, a 37° y con agitación. Se cosecharon las células y se lavaron 2 veces con el mismo medio sin metionina y se resuspendieron en el medio sin el aminoácido. Se incubaron dos alícuotas de 5 ml de cada tipo de células, una en presencia de 1 mg de cloramfenicol (C y D) y la otra sin el antibiótico (A y B) por 8 min a 30°. Terminada esta incubación se tomó 1 ml de cada alícuota y se les agregó (metil-³H)metionina (concentración final 2,2 μ M) continuándose la incubación por 30 min, a 30° con agitación. Finalmente, las células se disolvieron mediante ebullición en 30 μ l de solución de Laemmli. La incorporación total del aminoácido a las distintas proteínas de *E. coli* (A) y de *B. subtilis* (B), como la incorporación de grupos metil-³H a las proteínas de *E. coli* (C) y *B. subtilis* (D) se analizó mediante electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, con 0,1 % de SDS. La radiactividad de cada trozo de gel se determinó como se describe en Materiales y Métodos.



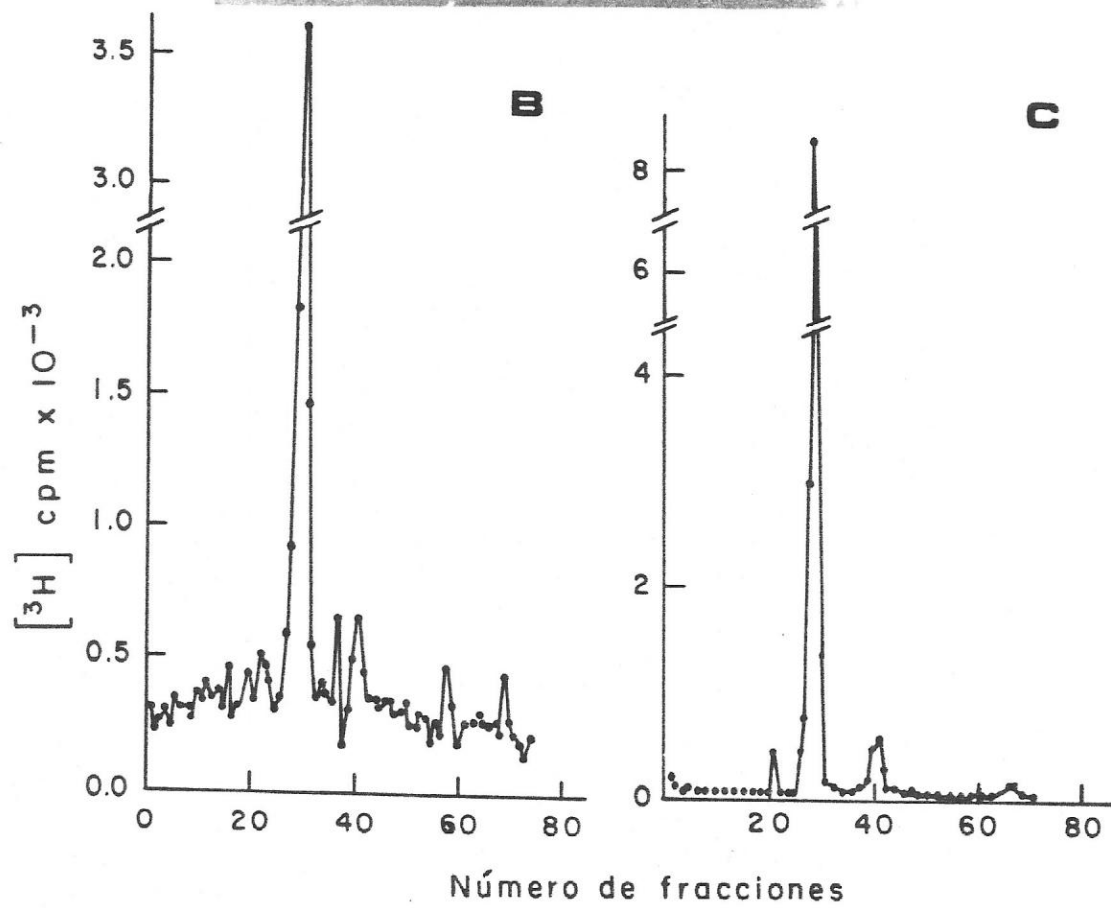
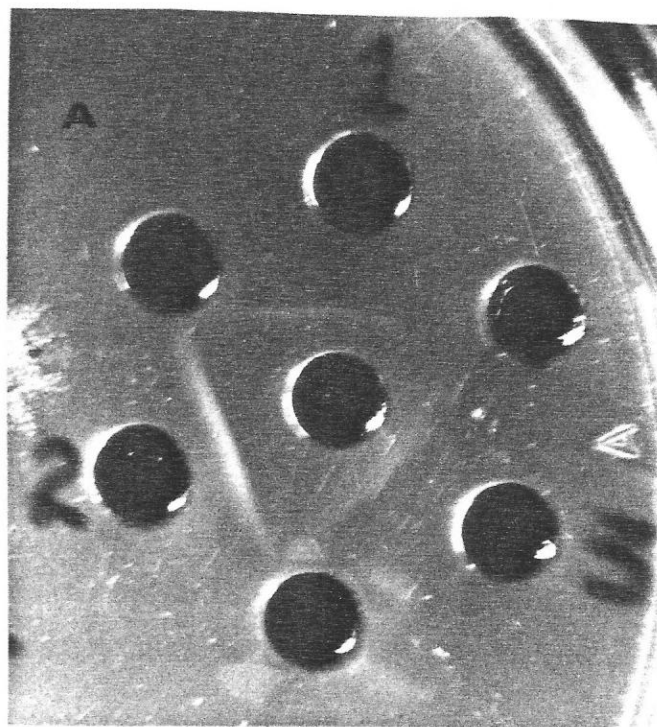
subtilis sintetiza una proteína equivalente al EF-Tu empleamos un anticuerpo polivalente antiEF-Tu, obtenido contra el factor puro de *E. coli*. La figura 8 A muestra mediante un ensayo de inmunodifusión de Ouchterlony, que los extractos subcelulares de *B. subtilis* dan una banda de inmunoprecipitación en presencia del antisuero contra EF-Tu de *E. coli*. Estos resultados confirman la inmunoreacción cruzada que ha sido descrita para ambas moléculas. Teniendo en cuenta estos antecedentes experimentales se efectuó una inmunoprecipitación líquida de los extractos radiactivos tanto de *E. coli* como de *B. subtilis*, en presencia del suero contra el EF-Tu de *E. coli*. Los inmunoprecipitados obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Se observa que en los extractos de *B. subtilis* (figura 8 B) hay una proteína que es inmunoprecipitada por el suero empleado. El peso molecular de esta proteína de *B. subtilis* estaría de acuerdo con el descrito para el EF-Tu de este microorganismo, el que corresponde a 47.000 daltons según electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Smith, I. y Paress, P., 1978). Este valor es un poco mayor que el descrito para el factor EF-Tu de *E. coli*, que corresponde a 43.225 daltons, determinado a partir de su secuencia de aminoácidos (Jones, M. D. y col., 1980).

Figura 8.- Presencia en B. subtilis de una proteína immunoprecipitable con suero antiEF-Tu de E. coli.

(A) inmunodifusión de Ouchterlony en placas de agar al 1 %. Pocillo 1, 10 μ g de EF-Tu purificado de E. coli; pocillo 2, 100 μ g de proteínas de un S150 obtenido de E. coli; pocillo 3, 100 μ g de proteínas de un S150 obtenido de B. subtilis; pocillo central, 10 μ l de suero antiEF-Tu de E. coli.

(B) Un S150 obtenido de B. subtilis crecido en presencia de (metil-³H) metionina se immunoprecipitó con suero antiEF-Tu de E. coli. Después de disolver el immunoprecipitado en 2-mercaptoetanol 0,1 M, SDS 2 % se separaron las proteínas por electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS 0,1 %, y la radiactividad se determinó en cada fracción como se describe en Materiales y Métodos.

(C) ³HEF-Tu de E. coli marcado químicamente e immunoprecipitado.

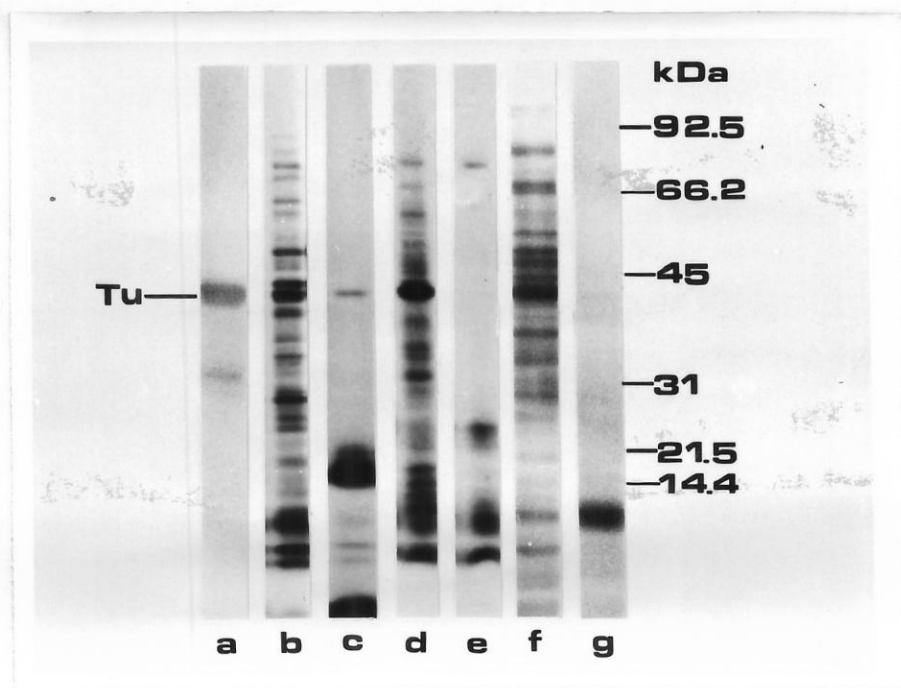


Estos resultados obtenidos con el *B. subtilis* sugieren que el EF-Tu de esta bacteria Gram positiva podría no ser metilado, al menos en las condiciones empleadas en estos ensayos (figura 7).

Los estudios de la metilación *in vivo* se extendieron a la bacteria Gram positiva *Bacillus stearothermophilus*. La figura 9 muestra el análisis de las proteínas metiladas mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS, seguido de autorradiografía. El autorradiograma muestra la incorporación de (metil-³H)metionina a las proteínas totales de *E. coli* (b), de *B. subtilis* (d) y de *B. stearothermophilus* (f). Cuando las células se trataron previo a la incubación con el aminoácido radiactivo en presencia de cloramfenicol, se observó como ya se describió para *E. coli* una banda radiactiva (c) que comigra con el estándar de EF-Tu (a). Igual fenómeno se observa en el caso del *B. stearothermophilus* en el que se observa una banda débilmente metilada con un peso molecular aproximado de 43.000 daltons (g), lo que sugiere que en esta última especie el EF-Tu también podría ser metilado. Sin embargo, como ya vimos, con el *B. subtilis* (e) no se detecta ninguna banda que sugiera la presencia del factor de elongación EF-Tu metilado.

Figura 9.- Metilación del EF-Tu de B. stearothermophilus y otros microorganismos.

Células de *E. coli* (b, c), *B. subtilis* (d, e) y *B. stearothermophilus* (f, g) se crecieron en las mismas condiciones descritas en la figura 7, excepto que en el caso del *B. stearothermophilus* las temperaturas de incubación fueron 60°, para el crecimiento, y 50°, para la marcación de las proteínas. La incorporación de (metil-³H)metionina se realizó durante 30 min en ausencia (b, d, f) o en presencia (c, e, f) de cloramfenicol, como se describió anteriormente. Como estándar se empleó ³HEF-Tu marcado químicamente (a). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente del 7 al 15 %, en presencia de SDS 0,1 % .



Se ha descrito que los EF-Tu de *E. coli* y *S. typhimurium* son metilados *in vivo* en presencia de cloramfenicol y que ambos contienen Lis(Me) y Lis(Me₂) (Ferro-Luzzi, G. F. y Niakido, K., 1979; L'Italien, J. J. y Laursen, R., 1979; J. M. van Noort y col., 1986). La mejor forma de confirmar directamente si una proteína es metilada es determinar el contenido de aminoácidos metilados que posee mediante hidrólisis de la proteína y análisis por cromatografía o electroforesis de alto voltaje o ambos (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984; Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985). El EF-Tu de *B. subtilis*, proveniente de células marcadas con (metil-³H)metionina, se inmunoprecipitó de los extractos de la bacteria con el suero antiEF-Tu de *E. coli*. En el caso del *B. stearothermophilus* no se pudo realizar el mismo análisis ya que el factor de esta especie no presentó reacción cruzada con el suero antiEF-Tu de *E. coli*. La misma falta de reacción inmunológica cruzada con *E. coli* se ha observado para el factor EF-Tu de *Thermus thermophilus* HB8 (Arai, K. y col., 1978), otro microorganismo termofílico.

El inmunoprecipitado de *B. subtilis* se sometió a electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Como se mostró en la figura 8 B, la banda de la proteína inmunoprecipitada se extrajo del gel para ser sometida a hidrólisis y posterior análisis de los

aminoácidos mediante cromatografía en papel. El análisis del cromatograma mostró la ausencia de aminoácidos metilados entre los productos de la hidrólisis, confirmando finalmente que el EF-Tu de esta especie bacteriana no sería metilado. Este resultado es inesperado, especialmente si se considera que previamente se encontró un alto grado de conservación en la metilación de las proteínas ribosomales de *B. subtilis* y de *B. stearothermophilus* cuando se las comparó con *E. coli* (Amaro, A.M. y Jerez, C.A., 1984).

3.1.2.- Metilación del factor de elongación EF-Tu de cloroplasto de E. gracilis

Considerando el posible origen bacteriano para los cloroplastos, nos interesó comparar la metilación del EF-Tu del organelo con la ya observada en las bacterias estudiadas.

La secuencia de aminoácidos del factor de elongación EF-Tu de cloroplasto de *E. gracilis* ha sido determinada a partir de la secuencia del gen que lo codifica (Montandon, P-E. y Stutz, E., 1983), encontrándose un 70 % de similitud con el EF-Tu de *E. coli*. Al analizar la secuencia del factor de cloroplasto se encontró una región de 17 aminoácidos que contiene una lisina que coincide con la lisina-56 metilada de *E. coli*. Esta región del EF-Tu de *E. coli*

presenta un 88 % de aminoácidos idénticos a los de la región equivalente del EF-Tu de cloroplasto (Tabla II). Esto nos sugirió la posibilidad de que el EF-Tu del organelo podría ser metilado, ya que el sitio de modificación estaría altamente conservado. Con el propósito de establecer si el EF-Tu de cloroplasto es metilado se realizaron experimentos de metilación tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se creció *E. gracilis*, en presencia de (metil-³H) metionina y se obtuvo un extracto total libre de células (S100). Este extracto se inmunoprecipitó con suero antiEF-Tu de *E. coli*, y el inmunoprecipitado se analizó mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10 %, SDS 0,1 %, seguido de fluorografía y autorradiografía. La figura 10 I muestra que el inmunoprecipitado contenía, entre otras, dos proteínas mayoritarias, una de las cuales migró con un peso molecular aparente de 46.000 aproximadamente (flecha en B). Este valor de peso molecular está próximo al descrito por Montandon, quien determinó un peso molecular de 45.011 para el EF-Tu de cloroplasto, a partir de la secuencia de nucleótidos del gen (Montandon, P. E. y Stutz, E., 1983). La segunda banda mayoritaria de proteína inmunoprecipitada (asterisco en figura 10 I, B) con un peso molecular aparente de 54.000 podría corresponder al factor

Tabla II

Comparación del sitio de metilación *in vivo* del factor de elongación EF-Tu de *E. coli* con la región del factor de elongación de cloroplasto de *E. gracilis*

<u><i>E. coli</i></u>	48-64	Q I D N A P E E [*] K A R G I T I N T
<u><i>E. gracilis</i></u> cloroplasto	48-64	D I D S A P E E K A R G I T I N T

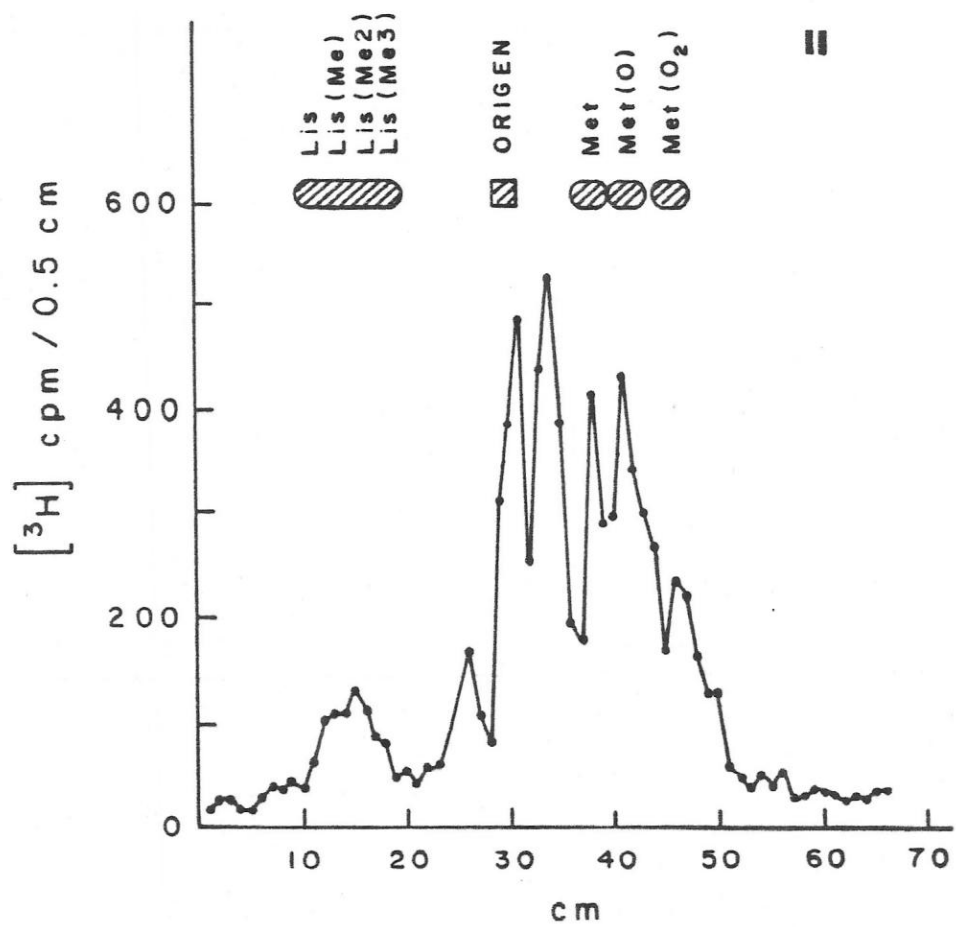
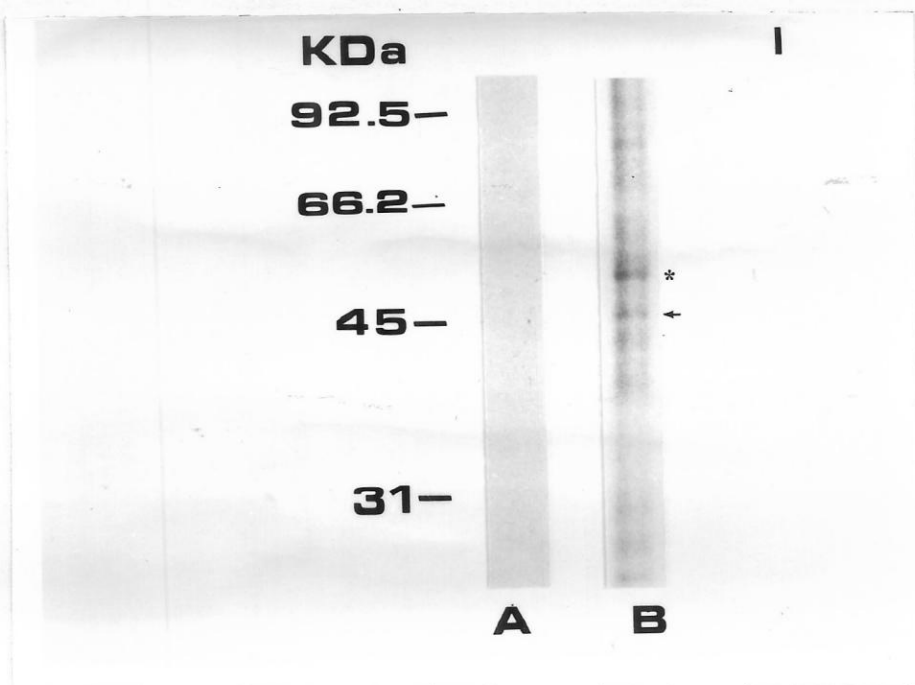
Con asterisco (*) se indica la lisina-56 metilada en *E. coli*

Las secuencias indicadas fueron tomadas de: *E. coli* (Laursen, R. A. y col., 1981), *E. gracilis* cloroplasto (Montandon, P. E. y Stutz, E., 1983).

Figura 10.- Análisis de los aminoácidos metilados presentes en el EF-Tu de cloroplasto de E. gracilis metilado in vivo.

I.- Se creció *E. gracilis* hasta la mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Las células obtenidas se incubaron por 24 h en presencia de 1 mCi de (metil-³H)metionina y después se rompieron mediante sonicación en presencia de amortiguador de inmunoprecipitación. El extracto de células marcadas se trató con suero preinmune (A) o con suero antiEF-Tu de *E. coli* (B).

II.- La banda correspondiente a 46 KDa (flecha en I B), se extrajo de geles en placa de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS y se sometió a hidrólisis, como se describe en Materiales y Métodos. El análisis de los aminoácidos metilados se efectuó mediante electroforesis de alto voltaje aplicando 100 μ l del hidrolizado en un papel Whatmann 3MM junto con 10 μ g de los siguientes aminoácidos estándares: Lis, Lis(Me), Lis(Me₃), Met, Met(O) y Met(O₂). El polo positivo se encuentra a la derecha y el negativo a la izquierda de la figura. Las condiciones para la electroforesis de alto voltaje, la detección de los aminoácidos y la determinación de la radiactividad se describen en Materiales y Métodos.



EF-1 α de la *E. gracilis*, ya que el peso molecular del EF-1 α determinado en distintas especies es de 53.000 daltons (Amons, R. y col., 1983; Coppard, N. J. y col., 1983; Linz, J. E. y col., 1986),. Esta protefna inmunoprecipita en nuestras condiciones ya que existe un cierto grado de similitud entre el EF-Tu bacteriano y su homólogo eucarióntico (Amons, R. y col., 1983; Crechet, J-B. y col., 1986; van Hemert, F. J. col., 1984).

La banda que correspondería al EF-Tu de cloroplasto, es decir, la que migró con un peso molecular aparente de 46.000 daltons, se extrajo del gel y la protefna elufda de este se sometió a hidrólisis para analizar los aminoácidos como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 10 II, en el análisis de los aminoácidos de la banda de 46.000, por electroforesis de alto voltaje se encontró un pico de lisina metilada. Por análisis cromatográfico, que separa las distintas formas de la lisina metilada, encontramos que el aminoácido metilado correspondería a monometillisina (no se muestra el resultado). Estos resultados nos señalan que el EF-Tu de cloroplasto también es metilado in vivo. La banda correspondiente al posible factor EF-1 α (asterisco en figura I, B), también se encontró metilada al analizar sus aminoácidos (no se muestra el resultado). En este sentido, como ya se comentó, el EF-1 α de varias especies también se

ha encontrado metilado (Amons, R. y col., 1983; Coppard, N. J. y col., 1983; Fonzi, W. A. y col., 1985; van Hemert, F. J. y col., 1983; Hiatt, W. R. y col., 1982).

Para confirmar la modificación post-sintética del factor EF-Tu de cloroplasto, se procedió a metilar la proteína *in vitro*. Para ello se obtuvo un sobrenadante S30 a partir de células de *E. gracilis* crecidas hasta la mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Este sobrenadante se sometió a un ensayo de metilación *in vitro* y se analizó la incorporación de grupos metil-³H a las proteínas totales mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10 %, SDS 0,1 % (figura 11).

Se puede apreciar que existe una banda de proteína, que migra en la zona de peso molecular 45.000 aproximadamente (flechas), que se metiló *in vitro* en los extractos (A - D). Esta proteína metilada es inmunoprecipitable con el suero antiEF-Tu de *E. coli* (D). Por lo tanto, estos resultados confirman la metilación del EF-Tu de cloroplasto y muestran además que en los extractos de *E. gracilis* existe una actividad enzimática que metila el EF-Tu. Las otras proteínas metiladas podrían corresponder a proteínas ribosomales que son metiladas en el organelo (Sanhueza, S., 1987) o a otras proteínas del cloroplasto que también se metilan (Black, M. T. y col., 1987). Como se emplearon extractos totales de *E. gracilis*,

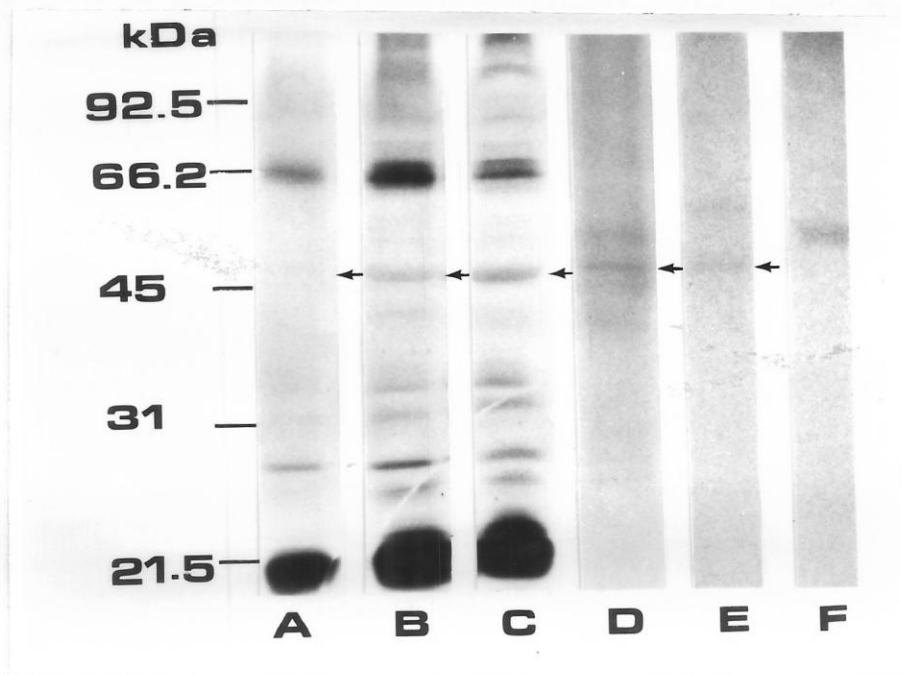
Figura 11.- Metilación in vitro del factor de elongación EF-Tu de cloroplasto de E. gracilis.

Se creció *E. gracilis* hasta la mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Las células se rompieron mediante sonicación para obtener un extracto libre de células (S30) o los cloroplastos purificados (A - H).

Ambas preparaciones se emplearon en un ensayo de metilación *in vitro* que contenía entre 200 y 600 μg de proteína del S30 ó 160 μg de proteínas de un extracto de cloroplastos purificados ó 200 μg de proteínas de un S30 de *E. gracilis* W_{10} BSml y 20 μCi de S-Ado(metil- ^3H)Met (85 Ci/mmol) en un volumen de 100 μl en amortiguador de metilación.

Los productos metilados se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS 0,1 %, posterior fluorografía y autorradiografía a -70° durante 18 días.

A, B, C, 200, 400 y 600 μg de S30 de *E. gracilis* respectivamente. D, productos inmunoprecipitados con suero antiEF-Tu de *E. coli* a partir de un ensayo equivalente al realizado en C. E, extracto de cloroplastos purificados. F, S30 de *E. gracilis* W_{10} BSml.



no podemos descartar la posibilidad que algunas mitocondrias se hubieran lisado y que parte del factor modificado correspondiera a estos organelos. Por lo tanto, para verificar inequívocamente la modificación del EF-Tu de cloroplasto, se obtuvieron cloroplastos purificados a partir de *E. gracilis*, crecidas hasta la mitad de la fase logarítmica de crecimiento.

Los extractos obtenidos a partir de estos cloroplastos se sometieron a metilación en las condiciones ya descritas. Como se puede ver en la figura 11 E, en el extracto de cloroplastos existe una banda que incorpora grupos metil-³H y que comigra con el EF-Tu de cloroplastos metilado, en los extractos totales de *E. gracilis*. Esta banda también fue inmunoprecipitada por el suero antiEF-Tu de *E. coli* (no se muestra).

Cuando en el ensayo de metilación se empleó un extracto de *E. gracilis* W₁₀ BSml, que no posee cloroplastos, se obtuvo una banda de proteína metilada de mayor peso molecular que el EF-Tu de cloroplasto (figura 11 F) y que aparentemente podría corresponder al factor EF-1 α del protozoo, como se discutió en los resultados de la figura 10.

Los resultados de esta sección confirman por lo tanto, nuestros resultados sobre la metilación del factor EF-Tu de cloroplasto de *E. gracilis*.

3.2.- Desarrollo de sistemas para la metilación in vitro del factor de elongación EF-Tu

3.2.1- Sistema dependiente de DNA

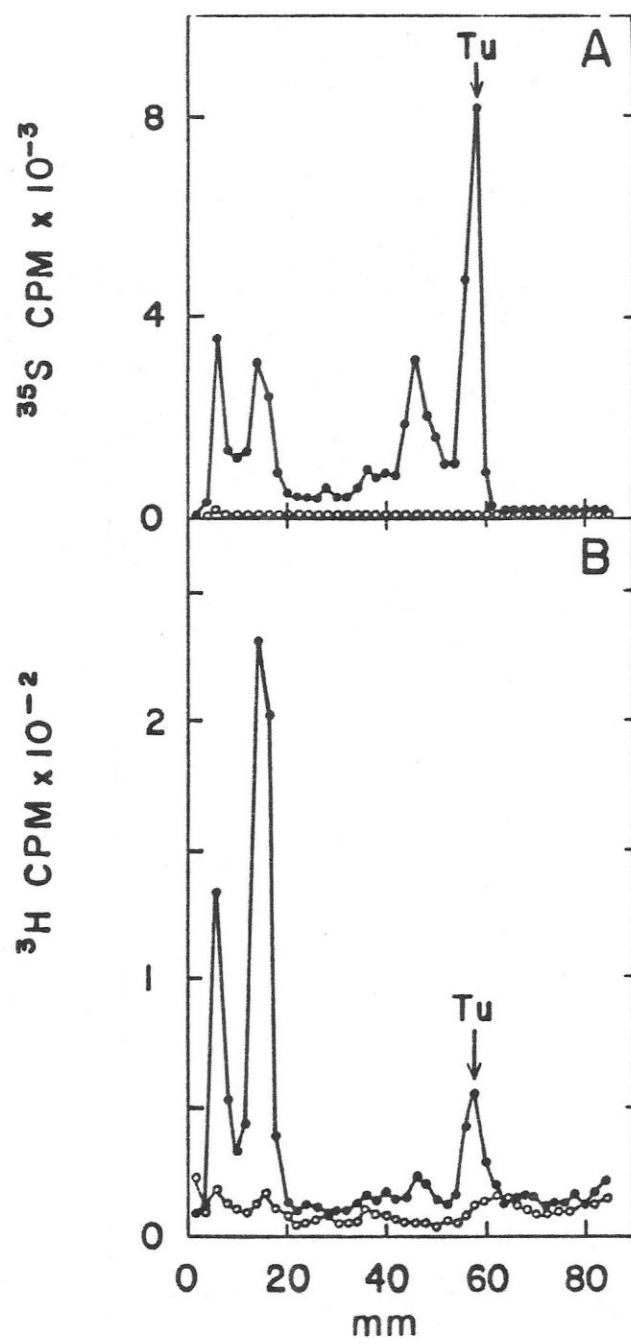
Para estudiar la síntesis del EF-Tu a partir del DNA que lo codifica y la metilación de la proteína, se empleó un sistema dependiente de DNA (Jerez, C. A. y Weissbach, H., 1980). Este ensayo utiliza un extracto de *E. coli* reconstituido, tal como se describe en Materiales y Métodos, y DNA del fago λ rif^d18, que porta el gen *tuf B* que codifica para el factor de elongación EF-Tu y otras proteínas.

La mezcla de reacción contenía DNA del fago λ rif^d18, además de ³⁵S-metionina o metionina no radiactiva y S-Ado(metil-³H)Met. Después de incubar, los productos formados in vitro se analizaron mediante inmunoprecipitación con suero antiEF-Tu.

La figura 12 muestra el patrón electroforético de los productos inmunoprecipitados. Cuando el ensayo se realizó en presencia de metionina-³⁵S (figura 12 A), se encontró una proteína radiactiva mayoritaria, de peso molecular aproximado de 43.000 que fue inmunoprecipitada con el suero antiEF-Tu. Basados en un peso molecular de 43.000 para el EF-Tu y un contenido de 10 residuos de metionina en su

Figura 12.- Síntesis y metilación in vitro del EF-Tu en un sistema dependiente de DNA.

Una mezcla de reacción del sistema dependiente de DNA (ver Materiales y Métodos) se incubó en presencia de metionina-(^{35}S) (A) o metionina fría y S-Ado(metil- ^3H)Met (B). Los productos obtenidos se inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu y el precipitado se lavó y se solubilizó como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas solubilizadas se analizaron mediante electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS (0,1 %). Los geles se cortaron en tajadas de 1 mm, se ensayaron para radiactividad como se describe en Materiales y Métodos. La incubación se hizo en presencia (●—●) o en ausencia (○—○) de DNA del fago λ rif^{d18}. Las flechas indican la posición de migración del EF-Tu. La migración electroforética fue de derecha a izquierda de la figura.



secuencia de aminoácidos (Arais, K. y col., 1980), se calculó que en el sistema dependiente de DNA se sintetizaron 3 pmoles de factor EF-Tu, de acuerdo con Zarucki-Schulz y colaboradores (Zarucki-Schulz y col., 1979). También es posible observar en la figura 12 que la síntesis del factor EF-Tu es completamente dependiente de la presencia del DNA utilizado.

Cuando se incubó el sistema en presencia de metionina fría y S-Ado(metil-³H)Met (figura 12 B) también se obtuvieron productos inmunoprecipitados con el suero antiEF-Tu. Se encontró un pico de radiactividad que comigraba con el EF-Tu, lo que muestra que el factor de elongación EF-Tu no sólo se sintetizó in vitro sino que también se metiló en las condiciones del ensayo.

Como se puede ver en la figura 12, aparecieron como productos inmunoprecipitables y metilados algunos picos de bajo peso molecular. Estos pueden corresponder a productos de degradación obtenidos durante la síntesis in vitro del EF-Tu o a fragmentos resultantes de la traducción incompleta de su mRNA (Chu, F. y col., 1976).

El sistema dependiente de DNA posee entre varios componentes (ver Materiales y Métodos) extractos crudos de *E. coli*, abundante ATP y metionina, por lo que durante la incubación se genera S-AdoMet. Considerando que este disminuye la actividad específica del S-Ado(metil-³H)Met

agregado (Jerez, C. A. y Weissbach, H., 1980), se calculó que se incorporaron alrededor de 3 moles de residuos metilados por cada 10 moles de EF-Tu sintetizado, es decir, se metiló el 33 % del EF-Tu sintetizado. Este valor estuvo en general de acuerdo con los resultados de Ferro-Luzzi y L'Italien para la metilación *in vivo* del EF-Tu en presencia de cloramfenicol (Ferro-Luzzi, G. F. y Niakido, K., 1979; L'Italien, J. J. y Laursen, R., 1979).

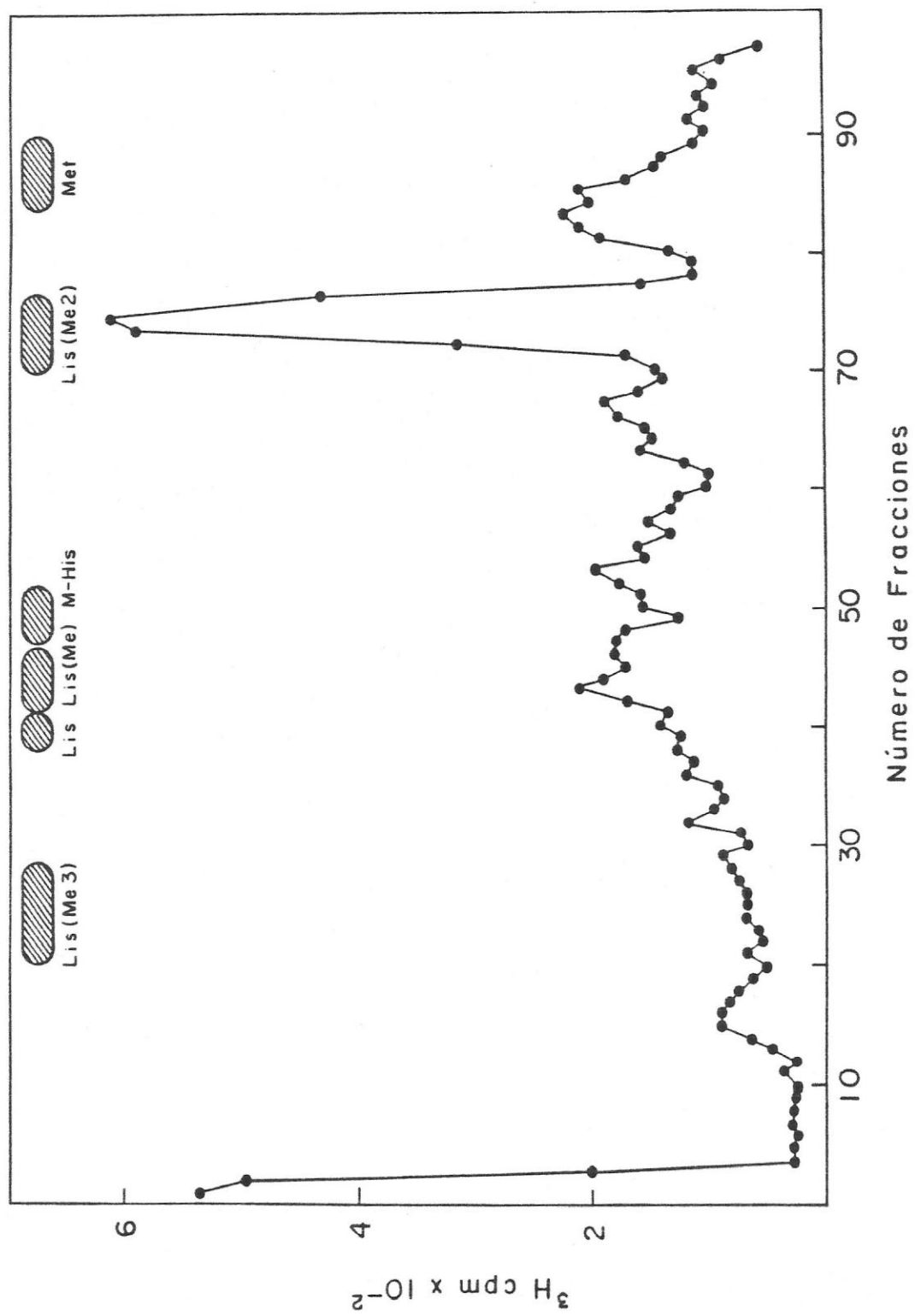
Para identificar los aminoácidos metilados presentes en el EF-Tu sintetizado *in vitro*, la proteína metilada se inmunoprecipitó y se sometió a hidrólisis con HCl, como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 13 muestra que cuando los productos de la hidrólisis se separaron por cromatografía en papel, la mayor parte de los grupos metilo correspondieron a Lis(Me) y Lis(Me₂). Este resultado está completamente de acuerdo con lo informado para la metilación *in vivo* del EF-Tu (Ferro-Luzzi, G. F. y Niakido, K., 1979) y demuestra que el sistema dependiente de DNA utilizado no sólo es altamente eficiente para sintetizar EF-Tu, sino que también posee las enzimas para su procesamiento post-sintético (Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985).

Sin embargo, dado que el sistema dependiente de DNA utiliza un extracto crudo como fuente de las actividades enzimáticas, no es posible separar la metilación del EF-Tu

Figura 13.- Análisis de los aminoácidos metilados presentes en el EF-Tu sintetizado in vitro.

Muestras de EF-Tu sintetizado y metilado *in vitro* e inmunoprecipitado con suero antiEF-Tu, se extrajeron de geles como los de la figura 8 y se sometieron a hidrólisis, como se describe en Materiales y Métodos. El análisis de los aminoácidos metilados se efectuó mediante cromatografía en papel aplicando 50 μ l del hidrolizado a un papel Whatman N° 1 junto con 10 μ g de los siguientes aminoácidos estándar: Lis, Met, M-His, Lis(Me), Lis(Me₂) y Lis(Me₃). El solvente utilizado fue piridina/acetona/NH₄OH 3 M (50:30:25, v/v). Las condiciones para la cromatografía, la detección de las manchas y la determinación de la radiactividad se describen en Materiales y Métodos.



de su síntesis. Por lo tanto, para poder estudiar la metilación del factor EF-Tu en más detalle, se intentó desarrollar sistemas *in vitro* para la metilación del EF-Tu empleando la submetilación artificial del factor de elongación.

3.2.2.- Desarrollo de sistemas que emplean EF-Tu submetilado artificialmente como sustrato para la metilación

Para contar con EF-Tu submetilado escogimos dos sistemas en los cuales las células se crecieron en condiciones limitantes para la metilación, lo que debería proporcionar el factor EF-Tu artificialmente submetilado.

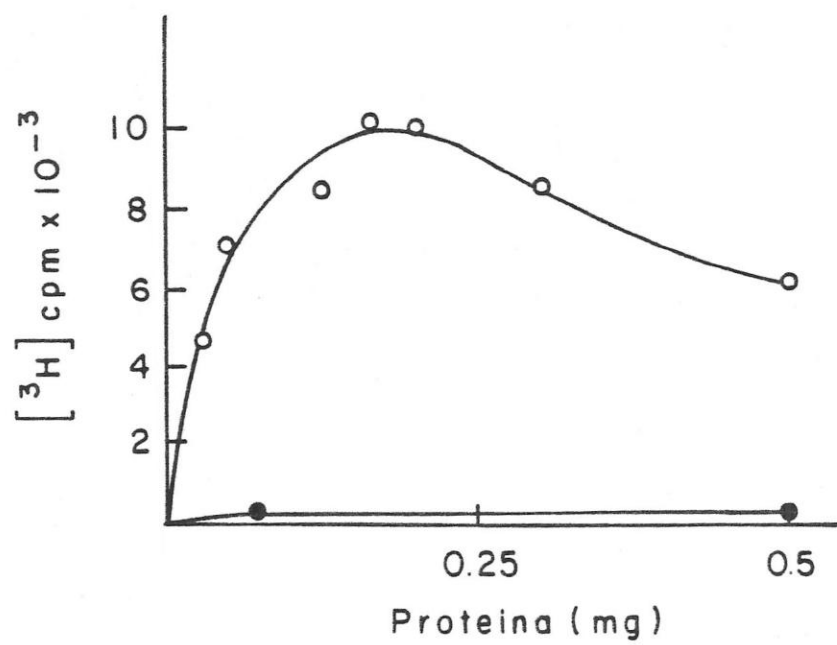
El primer sistema utiliza la etionina, que es un análogo de la metionina. Este análogo no es sustrato para la formación de S-AdoMet en *E. coli*, pero sí puede ser incorporado como aminoácido durante la síntesis de las proteínas (Alix, J-H., 1982). Así, al crecer una cepa de *E. coli* auxotrófica para metionina en un medio mínimo suplementado con etionina, se obtienen células que han sintetizado componentes submetilados (Alix, J-H., 1982; Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984). Aparentemente, estos polipéptidos en los cuales la Met se reemplazó por la etionina, no presentan alteraciones en sus funciones (Alix, J-H., 1982).

El otro sistema empleado consistió en crecer el mismo tipo de células de *E. coli* (met, rel) que requiere Met, en condiciones en las que la metionina se encontraba limitante (Chang, C. N. y Chang, F. N., 1974), como se describe en Materiales y Métodos.

El ensayo de metilación utilizado fue adaptado del descrito por Chang para la metilación *in vitro* de las proteínas ribosomales de *E. coli* (Chang, C. N. y Chang, F. N., 1974). En este, la fuente de proteínas submetiladas, es el sobrenadante de 150.000 g, de un extracto de *E. coli* crecida en las condiciones ya descrita. La figura 14 muestra la incorporación de grupos metilo del S-Ado(metil-³H)Met en los productos totales insolubles en ácido tricloro acético caliente. La máxima incorporación del isótopo en las proteínas se logró empleando 108 pmoles de S-AdoMet y alrededor de 200 µg de proteína total. De la figura 14 es obvio además, que sólo el extracto proveniente de las células crecidas en etionina, contiene sustratos metilables *in vitro*. En cambio, los extractos provenientes de las células aisladas en la fase tardía del crecimiento prácticamente no incorporan grupos metilo. Esto nos indica que las proteínas de estas células no son metilables, probablemente debido a que ya fueron metiladas en la bacteria, como veremos más adelante.

Figura 14.- Efecto de la concentración de proteínas de los sobrenadantes S150 en la incorporación de grupos metilo a las proteínas totales.

El ensayo de metilación *in vitro* se incubó a 37° por 30 min y contenía la cantidad de proteínas indicadas y 0,25 μ Ci de S-Ado(metil-³H)Met. (o—o), S150 de células crecidas en presencia de etionina; (●—●), S150 de las células en presencia de metionina crecidas hasta la fase tardía del crecimiento. La incorporación de los grupos metil-³H se midió precipitando las proteínas con TCA al 10 %, como se describió en Materiales y Métodos.

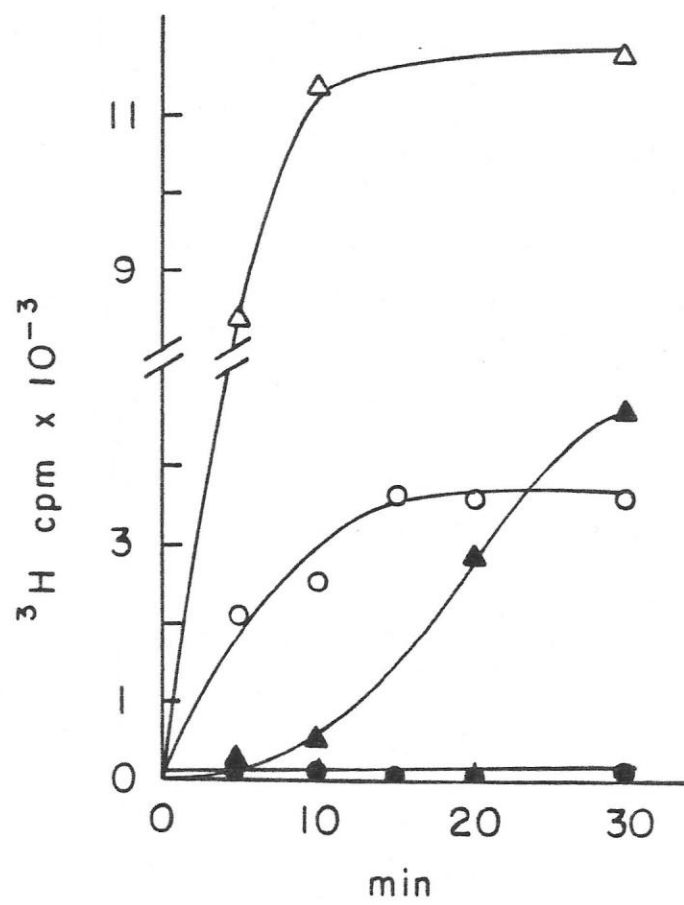


La figura 15 muestra la incorporación de grupos metilo en las proteínas totales y en el factor EF-Tu, tanto a partir de los extractos de *E. coli* obtenidos en presencia de etionina como en aquellos obtenidos en condiciones limitantes de metionina. En general, los extractos provenientes de células crecidas en condiciones limitantes de metionina, incorporan alrededor de tres veces más isótopo que aquellos de las células tratadas con etionina. Se observa que la metilación de las proteínas totales alcanzó un máximo alrededor de los 15 min. En cambio, el curso de la metilación de los productos inmunoprecipitados con suero antiEF-Tu se mantuvo casi lineal por lo menos durante 30 min. Sólo alrededor de un 20 % de los productos metilados se inmunoprecipitaron con el suero antiEF-Tu, indicando que otros componentes del sistema *in vitro* también se estarían modificando. Estos corresponderían fundamentalmente a proteínas, ya que se midió la incorporación a productos insolubles en TCA caliente, que hidroliza el RNA. Por otro lado, la incorporación de grupos metilo no disminuyó después de tratar los ensayos con ribonucleasa.

Los extractos de células submetiladas artificialmente son capaces de metilar las proteínas inmunoprecipitables por el suero antiEF-Tu y por lo tanto contienen la actividad metiltransferasa, como ya se ha visto. Esta actividad sin

Figura 15.- Cinética de metilación in vitro de las proteínas totales y del EF-Tu en extractos submetilados artificialmente.

Se tomaron alícuotas de un ensayo de metilación in vitro a diferentes tiempos y se determinó la incorporación de grupos metil- ^3H en las proteínas totales, precipitadas con TCA al 10 % caliente, o en las proteínas inmunoprecipitadas con suero antiEF-Tu mediante detección de las cuentas retenidas en filtros de fibra de vidrio GF/C. La incorporación de grupos metilo a las proteínas se efectuó en un ensayo que contenía en 200 μl : 1 mg de proteínas, de un S150 obtenido de células crecidas en condiciones de submetilación como sustrato, 250 μg de proteínas de un S150 obtenido de células crecidas hasta la fase estacionaria de crecimiento y en un medio rico como fuente de enzima, 0,25 μCi de S-Ado(metil- ^3H)Met (15 Ci/mol), Tris HCl 50 mM pH 7,8, MgCl_2 7,5 mM, NH_4Cl 50 mM y DTT 1mM. La incorporación total se midió en presencia de extractos de células crecidas en condiciones limitantes de metionina como sustrato (Δ — Δ); en células crecidas en presencia de etionina (o—o); en extracto de células crecidas hasta la fase estacionaria de crecimiento (●—●); y en extracto de células crecidas en condiciones limitantes de metionina después de ser inmunoprecipitado con suero antiEF-Tu (\blacktriangle — \blacktriangle).



embargo, se perdía rápidamente después del congelamiento y no se estimulaba si al ensayo se le agregaba un extracto de NH_4Cl , proveniente de un lavado ribosomal con cloruro de amonio 0,5 M, indicando que la actividad metiltransferasa probablemente no se encontraría asociada a los ribosomas.

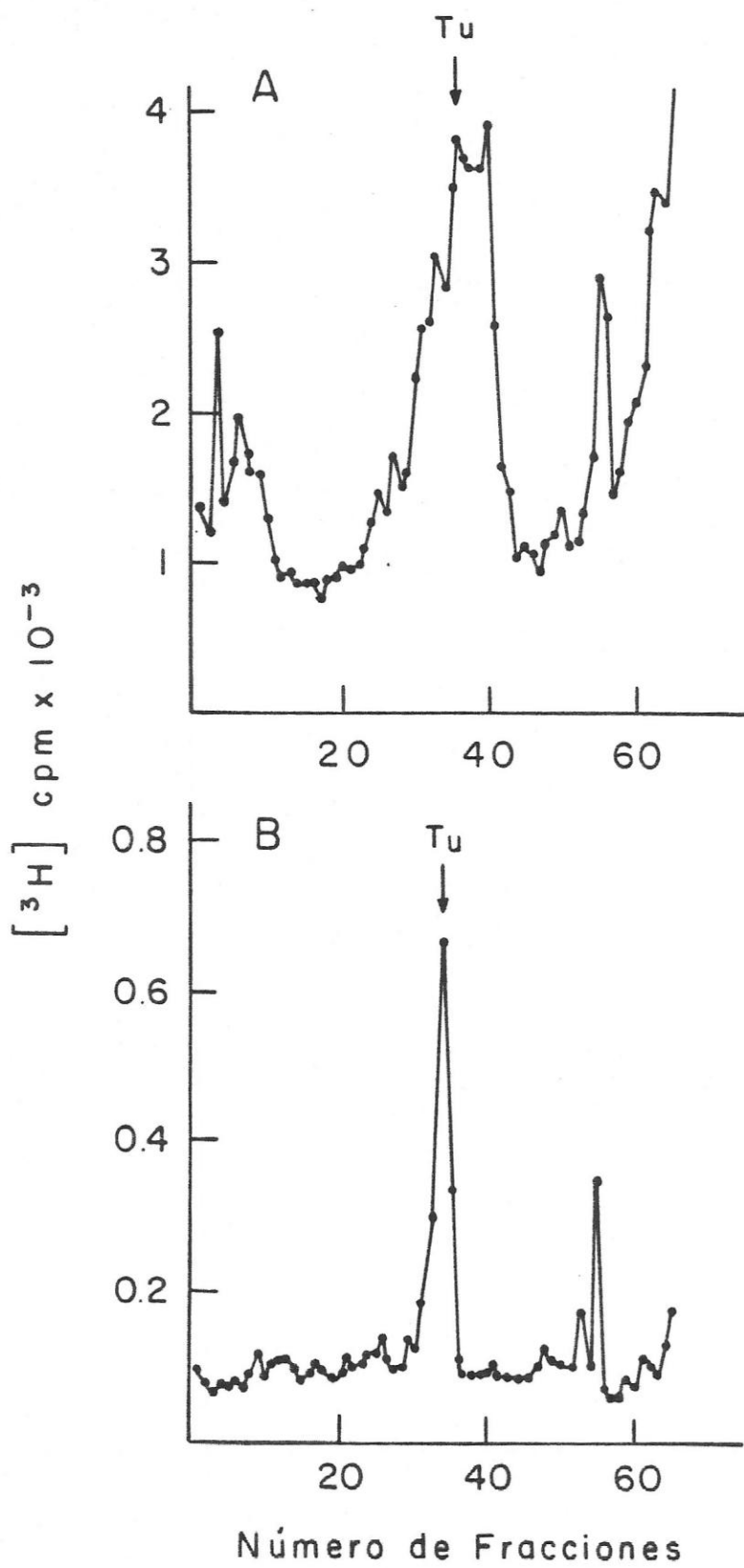
Al estudiar el efecto de cationes sobre la actividad metilante del EF-Tu, se pudo establecer que en presencia de KCl 50 mM ésta se estimuló aproximadamente en un 150 % .

3.2.3.- Presencia del Factor EF-Tu metilado en el ensayo de metilación in vitro

Habiendo demostrado que en los sistemas *in vitro* empleados es posible inmunoprecipitar productos metilados con el suero antiEF-Tu, quisimos confirmar si la metilación corresponde mayoritariamente a la molécula intacta del EF-Tu. Para ello analizamos primeramente los productos metilados totales obtenidos a partir de los extractos de células crecidas en presencia de etionina mediante electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. La figura 16 A muestra la distribución de la marca en las proteínas totales presentes en el ensayo de metilación. En (B) en cambio, se muestra la distribución de la marca en los productos inmunoprecipitados con el suero antiEF-Tu. Se puede observar que en ambos casos existe un pico de radiactividad que

Figura 16.- Identificación del EF-Tu como producto metilado in vitro.

Se incubó a 37°, una mezcla de reacción de metilación *in vitro* (900 μ l) como la que se describe en la figura 15, excepto que contenía 0,75 μ Ci de S-Ado(metil-³H)Met (15 Ci/mmol), y un S150 de células crecidas en etionina, como sustrato. Al final de la incubación, (A) se precipitaron las proteínas totales con TCA al 10 % y se lavaron dos veces con acetona, o (B) se tomaron 600 μ l de la misma mezcla de reacción y se inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu, tanto las proteínas totales obtenidas en A como el inmunoprecipitado obtenido en B se disolvieron por ebullición en SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 0,1 M. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10 %, SDS 0,1 %, el gel se cortó en tajadas de 1 mm y se trató como se indica en Materiales y Métodos, para la determinación de la radiactividad. La flecha indica la migración del EF-Tu puro empleado como estándar.



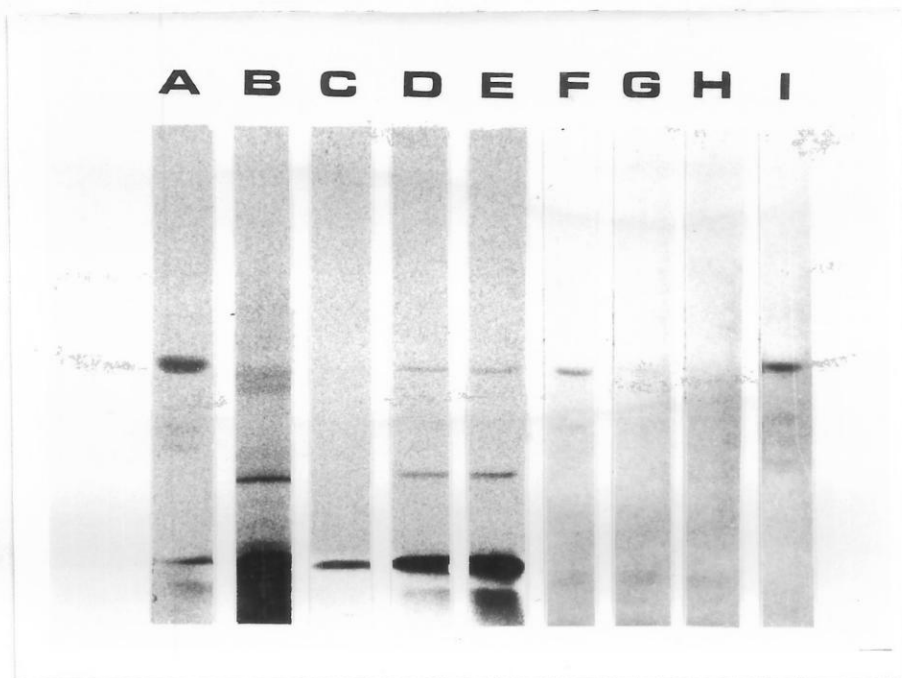
comigra con un estándar de EF-Tu y que éste es el producto mayoritariamente metilado en las condiciones del ensayo. También se observan algunos fragmentos metilados de bajo peso molecular que inmunoprecipitaron con el antiEF-Tu.

Al analizar los productos de un ensayo análogo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en placa, seguido de fluorografía, se confirmó la metilación *in vitro* del factor de elongación EF-Tu, como se muestra en la figura 17. A juzgar por los resultados obtenidos, en los extractos de células submetiladas artificialmente, existieran sólo unos pocos productos metilables (línea B).

Después de la inmunoprecipitación de una mezcla de reacción similar a la empleada en B con suero antiEF-Tu, se pudo observar que la proteína inmunoprecipitada es una banda de peso molecular aproximado 43.000 (C-E) que comigra con el EF-Tu estándar (A, I). Un resultado similar se obtuvo con el sistema que usa metionina limitante para el crecimiento de las bacterias (F). Empleando este último sistema, observamos que la adición de un exceso de EF-Tu purificado compitió con la banda de peso molecular 43.000 por la reacción con el anticuerpo (G, H). Este resultado nos permite confirmar inequívocamente la identidad de la proteína metilada con el factor de elongación EF-Tu de *E. coli*. Al analizar los aminoácidos metilados presentes en el

Figura 17.- Identificación del EF-Tu metilado in vitro mediante inmunoprecipitación con suero antiEF-Tu.

Se hicieron ensayos de metilación *in vitro* como en la figura 16, excepto que estos contenían 120 μg (C), 370 μg (D), o 600 μg (B, E) de proteínas de un extracto de células crecidas en presencia de etionina o 300 μg de un extracto de células crecidas en condiciones limitantes de metionina (F, G, H). Después de la incubación, 50 μl de cada mezcla de reacción se inmunoprecipitó con suero antiEF-Tu. Excepto las muestras analizadas en las líneas A, B e I. La inmunoprecipitación de las muestras G y H se hizo en presencia de 10 y 20 μg de EF-Tu puro, en exceso, respectivamente. Se usó EF-Tu tritiado químicamente como estándar. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 % y SDS 0,1 %, seguidas de fluorografía y autorradiografía durante 15 días a -70° .



EF-Tu, obtenido de células crecidas en presencia de etionina y modificado *in vitro*, mediante cromatografía en papel, encontramos tanto Lis(Me) como Lis(Me₂) (no se muestra) en proporciones aproximadamente iguales, del mismo modo que en el EF-Tu sintetizado y metilado en el sistema dependiente de DNA.

Se puede apreciar en la figura 17 que además de la metilación del EF-Tu, se metilaron algunos polipéptidos de menor tamaño (figura 17 B) y que también son inmunoprecipitados por el suero antiEF-Tu (C - E). Algunos de estos fragmentos de bajo peso molecular también compitieron con el EF-Tu puro en la reacción con el antisuero, aunque esto no es del todo aparente en la fotografía de la figura 17.

Como ya señalamos en este trabajo, tanto en el sistema de síntesis dependiente de DNA como en los ensayos de metilación *in vitro* recién descritos, se verificó la presencia de fragmentos metilables que son reconocidos por el suero antiEF-Tu. Estos polipéptidos podrían corresponder a fragmentos originados por la proteólisis del EF-Tu producida durante la reacción de metilación o durante el cultivo de las células en ausencia de metionina. Consideramos interesante analizar estos fragmentos en relación a la estructura del factor EF-Tu y la susceptibilidad de la molécula al ataque de proteasas, ya

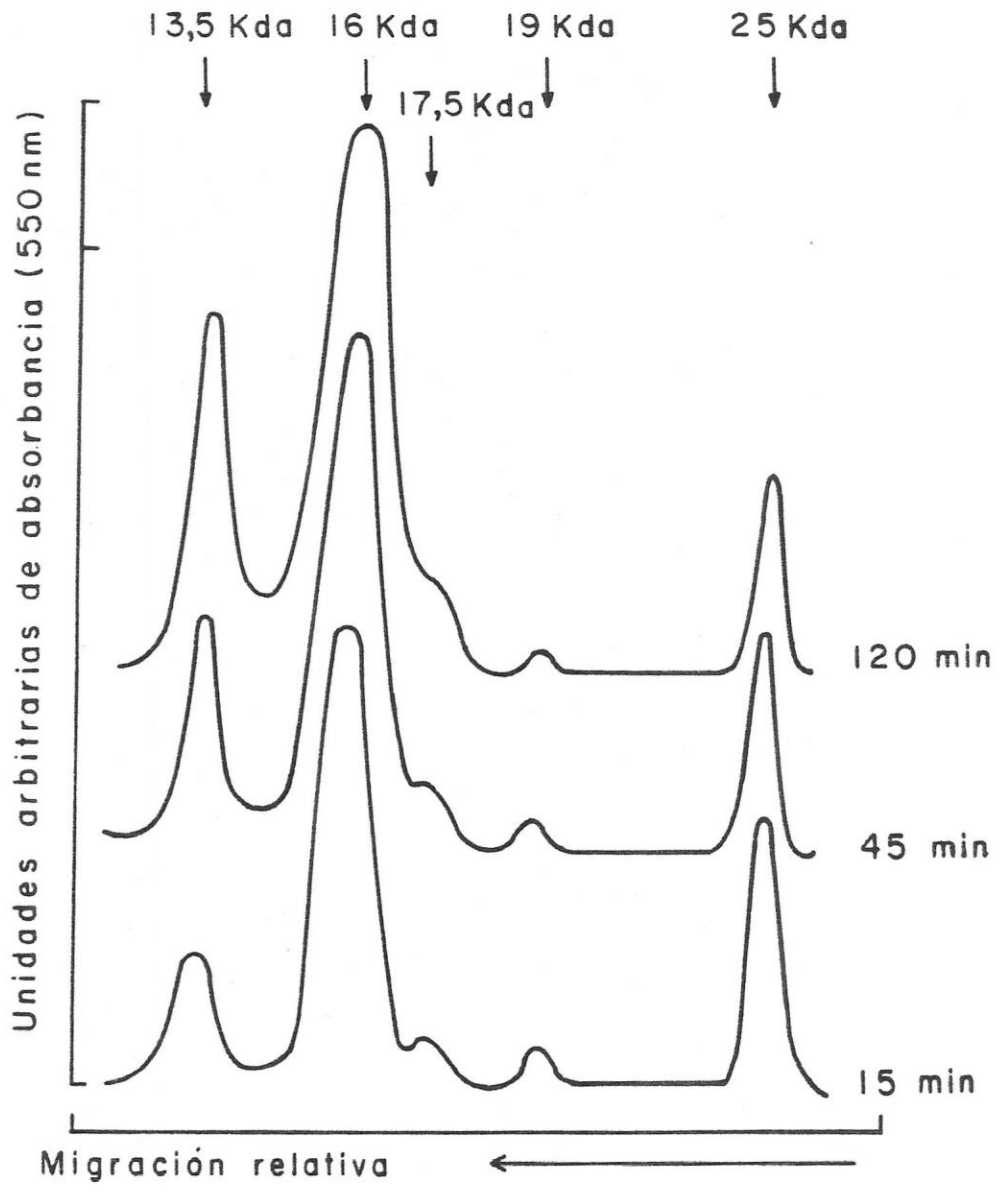
que hay ciertas evidencias experimentales (Marshak, D. R. y col., 1984; Poncz, L. y Dearborn, D. R., 1983; Stock, A. y col., 1987) indicando que la metilación de algunas proteínas podría protegerlas contra enzimas degradativas.

Cuando se somete el EF-Tu a una hidrólisis parcial en presencia de tripsina, en una primera etapa se generan un fragmento de peso molecular 39.000 daltons y otro de 8.000 daltons, los cuales se conocen como A y D. En una segunda etapa el fragmento A se transforma en los fragmentos B y C, cuyos pesos moleculares son 23.000 y 12.000 respectivamente (Nakamura, S. y col., 1977; Arai, K. y col., 1976). Estos cortes representan aparentemente los sitios susceptibles a la proteasa y serían los más expuestos en la molécula del EF-Tu.

Cuando se determinaron los pesos moleculares de los fragmentos observados en nuestros ensayos *in vitro*, se estableció que existían al menos dos de ellos, de pesos moleculares aproximados de 13.000 y 25.000 daltons, que son mayoritarios y que presentaban pesos moleculares similares a los fragmentos B y C obtenidos por Nakamura y col., como se muestra en la figura 18. Esto apoya la idea ya sugerida que tal vez estos péptidos, obtenidos en nuestros ensayos, podrían corresponder a productos de la proteólisis del EF-Tu generados durante el período de la reacción de metilación.

Figura 18.- Cuantificación de los productos metilados in vitro de bajo peso molecular que inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu.

Se hicieron ensayos de metilación *in vitro*, como se describe en la figura 15, empleando extractos de células crecidas en presencia de etionina, los que se incubaron por los tiempos indicados. Luego de inmunoprecipitar los productos metilados, estos se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS 0,1 %, fluorografía y posterior autorradiografía. Los productos de bajo peso molecular inmunoprecipitados se cuantificaron mediante densitometría a 550 nm en un espectro densitómetro ACD-18 Gelman.



La figura 18 nos muestra además, que la cantidad de los productos metilados reconocidos por el suero antiEF-Tu varió en el tiempo. Así, el fragmento de peso molecular 25.000 va disminuyendo en cantidad, mientras que los fragmentos 16.000 y 13.500 van incrementando, lo que sugiere que éstos últimos podrían originarse a partir del primero.

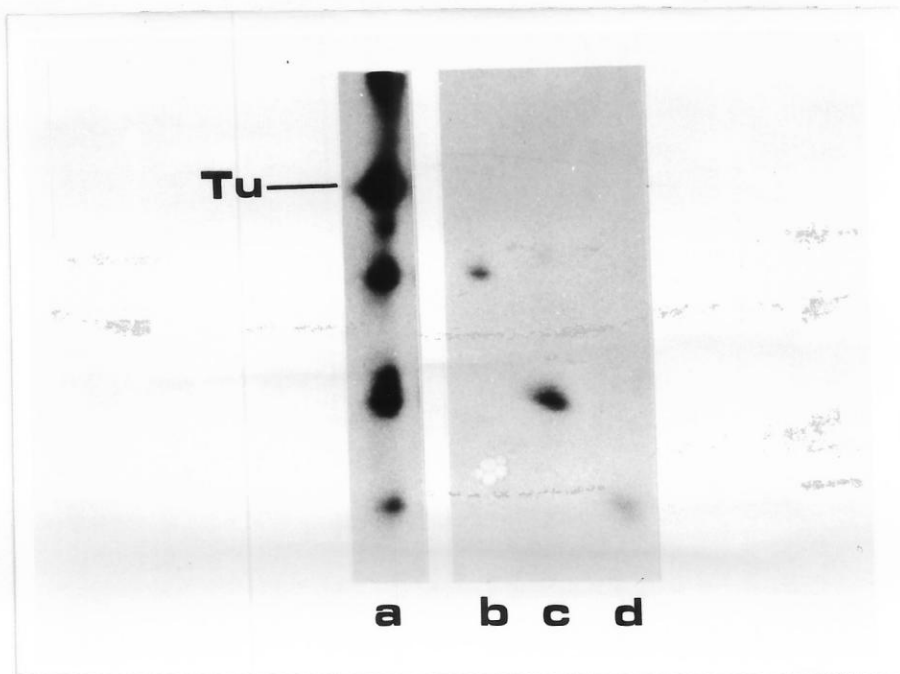
Al emplear PMSF (0,1 mM ó 0,3 mM) en los ensayos de metilación no se observó variación en los productos metilados. Este resultado señala que en el ensayo podría estar ocurriendo un proceso proteolítico que no es impedido por PMSF, el que podría ser similar a la segunda etapa de proteólisis limitada del EF-Tu por la tripsina. Alternativamente, se podría pensar que los fragmentos menores están ya presentes en los extractos y son metilados durante la incubación.

Otro antecedente que apoya la idea que los fragmentos metilados observados probablemente corresponden a péptidos derivados del EF-Tu, se obtuvo mediante experimentos de proteólisis *in situ*, con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*. Los productos metilados provenientes de un ensayo de metilación *in vitro* con un extracto obtenido de células crecidas en etionina, se inmunoprecipitaron y se separaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente entre el 7 y el 15 %, en presencia de SDS 0,1

%. Luego las bandas de los productos metilados de bajo peso molecular, se cortaron del gel y se trataron como se describe en Materiales y Métodos mediante la técnica de proteólisis in situ en una dimensión, utilizando como enzima proteolítica la proteasa V8 de *S. aureus*. La figura 19 muestra que los fragmentos metilados e inmunoprecipitados no son susceptibles de ser proteolizados con proteasa V8 (b, c, d), y que además coinciden en su migración electroforética con los polipéptidos obtenidos cuando una muestra de EF-Tu marcado con (metil-³H)metionina in vivo (a) fue tratado en las mismas condiciones, sugiriendo un cierto grado de identidad entre ambos tipos de fragmentos. Estos polipéptidos se originan por el ataque parcial de las proteasas sobre las regiones más expuestas de la molécula de EF-Tu como ya se mencionara.

Figura 19.- Determinación del patrón de péptidos, por proteólisis in situ, de los polipéptidos metilados de bajo peso molecular inmunoprecipitados con suero antiEF-Tu.

Un extracto de células crecidas en presencia de etionina se sometió a metilación *in vitro* en presencia de S-Ado(metil-³H)Met. Los fragmentos metilados se inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu como en la figura 18. Por otra parte, se inmunoprecipitó el EF-Tu a partir de un extracto de *E. coli* crecida en presencia de (metil-³H)metionina. Todos los inmunoprecipitados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en placa al 10 %, en presencia de SDS 0,1 %. Las bandas radiactivas correspondientes tanto a estos fragmentos (b, c, d) como al EF-Tu (a), se cortaron del gel y se analizaron mediante la detección de los péptidos generados por proteólisis limitada *in situ* en una dimensión con proteasa V8. Esta segunda electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 15 %, en presencia de SDS 0,1 % y los polipéptidos se pusieron de manifiesto mediante tinción, fluorografía y autorradiografía a -70° durante 20 días.



3.3.- Efecto de la metilación sobre algunas propiedades del factor de elongación EF-Tu

3.3.1.- Metilación in vivo del factor EF-Tu durante el ciclo de crecimiento de E. coli D-10

Se conoce muy poco acerca de la función de la N-metilación de las proteínas. El factor de elongación EF-Tu de *E. coli*, es la única proteína soluble no ribosomal que se ha descrito como metilada en esta bacteria (Ohba, M. y col., 1979; Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979). Aunque en esta tesis se desarrollaron por primera vez ensayos para estudiar la metilación del EF-Tu *in vitro* (Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985) no ha sido factible establecer aún el posible efecto de la metilación sobre la estructura o la función de la proteína.

En general, se ha descrito que las modificaciones post-traduccionales de las proteínas varían con el estado de crecimiento de la célula (Ramagopal, S. y Subramanian, A. R., 1974). L'Italien insinuó que la metilación del factor EF-Tu parece depender de la fase de crecimiento de la bacteria (L'Italien, J. J. y Laursen, R. A., 1979).

Para establecer el momento y la forma en que se metila *in vivo* el EF-Tu de *E. coli*, se estudió la metilación del factor en distintas etapas del crecimiento de la bacteria.

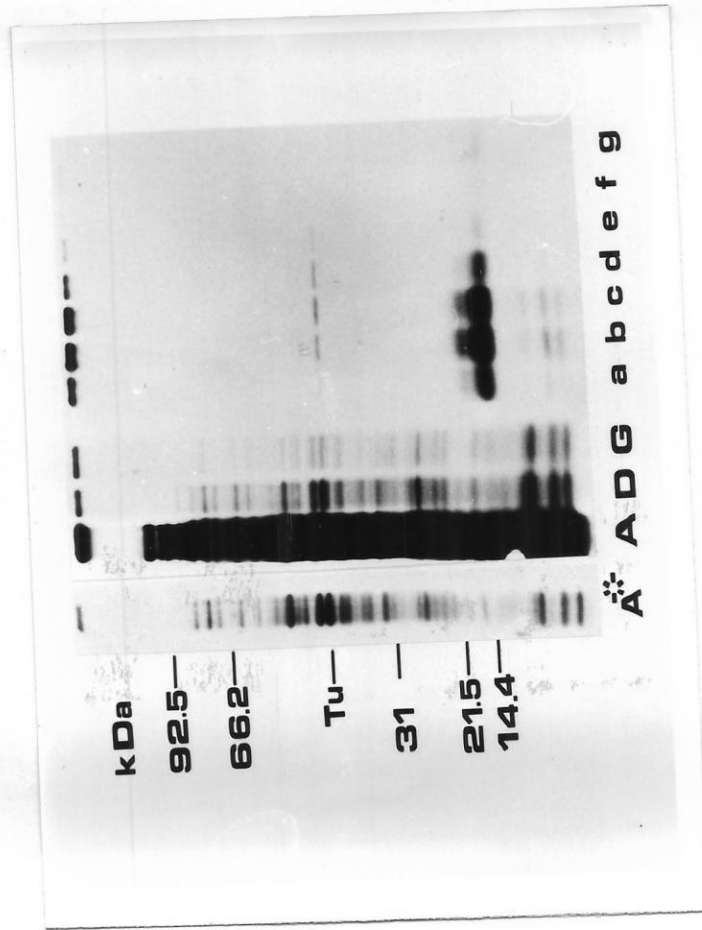
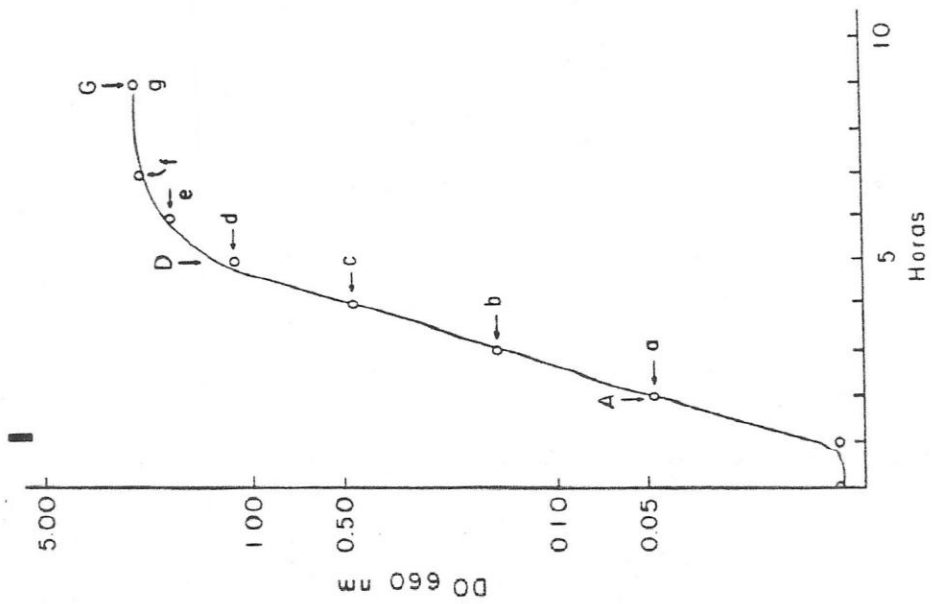
A partir de un cultivo de *E. coli* crecidas en medio mínimo, se tomaron alícuotas de 100 ml cada uno a los tiempos indicados por las flechas en la figura 20 I y las células de éstas alícuotas se incubaron en presencia de (metil-³H)metionina ya sea en ausencia (A*, A, D, G) o en presencia de cloramfenicol (a - g) por 8 minutos. En presencia del antibiótico como ya hemos visto, se inhibe la síntesis proteica y es posible por lo tanto detectar sólo la incorporación de los grupos metilo a las cadenas laterales de las proteínas. Es interesante observar que en la etapa temprana del crecimiento (2 horas), las células poseen una gran actividad para incorporar el aminoácido radiactivo. Sin embargo, ésta fue disminuyendo a medida que el cultivo se aproximó a la fase estacionaria de la curva de crecimiento (después de 6 horas).

Por otro lado, es posible observar (figura 20 II) que en la fase inicial de la curva de crecimiento, a pesar de haber una activa síntesis proteica, la capacidad de las células para metilar EF-Tu era baja (a) y que ésta fue aumentando a medida que las células entraron en la fase exponencial de crecimiento, observándose el máximo grado de incorporación de grupos metilo a las 4 horas (c). Posteriormente, la metilación del EF-Tu fue disminuyendo gradualmente y ya en la fase exponencial tardía (7 horas) (f) no fue posible detectarla en las condiciones del ensayo.

Figura 20.- Metilación in vivo del EF-Tu de E. coli durante su ciclo de crecimiento.

I.- Se creció *E. coli* D-10 en medio mínimo suplementado con 20 $\mu\text{g/ml}$ de metionina a 37°, con agitación. A los tiempos señalados en la curva de crecimiento, se tomaron alcuotas de 100 ml y las células se lavaron 2 veces con el mismo medio pero sin metionina.

II.- Las células lavadas de cada alcuota se resuspendieron en 50 ml del medio sin metionina y 2 alcuotas de 5 ml, de cada uno de los tiempos correspondientes, se incubaron una, en presencia de 1 mg de cloramfenicol y la otra sin cloramfenicol por 8 min a 30°. Enseguida, se tomó 1 ml de cada una de las alcuotas de 5 ml y se les agregó 0,2 ml de (metil- ^3H)metionina (concentración final 2,2 μM) y se continuó la incubación por 30 min, a 30° con agitación. Las células así marcadas se disolvieron en 30 μl de solución de Laemmli mediante ebullición, por 5 minutos. Tanto la incorporación del aminoácido como la incorporación de grupos metil- ^3H a las proteínas se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en gradiente del 7 al 15 %, SDS 0,1 % y autorradiografía. Se analizaron las proteínas de *E. coli* sintetizadas en ausencia de cloramfenicol (A, A*, D, G), y aquellas en presencia del antibiótico (a, b, c, d, e, f y g). La autorradiografía se expuso durante 7 días a -70°, excepto que en (A*), el gel se expuso durante 4 días. Para cada tiempo se utilizó la misma cantidad de células, medidas aproximadamente por el número de unidades de absorbancia a 660 nm.



Estos resultados indican por lo tanto, que en la fase temprana de crecimiento el EF-Tu sería submetilado. En cambio en la fase tardía estaría completamente metilado. Estos resultados están de acuerdo con aquellos recientemente publicados, durante el transcurso de esta tesis, por van Noort (van Noort, J. M. y col., 1986), quienes encontraron que el EF-Tu se encuentra 20 % metilado, como monometil lisina, cuando las células están en la mitad de fase logarítmica de crecimiento. Sin embargo, a medida que el cultivo progresa hacia la fase estacionaria del crecimiento, la monometilación se va gradualmente modificando como dimetil lisina, encontrándose en esta etapa 100 % metilado.

Por otro lado, con el propósito de dilucidar la posible función de la N-metilación de la lisina-56 del factor EF-Tu hemos comparado algunas propiedades del EF-Tu metilado con el EF-Tu submetilado. Para ello, como fuente de EF-Tu metilado se utilizó el factor purificado de *E. coli* LBE 1001, crecidas hasta la fase estacionaria tardía de la curva de crecimiento (EF-TuL). En cambio, como EF-Tu submetilado se utilizó el factor purificado de *E. coli* MRE 600, crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (EF-TuM) y el obtenido a partir de *E. coli* D-10, crecidas en presencia de etionina (EF-TuE). Los resultados

de estas purificaciones y los grados de pureza obtenidos se presentaron en la sección Materiales y Métodos.

3.3.2.- Efecto de la metilación sobre la sensibilidad del factor EF-Tu a la degradación proteolítica

Se ha sugerido que la metilación de los grupos ϵ -NH₂ de la lisina, protegería a la molécula de proteína del ataque proteolítico de las proteasas intracelulares in vivo (Marshak, D. R. y col., 1984; Poncz, L. y Dearborn, D. G., 1983; Stock, A. y col., 1987).

Como una primera aproximación para analizar la sensibilidad del EF-Tu metilado respecto del submetilado frente a la hidrólisis enzimática, se estudió el patrón de péptidos por proteólisis in situ en una dimensión utilizando la proteasa V8 de *S. aureus*, que presenta una especificidad por los sitios donde hay residuos de aspartato o glutamato. El análisis de los péptidos resultantes de la digestión se efectuó como se describe en Materiales y Métodos.

Bajo las condiciones empleadas se obtuvo una digestión muy reproducible del factor EF-Tu. Para el análisis, se creció *E. coli*, como se describe en Materiales y Métodos, hasta la mitad de la fase exponencial del crecimiento (EF-Tu submetilado), en un caso, y hasta la fase estacionaria (EF-Tu metilado), en otro. Las células así obtenidas se

sometieron a marcación durante 30 min en presencia de (metil-³H)metionina, se rompieron mediante sonicación y el EF-Tu se aisló por inmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Posteriormente, las respectivas bandas de proteína, correspondientes al EF-Tu, se cortaron del gel deshidratado y se sometieron a proteólisis *in situ* con la proteasa V8.

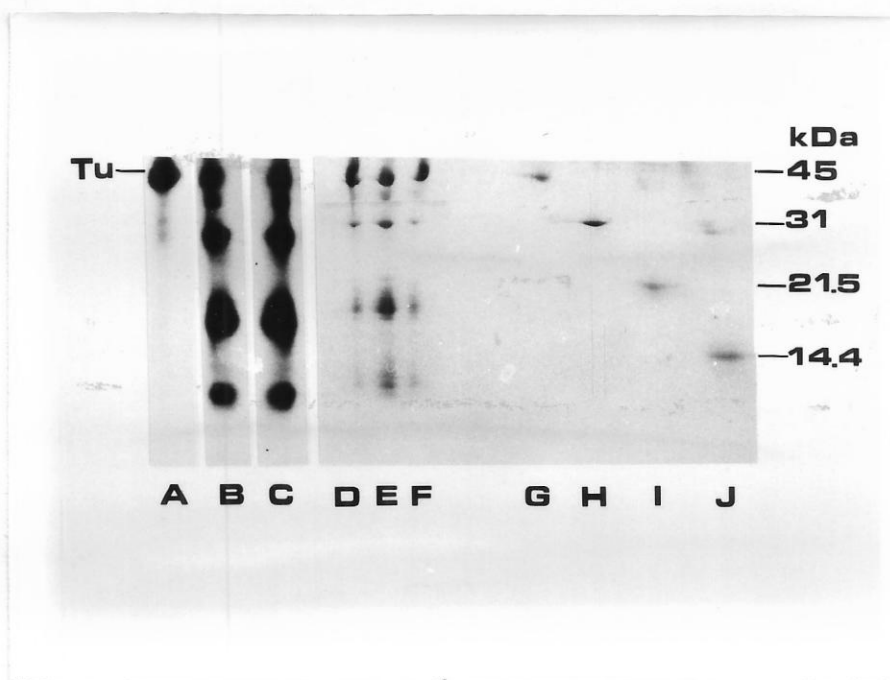
La figura 21 B y C, muestra que después de separar los péptidos producidos por la digestión con la proteasa V8 mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 %, en presencia de SDS, y posterior autorradiografía, no habría diferencias cualitativas entre el factor EF-Tu metilado (C) y el submetilado (B). La figura 21 muestra además que cuando se analizaron los productos de degradación por tinción con azul de coomassie tanto el EF-Tu metilado (D) como los submetilados (E, F) son degradados por la enzima, generando los mismos polipéptidos. Sin embargo, en las condiciones utilizadas, el EF-TuM (E) aparentemente se hidrolizó más que el EF-TuE (F) y que el factor metilado (D).

Como la proteólisis *in situ* utiliza proteínas desnaturadas (bandas extraídas de un gel deshidratado de poliacrilamida con SDS) y proteasa V8 disuelta en una solución desnaturalante, no es el método más adecuado para

Figura 21.- Proteólisis in situ del EF-Tu metilado y submetilado con proteasa V8 de S. aureus.

Células de *E. coli* se crecieron hasta la mitad de la fase logarítmica y hasta la fase estacionaria en medio mínimo y en seguida se marcaron con (metil-³H)metionina durante 30 min. Extractos de estas células marcadas radiactivamente conteniendo EF-Tu submetilado (B) o metilado (C) se inmunoprecipitaron con suero antiEF-Tu. Por otra parte se inmunoprecipitaron 25 µg de los siguientes factores no radiactivos: EF-TuL, EF-TuM y EF-TuE con el mismo antisuero. Tanto las muestras de EF-Tu radiactivas como las no radiactivas y los estándares de peso molecular, se separaron por electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Una vez teñido y fijado el gel, se cortaron las bandas, las que se identificaron por tinción con azul de coomassie o por autorradiografía. Cada una de las bandas cortadas se analizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % que se muestra, de acuerdo a la técnica de proteólisis limitada *in situ* en una dimensión, como se describe en Materiales y Métodos.

A: EF-Tu inmunoprecipitado sin digerir; B: EF-Tu radiactivo submetilado; C: EF-Tu radiactivo metilado; D: EF-TuL; E: EF-TuE; F: EF-TuM; G, H, I y J, estándares extraídos del primer gel de poliacrilamida en placa al 10 %, sin digerir.

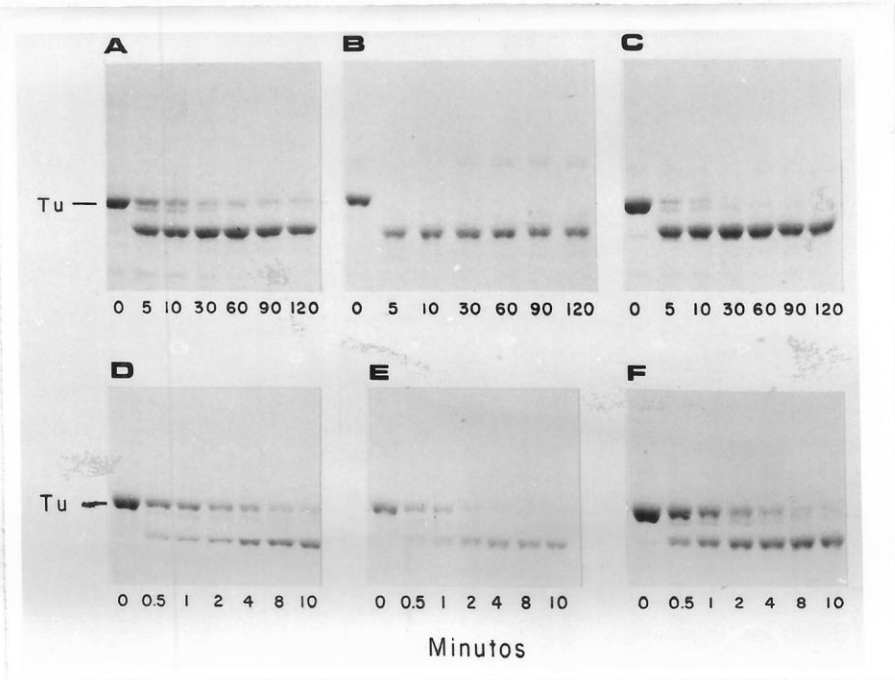


establecer diferencias, que pueden ser pequeñas, en la susceptibilidad de diferentes forma, de una protefna nativa a la proteólisis. Por esto analizamos el posible efecto de la metilación del EF-Tu sobre la velocidad de hidrólisis del factor en estado nativo, en solución, catalizada por la tripsina.

Para ello comparamos la digestión tríptica del EF-Tu metilado con la de los EF-Tu submetilados, a distintos tiempos. Los fragmentos resultantes de esta proteólisis parcial se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5 %, en presencia de SDS. Bajo las condiciones empleadas la tripsina generó en una primera instancia un péptido de peso molecular aproximado de 39.000 daltons (fragmento A) y un péptido de aproximadamente 8.000 daltons (fragmento D) (Nakamura, S. y col., 1977) (figura 22). Se puede apreciar que durante los primeros 5 minutos de reacción, el EF-Tu tanto metilado (A) como submetilado (B, C), se degradan generando el fragmento de 39.000 daltons. Sin embargo, el EF-TuL (A) es más estable frente a la hidrólisis tríptica que el EF-Tu submetilado (B, C), ya que a los 120 minutos aún era posible observar la presencia de una banda que comigró con el EF-Tu intacto (tiempo 0). Se pudo establecer además, que el EF-TuM (B) es más sensible a la acción de la tripsina que el EF-TuE (C), ya que este último alcanzó su degradación total sólo

Figura 22.- Degradación triptica del EF-Tu metilado y submetilado.

Se digirió 50 μg de EF-TuL, metilado (A, D), EF-TuM, submetilado (B, E) y EF-TuE, submetilado (C, F) con tripsina (razón enzima/proteína 1:50) a 0°, como se describe en Materiales y Métodos. Los productos de la proteólisis se analizaron mediante electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 7,5 %, SDS 0,1 %. A los tiempos indicados 12 μl de cada mezcla de reacción se adicionaron a 12 μl de solución de Laemmli y se sometieron a ebullición durante 5 minutos. Sólo se muestra la región donde migran el EF-Tu intacto y el polipéptido resultante de peso molecular 39.000 daltons, que se generó durante la proteólisis parcial.



después de 30 minutos de digestión, mientras que el EF-TuM a los 5 minutos se encontró totalmente degradado (figura 22 B).

Con el propósito de apreciar mejor las diferencias observadas, se estudió la acción de la enzima en un lapso de tiempo menor. La figura 22 D-F, muestra nuevamente que el EF-TuM (E) es más sensible a la acción de la enzima que el EF-TuE (F), ya que el primero alcanzó su degradación total después de los primeros 4 minutos de reacción, mientras que el EF-TuE no se degradó totalmente sino hasta los primeros 10 minutos de reacción (F). Nuevamente, el EF-TuL se degrada más lentamente que las muestras anteriores. La figura 23, muestra la cuantificación densitométrica de la cinética de proteólisis de las diferentes preparaciones de EF-Tu.

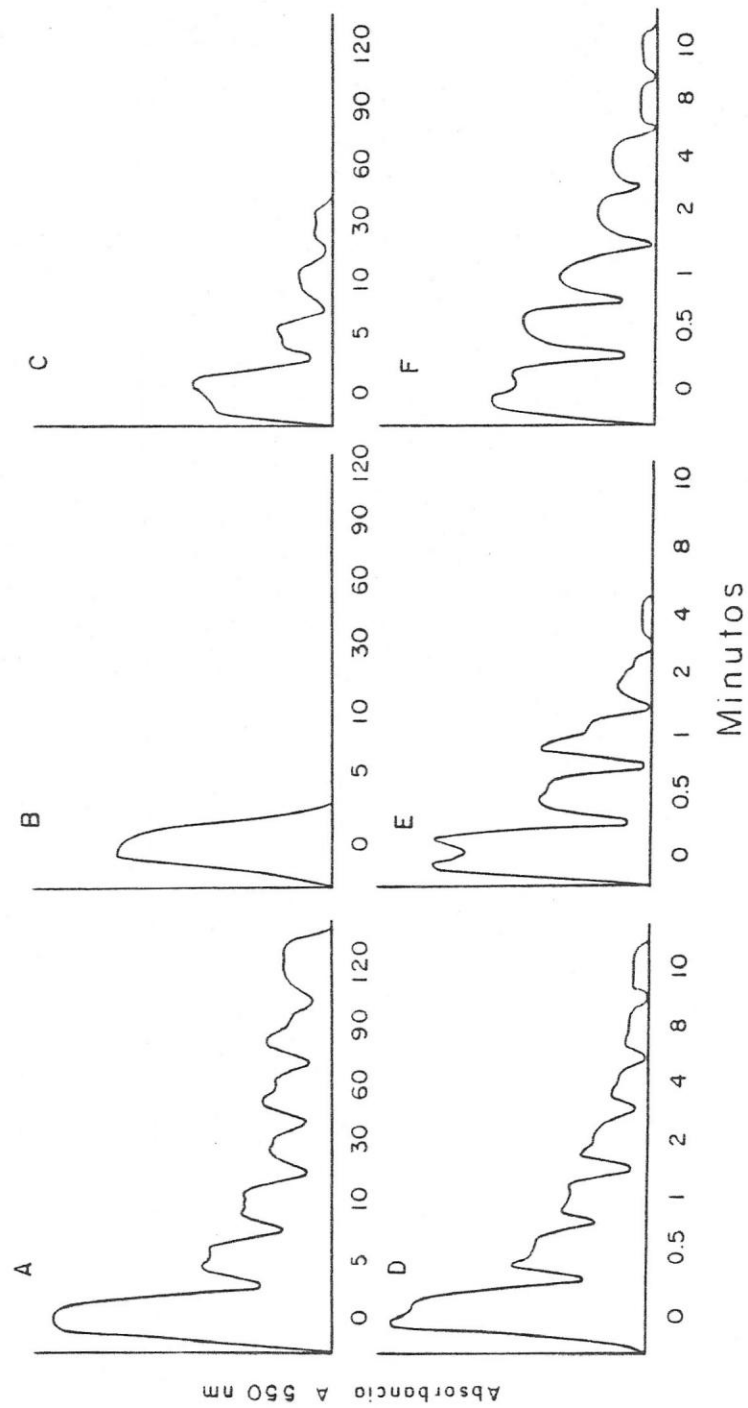
3.3.3.- Efecto de la metilación sobre la actividad biológica del EF-Tu

3.3.3.1.- Efecto de la metilación del EF-Tu en su capacidad de intercambio de nucleótidos

Se ha descrito que la disociación del GDP del EF-Tu es el paso limitante en el intercambio GDP-GTP tanto en ausencia como en presencia del factor de elongación EF-Ts (Fasano, O. y col., 1978). Por ello fue de interés comparar

Figura 23.- Cuantificación de la desaparición del EF-Tu por digestión con tripsina.

Las bandas de EF-Tu remanente después de la proteólisis de las distintas preparaciones de EF-Tu de la figura 22, se cuantificaron mediante densitometría. A y D, EF-TuL; B y E, EF-TuM y C y F, EF-TuE.

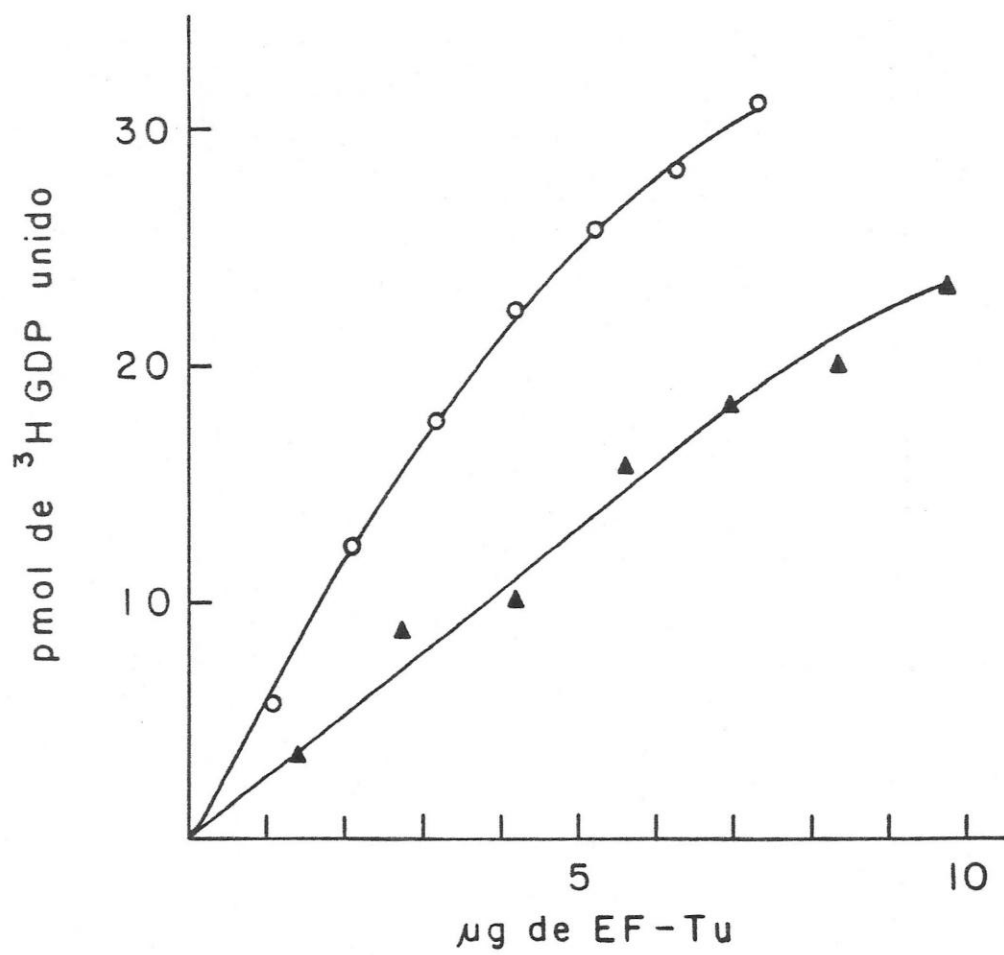


la unión del GDP al EF-Tu y las velocidades de disociación de los nucleótidos, GDP y GTP, a partir de los complejos EF-Tu·GDP y EF-Tu·GTP tanto para el factor metilado como para el submetilado.

Primeramente se comparó la actividad de intercambio de GDP del factor EF-TuE utilizando extractos crudos provenientes de *E. coli* D-10 crecidas en presencia de etionina, con aquella de la bacteria crecida en presencia de metionina hasta la fase estacionaria de la curva de crecimiento. El contenido de EF-Tu en ambos extractos se determinó por la técnica de inmunopresión y posterior análisis densitométrico. La figura 24 muestra que el EF-TuE presenta una mayor capacidad de unión del $^3\text{HGDP}$ que el EF-Tu de células crecidas en presencia de metionina. Esta diferencia podría deberse a la submetilación del EF-TuE. Sin embargo, cuando el extracto etionina se incubó por 40 min. a 37° en presencia de un exceso de S-AdoMet, el cual debería provocar la metilación del EF-TuE, no se observó ninguna diferencia en su capacidad de intercambio de GDP comparado con el control (normalmente metilado). Estos resultados sugieren tal vez que estas diferencias observadas en el comportamiento del EF-TuE podrían obedecer más bien a sus propiedades intrínsecas que a la submetilación.

Figura 24.- Unión del $^3\text{HGDP}$ a 0° al EF-TuE presente en diferentes extractos crudos.

La unión del $^3\text{HGDP}$ al EF-Tu contenido en extractos S150, se midió con un ensayo cuyas condiciones fueron como se describe en Materiales y Métodos, excepto que contenía en $40\ \mu\text{l}$: 132 pmoles de $^3\text{HGDP}$ (50 cpm/pmol), $10\ \mu\text{l}$ de amortiguador Mix-Tu GDP (Tris HCl 200 mM pH 7,5, acetato de Mg 40 mM, NH_4Cl 600 mM y DDT 4 mM) y $25\ \mu\text{l}$ de amortiguador A (Tris HCl 10 mM pH 7,8, acetato de Mg 10 mM, KCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,58 mM y glicerol 20 % v/v) y cantidades variables de los extractos utilizados como fuente de EF-Tu. Se midió la unión del GDP al EF-Tu presente en un S150 etionina (21 mg/ml, EF-Tu estimado 1,05 mg/ml) (o—o) como en un S150-metionina (28 mg/ml, EF-Tu estimado 1,4 mg/ml) (\blacktriangle — \blacktriangle) obtenido de células crecidas hasta la fase estacionaria. Después de 20 min a 0° la mezcla de reacción se diluyó con 1 ml de amortiguador de dilución frío (Tris HCl 10 mM, acetato de Mg 10 mM), se filtró y se determinó la radiactividad como en Materiales y Métodos.



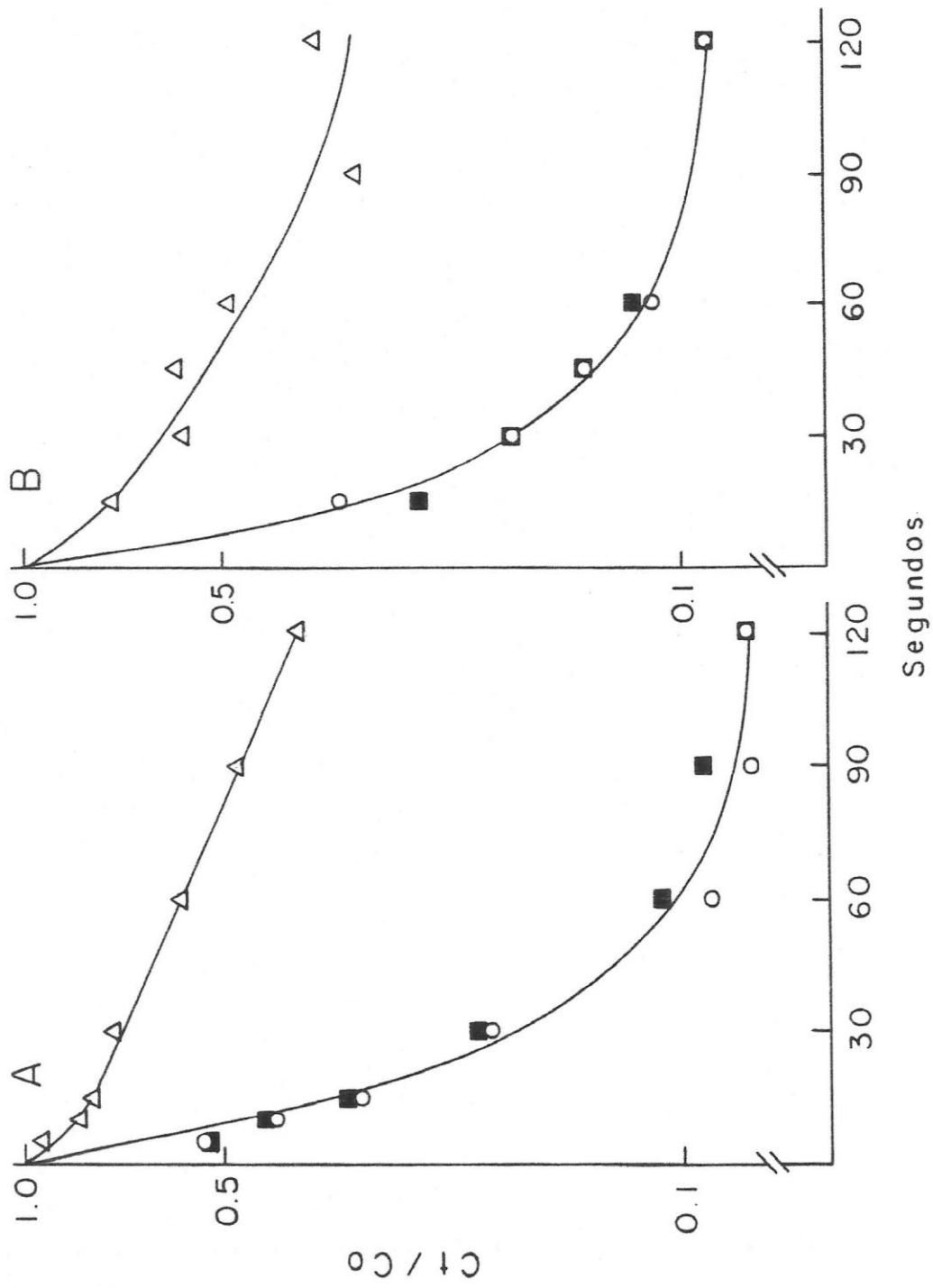
Para estudiar este fenómeno en más detalle, se emplearon preparaciones purificadas de los diferentes EF-Tu. La figura 25 muestra que no se observaron diferencias significativas al comparar las velocidades de disociación de los nucleótidos entre el EF-Tu metilado y el EF-TuM, submetilado. En ambos se obtuvo aproximadamente un 50 % de disociación a los 5 y a los 6 seg, para el GTP y el GDP respectivamente. Sin embargo, cuando se empleó el EF-TuE se obtuvo una mucho menor velocidad de intercambio de ambos nucleótidos, observándose el 50 % de disociación a los 80 seg y a los 55 seg para el GDP y el GTP, respectivamente.

A 0° prácticamente no se produce intercambio de GDP en ausencia del factor EF-Ts y el intercambio de GTP es mínimo. Sin embargo, los resultados de la figura 25 muestran que las preparaciones purificadas de cada uno de los EF-Tu utilizados probablemente contienen EF-Ts como contaminante, a pesar de que por análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, esto no es inmediatamente obvio (figura 6). Esto no es de extrañar, ya que el EF-Ts se une al EF-Tu y actúa en forma catalítica, de modo que aún niveles muy bajos de EF-Ts pueden estimular el intercambio de los nucleótidos.

Como la diferencia observada con el EF-TuE podría deberse a que esta preparación contiene una menor cantidad de EF-Ts, se midió el intercambio de las 3 preparaciones en

Figura 25.- Disociación de nucleótidos por diferentes preparaciones purificadas de EF-Tu.

Las diferentes preparaciones de EF-Tu se incubaron en presencia de $^3\text{HGD}\text{P}$ o $^3\text{HGTP}$ a 37° para promover la unión de ambos nucleótidos. Luego se midió la disociación de ambos nucleótidos a 0° en el tiempo, como se describe en Materiales y Métodos. C_t corresponde a las cuentas retenidas en el filtro de nitrocelulosa al tiempo indicado, y C_0 a las cuentas retenidas a tiempo cero. A. Disociación del GDP. B disociación del GTP. EF-TuL (o—o), EF-TuM (■—■), EF-TuE (△—△).



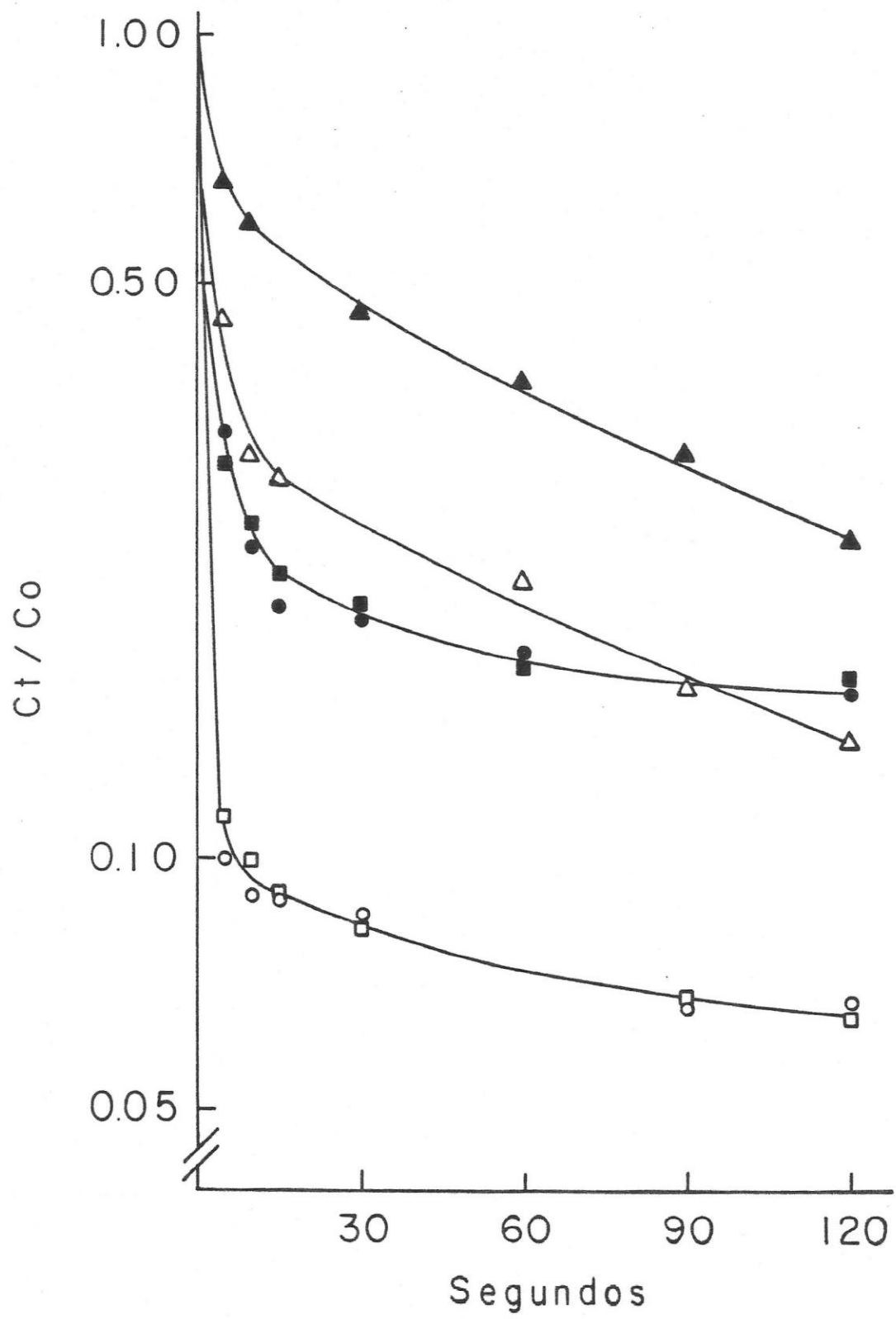
presencia de un exceso del factor EF-Ts. Este último factor aunque parcialmente purificado, no contiene EF-Tu, a juzgar por la ausencia de inmunoreacción con suero antiEF-Tu y por la ausencia de una banda de proteína de peso molecular 43.000, cuando la preparación se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.

En estas condiciones se apreció un aumento en la velocidad de intercambio de GDP. Sin embargo, nuevamente no se observó una diferencia en las velocidades de intercambio entre el factor metilado y el EF-TuM. Por otra parte, se mantuvo también la menor velocidad de intercambio para el EF-TuE (figura 26). Por lo tanto, esta menor actividad no se debería a que el factor EF-Ts era limitante. Por otro lado, tanto el EF-TuM como el EF-TuE, ambos submetilados, incorporan cantidades similares de grupos metilo in vitro (ver figura 17). Estos resultados nos indican que la diferencia de actividad observada con el EF-TuE es probablemente debida a alguna propiedad intrínseca del factor obtenido a partir de las células crecidas en etionina.

Más aún, el no haber observado diferencias en la velocidad de intercambio de nucleótidos entre el EF-TuM y el EF-TuL, en presencia de EF-Ts, nos indica que tanto la interacción EF-Tu·EF-Ts como los efectos conformacionales

Figura 26.- Disociación de GDP del EF-Tu a 0° en presencia y en ausencia de EF-Ts.

Se midió la disociación del GDP del EF-TuL (○, ●), EF-TuM (□, ■) y del EF-TuE (△, ▲) a 0° en ausencia (●, ■, ▲) o en presencia (○, □, △) de un extracto semipurificado de EF-Ts. Las condiciones de reacción y procedimientos fueron como los descritos en la figura 25.



que el EF-Ts produce sobre el EF-Tu no serían afectados por el grado de metilación del EF-Tu en la lisina-56.

Debido a que los experimentos preliminares ya analizados (figura 24) mostraron que el EF-TuE aparentemente poseería una mayor capacidad de unión de GDP que el EF-Tu normal, quisimos cuantificar el ³HGDP unido al factor utilizando dos procedimientos diferentes.

El primero, consistió en medir el EF-Tu·GDP retenido a filtros de nitrocelulosa. Este método, a pesar de ser extremadamente sencillo se sustenta en que: i) el EF-Tu·GDP se une al filtro en forma cuantitativa aún en concentraciones de 10^{-9} M. ii) La cantidad de EF-Tu·GDP retenida en el filtro no disminuye después que el filtro es exhaustivamente lavado. iii) El EF-Tu también se une al filtro pero una vez unido éste no reacciona con el GDP (Miller, D. L. y Weissbach, H., 1970).

El segundo procedimiento consistió en medir la retención del EF-Tu en una columna de afinidad de GDP-Sefarosa.

Los resultados de ambos métodos se presentan en la Tabla III. De los datos obtenidos por ambos criterios se pudo concluir que el EF-TuE une más GDP que el EF-TuL y el EF-TuM, mientras que estos dos últimos presentan aproximadamente la misma capacidad de unir el nucleótido.

Tabla III

Determinación de la capacidad de unión de GDP por el EF-Tu con distintos grados de metilación

METODOS		
	Retención en nitrocelulosa	Columna de afinidad
	pmoles de ³ HGDP unido/ 100 pmoles de EF-Tu	EF-Tu retenido a la columna de GDP-Sepharose µg/ml
EF-TuL (metilado)	25,6	0,18
EF-TuM (submetilado)	25,8	0,20
EF-TuE (etionina)	38,5	0,42

- Método de retención en nitrocelulosa. Las diferentes preparaciones de EF-Tu en una concentración de 6,6 µM se incubaron con ³HGDP 3 µM y la mezcla se mantuvo a 37° por 30 min. Luego se midió el EF-Tu ³HGDP retenido en filtros de nitrocelulosa, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra el promedio de seis experimentos realizados en forma independiente.

- Método columna de afinidad. La cantidad de EF-Tu retenido en columnas de afinidad se midió aplicando 20 µg de cada factor en sendas columnas de 5 ml de GDP-Sepharose, previamente equilibradas con Tris HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM (amortiguador de elución). Luego se cerró la llave de paso de la columna durante 10 min, para favorecer el intercambio. Una vez finalizado este tiempo se lavó la columna con 4 volúmenes del amortiguador de elución (las sustancias no retenidas eluyen de la columna a los 5 ml aproximadamente). Después se eluyó el EF-Tu retenido utilizando el mismo amortiguador de elución al que se le adicionó GDP 100 µM, y se colectaron 12 fracciones de 4 ml cada una. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente.

Para cuantificar el EF-Tu retenido se liofilizaron todas las fracciones colectadas, las que posteriormente se resuspendieron en un pequeño volumen de agua y se juntaron para ser dializadas contra 4 cambios de agua durante 1 h cada vez. Finalmente el EF-Tu se cuantificó mediante la técnica de inmunopresión y posterior densitometría.

Estos resultados apoyan la idea ya planteada que la mayor capacidad del EF-TuE para unir GDP se debería más que a la falta de metilación, a una posible modificación de su estructura, producto de la incorporación de las etioninas en lugar de las metioninas.

3.3.3.2.- Efecto de la metilación del EF-Tu en su actividad GTPásica

Durante la síntesis de las proteínas, la hidrólisis del GTP aporta la energía necesaria para completar un ciclo de elongación normal, la cual está asociada con la interacción de los factores EF-Tu y EF-G con el ribosoma. La hidrólisis del GTP asociada al EF-Tu está acoplada con la unión enzimática del aa-tRNA al complejo ribosoma mRNA y procede con la liberación del factor del ribosoma (ver figura 1).

Es posible desacoplar la hidrólisis del GTP dependiente del EF-Tu de la presencia del ribosoma y del aa-tRNA utilizando el antibiótico kirromicina, el cual se une estequiométricamente al factor EF-Tu e induce su actividad GTPásica (Parmeggiani, A. y Swart, G. W. M., 1985; Wolf, H. y col., 1974). La kirromicina es un agente antibacteriano aislado de cepas de *Streptomyces*, que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose específicamente al EF-Tu, de modo que el complejo EF-Tu • GDP • kirromicina no se

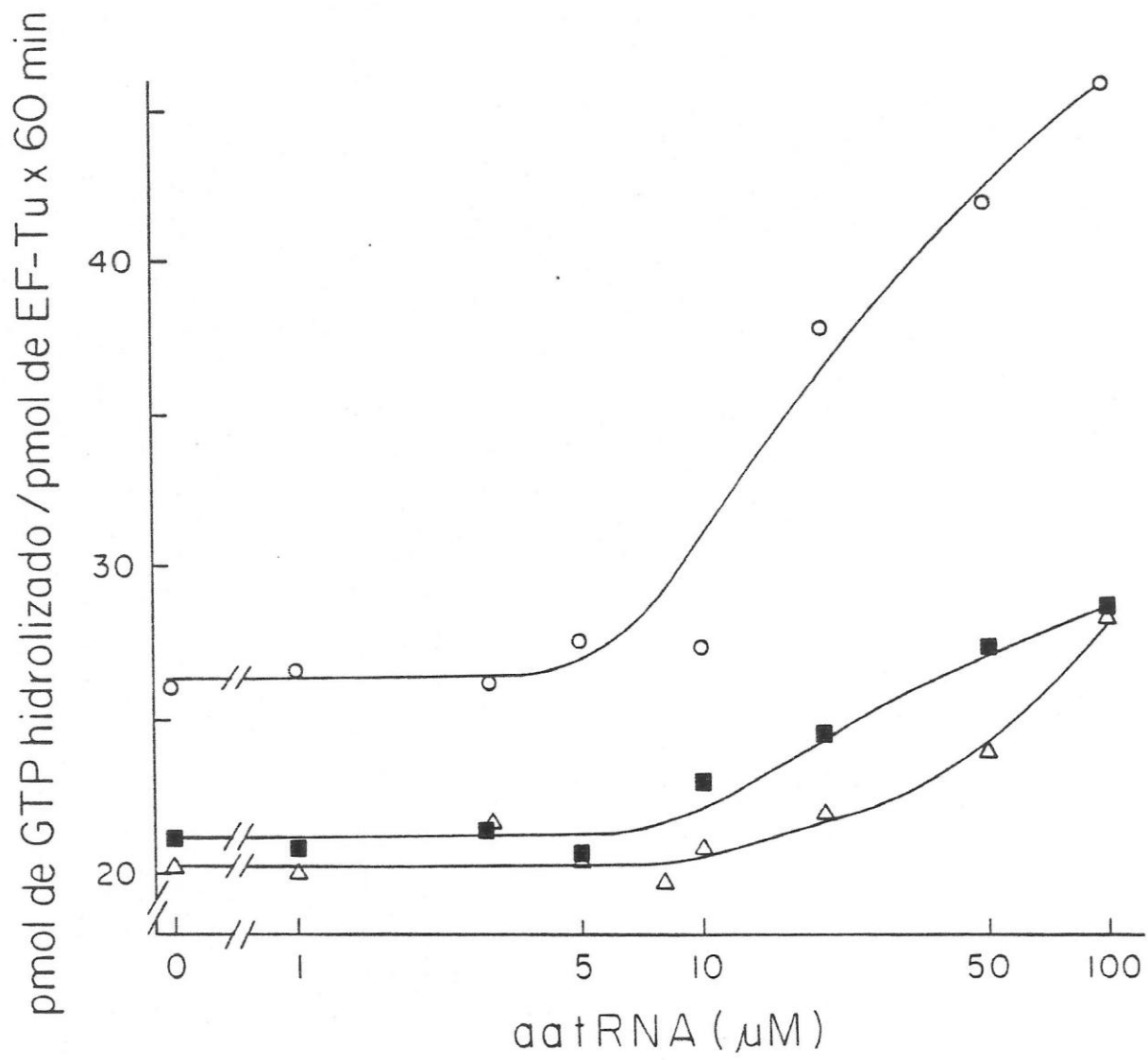
disocia del ribosoma, porque el EF-Tu·GDP mantiene la conformación del EF-Tu·GTP, y de esta forma se inhibe la formación del enlace peptídico. Por otra parte, tanto el aaRNA como los ribosomas individualmente estimulan la actividad GTPásica del EF-Tu activada por el antibiótico (Wolf, H. y col., 1974).

Al estudiar la actividad GTPásica del factor EF-Tu metilado y submetilado inducida por kirromicina y estimulada por aaRNA, se encontró una clara evidencia que existe un efecto de la metilación *in vivo* del EF-Tu en su reacción de hidrólisis del GTP (figura 27). Estos resultados muestran que el EF-Tu metilado presenta una mucho mayor actividad GTPásica que el EF-Tu submetilado (tanto el EF-TuM como el EF-TuE). Sin embargo, la disminución de la hidrólisis del GTP observada en el EF-Tu submetilado podría deberse a una inhibición de la disociación del GDP o de la asociación del GTP en las condiciones del ensayo.

El ensayo de GTPasa requiere de un recambio de nucleótidos para la hidrólisis, durante el cual las velocidades de disociación del GDP y de asociación del GTP podrían estar afectando la velocidad de hidrólisis del GTP. Se ha demostrado que el paso de hidrólisis del GTP es la velocidad limitante durante el recambio de la hidrólisis del GTP mediado por EF-Tu·kirromicina (Fasano, O. y col., 1978). Como la asociación del GTP es un proceso

Figura 27.- Efecto de la metilación del EF-Tu sobre la actividad GTPásica del factor.

Se midió el efecto, después de 60 min de incubación a 37°, de varias concentraciones de aa-tRNA sobre la actividad GTPásica de 100 pmoles de EF-TuL (○—○), EF-TuM (■—■) y del EF-TuE (△—△) en presencia de Kirromicina 50 μM y 6 nmoles de ³HGTP (10 Ci/mmol) en un volumen final de 40 μl. El GTP hidrolizado se determinó de la radiactividad obtenida en el GDP aislado mediante cromatografía en placa fina de poliiminocelulosa. Para mayores detalles sobre el procedimiento ver Materiales y Métodos.



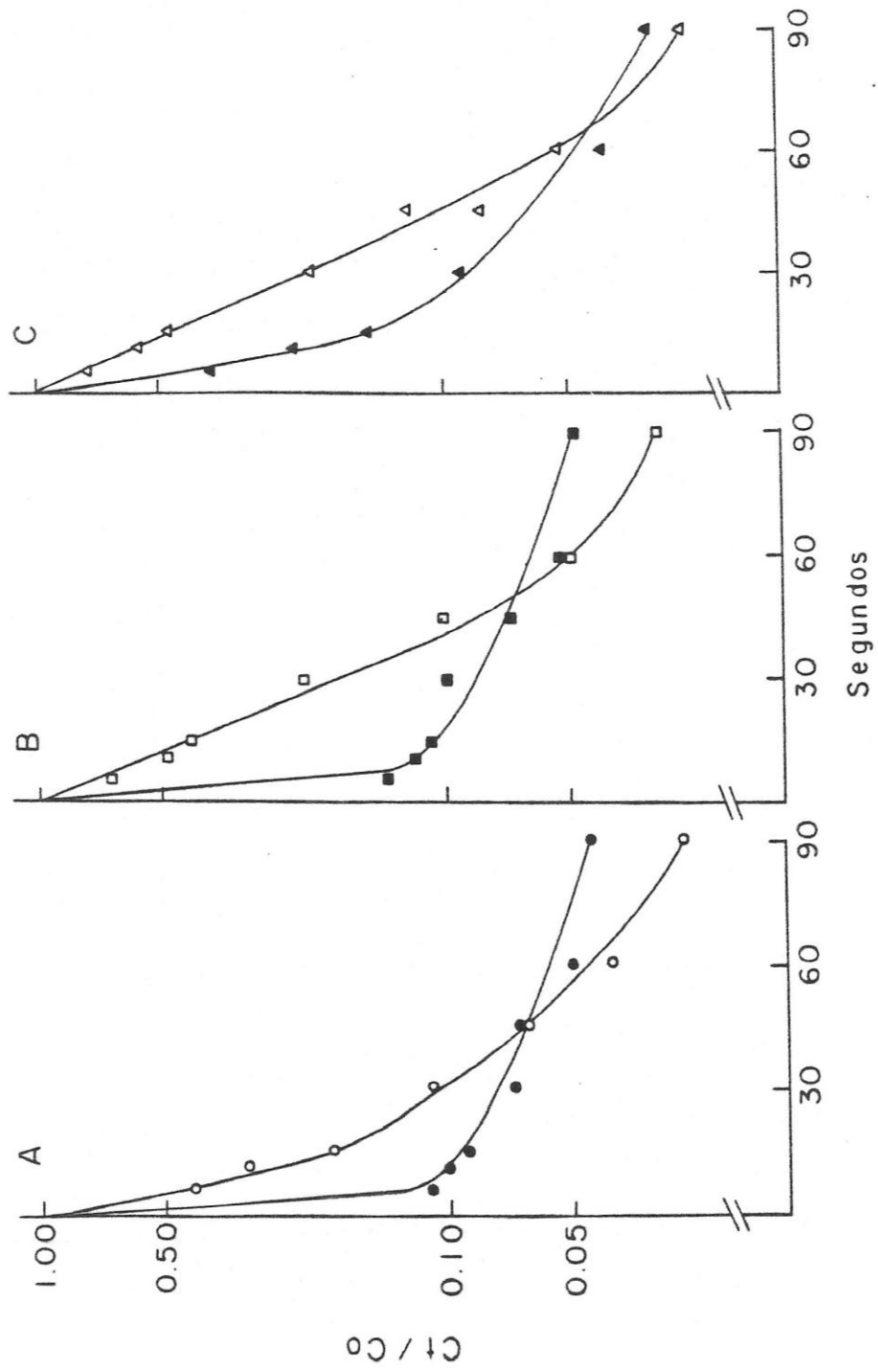
extremadamente rápido y por ello difícil de medir, se escogió determinar la velocidad de disociación del GDP para el EF-Tu metilado y submetilado en las condiciones del ensayo de GTPasa, tanto en presencia como en ausencia de kirromicina.

Los resultados presentados en la figura 28 muestran que la velocidad de disociación del GDP a partir del EF-Tu, a 37°, se encuentra aumentada en ausencia de kirromicina para los tres tipos de EF-Tu, cuando se comparan estos resultados con los del intercambio de GDP a 0° (figura 25), como era de esperarse. Por ejemplo, a 0° el EF-TuM intercambió aproximadamente un 50 % del GDP a los 5 seg. En cambio a 37° (figura 28) a este mismo tiempo se ha intercambiado un 90 % del ³HGDP. La figura 28 muestra que el antibiótico inhibe la disociación del ³HGDP en todas las preparaciones de EF-Tu empleadas, de modo que la disminución de la hidrólisis del GTP observada en el EF-Tu submetilado no se debe a una inhibición de la disociación del GDP.

Además esta inhibición del intercambio de GDP observada en estas condiciones confirma nuestra suposición previa que las preparaciones de EF-Tu contienen EF-Ts, ya que sólo en presencia de EF-Ts la kirromicina inhibe la velocidad de disociación del GDP del EF-Tu (Doglass, J. y Blumenthal, T., 1979; Fasano, O. y col., 1978).

Figura 28.- Efecto de la kirromicina sobre la disociación del GDP del EF-Tu a 37°.

Se midió la disociación del $^3\text{HGDP}$ del EF-TuL (\circ, \bullet), el EF-TuM (\square, \blacksquare) y el EF-TuE (Δ, \blacktriangle) en ausencia ($\bullet, \blacksquare, \blacktriangle$) o en presencia (\circ, \square, Δ) de kirromicina $50 \mu\text{M}$. La concentración de EF-Tu fue $2,5 \mu\text{M}$. Las condiciones del amortiguador fueron las mismas que se usaron para el ensayo de actividad GTPasa (ver Materiales y Métodos). La disociación del GDP se midió como se describió en Materiales y Métodos.



4.- DISCUSION

4.1.- Metilación del factor de elongación EF-Tu en varios microorganismos

Previamente se ha demostrado en nuestro laboratorio que la metilación de las proteínas ribosomales en eubacterias presenta un alto grado de conservación, ya que esta modificación se produce casi en su totalidad en proteínas que son estructural y funcionalmente homólogas, es decir, en aquellas que cumplen el mismo papel en el aparato traduccional de los distintos microorganismos estudiados (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984). Por otra parte, se sabe que el factor IF-3 también es metilado en *E. coli* (Brauer, D. y Wittmann-Liebold, B., 1977).

El factor de elongación EF-Tu, que es un componente esencial del aparato traduccional, se ha encontrado metilado no sólo en bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium* (Ohba, M. y col., 1979; Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979). Como se ha demostrado en este trabajo, tanto el EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis* como posiblemente el factor de la bacteria termofílica *B. stearothermophilus* son metilados.

No se conoce aún la secuencia del EF-Tu del *B. stearothermophilus*. Sin embargo, existe una alta similitud

entre la composición de aminoácidos del factor EF-Tu del *B. stearothermophilus* y la del EF-Tu de *E. coli* (Jonák, J. y col., 1986; Wittinghofer, A. y Leberman, R., 1976). Además, es posible que el EF-Tu del *B. stearothermophilus* (bacteria Gram positiva) posea una lisina equivalente a la lisina-56 presente en el EF-Tu de *E. coli*, ya que Wittinghofer (Wittinghofer, A. y col., 1980) al tratar el factor EF-Tu de *B. stearothermophilus* con tripsina encontró un fragmento A₁ equivalente al que se obtiene cuando el EF-Tu de *E. coli* es tratado con la misma proteasa. En el caso del EF-Tu de *E. coli*, la proteólisis se produce por la acción de la tripsina sobre el enlace peptídico lisina(56)-alanina(57). Esto sugiere que ambos factores de elongación presentan una secuencia polipeptídica similar en esta región. Sin embargo, sería necesario efectuar un estudio más detallado para confirmar la presencia de grupos metilo en el EF-Tu de *B. stearothermophilus*.

En el EF-Tu de *B. subtilis*, no fue posible establecer la presencia de la metilación a pesar que en este último microorganismo el patrón de metilación de las proteínas ribosomales, determinadas previamente, mostró un alto grado de similitud con el de *E. coli* (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984; Mardones, E. y col., 1980). La falta de metilación en este microorganismo Gram positivo, podría deberse a la falta de una lisina metilable equivalente a la Lis-56 de *E. coli*.

Alternativamente, el *B. subtilis* podría no contener la metiltransferasa específica para el factor. Sin embargo, la primera posibilidad es más factible, ya que el factor EF-Tu de *B. subtilis* no se metiló en presencia de extractos de *E. coli* (Toledo, H. y Jerez, C. A., resultados no mostrados).

Recientemente Stock y colaboradores (Stock, A. y col., 1987), comparando la secuencia del sitio de metilación presente en diferentes proteínas que se modifican post-traduccionalmente en varios organismos, sugirieron que se podría establecer la especificidad y los posibles tipos de enzimas metilantes involucradas en la modificación de ellas a partir del análisis de su secuencia. De esta forma, se podría eventualmente predecir si una proteína estaría sujeta a metilaciones.

Al comparar las secuencias de aminoácidos para el factor EF-Tu en diferentes especies en las que ha sido descritas (Toledo, H. y col., 1988), encontramos que el factor EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis* presenta una región en su secuencia primaria que posee un 85 % de aminoácidos idénticos a los de la misma región que contiene la lisina-56 metilada en el factor de *E. coli*. Esta secuencia del EF-Tu de cloroplasto también contiene un residuo de lisina en la posición 56. Esto nos indujo a predecir la metilación del factor EF-Tu de cloroplasto de *E. gracilis* (Toledo, H. y col., 1988) y nuestros resultados

así lo confirmaron, demostrando la presencia de lisina metilada en el factor EF-Tu de cloroplasto. Sin embargo, habría que demostrar si esta lisina modificada se encuentra efectivamente en la posición 56.

Anteriormente encontramos que el ribosoma de cloroplasto presenta un patrón de metilación de tipo eubacteriano (Sanhueza, S., 1987; Toledo, H. y col., 1988), lo que en cierto modo estaría de acuerdo con el posible origen endosimbiótico para el cloroplasto (Gray, M. W. y Doolittle, W. F., 1982), el cual se ha postulado en gran medida debido al gran número de características de tipo bacteriano que presentan los ribosomas de cloroplasto (Gray, M. W. y Doolittle, W. F., 1982; Gurevitz, M. y col., 1977; Bingham, S. y Schiff, J. A., 1979; Koller, B. y Delius, H., 1984; Bartsh, M. y col., 1982). Los resultados de metilación del EF-Tu de cloroplasto comparados con los de *E. coli* también estarían dentro de este mismo contexto.

El factor de elongación EF-Tu de otras especies también presenta una región que posee un alto grado de conservación con la región del EF-Tu de *E. coli* que contiene la lisina-56, que se metila (Tabla IV). Sin embargo, la lisina-56 presente en los factores EF-Tu de *E. coli* y de cloroplasto de *E. gracilis*, ha sido reemplazada en todas ellas por una arginina. Se ha descrito la presencia de argininas metiladas en una variedad de proteínas tanto en

Tabla IV

Comparación del sitio de metilación *in vivo* del factor de elongación EF-Tu de *E. coli*, con secuencias similares de los factores equivalentes de varios organismos

<i>E. coli</i>	48- 64:	Q I D N A P E E [*] K A R G I T I N T
<i>E. gracilis</i> (cloroplasto)	48- 64:	D I D S A P E E K A R G I T I N T
<i>Saccharomyces</i> (mitocondria)	85-101:	A I D K A P E E R A R G I T I S T
<i>Methanococcus</i>	59- 75:	V M D G L K E E R E R G V T I D V
<i>T. thermophilus</i> HB8	48- 64:	D I D K A P E E R A R G I T I N T
<i>Micrococcus luteus</i>	51- 67:	T I D S A P E E R Q R G I T I N I
<i>Saccharomyces</i>	59- 75:	V L D K L K A E R E R G I T I D I
<i>Artemia salina</i>	59- 75:	V L D K L K A E R E R G I T I D I

Con asterisco (*) se indica la lisina-56 metilada en *E. coli*

Las secuencias indicadas fueron tomadas de: *E. coli* (Laursen, R. A. y col., 1981), cloroplasto de *E. gracilis* (Montandon, P. E. y Stutz, E., 1983), mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae* (Nagata, S. y col., 1983), *Methanococcus vannielii* (Lechner, K. y Bock, A., 1987), *T. thermophilus* HB8 (Scidler, B. y col., 1987), *Micrococcus luteus* (Ohama, T. y col., 1987), *Saccharomyces cerevisiae* EF-1 α (Nagata, S. y col., 1984), *Artemia salina* EF-1 α (Lenstra, J. A. y col., 1986).

procariontes como en eucariontes (Paik, W. K y Kim, S., 1971; Wold, F., 1981). Sin embargo, no existen antecedentes que indiquen que esta arginina es metilada en los factores EF-Tu de los distintos organismos, que se señalan en la tabla IV.

La Lis(Me) es un aminoácido levemente más básico que la lisina y por esto es más parecido a la arginina. Sin embargo, la Lis(Me₂) aparentemente disminuiría la basicidad del grupo ϵ -amino de la lisina (Paik, W. K. y Kim, S., 1980). En el EF-Tu de *E. coli* se han encontrado ambos tipos de lisinas modificadas, Lis(Me) y Lis(Me₂) (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979; Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985; van Noort, J. M., 1986), y la cantidad de Lis(Me₂) aumenta hacia la fase estacionaria del cultivo de la bacteria (van Noort, J. M., 1986). Siendo la Lis(Me) similar a la arginina en sus propiedades de carga y potencialidad para formar enlaces de hidrógeno, es posible que el reemplazo del aminoácido metilado por la arginina mantenga las propiedades químicas y funcionales de la proteína.

Esto es particularmente claro en el caso de la trimetilación de la lisina-115 en la calmodulina, donde se comprobó que, mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida, el reemplazo de la Lis(Me₃)-115 por arginina y no por lisina (no modificada) mantiene la función de la proteína (Roberts, D. M. y col., 1986). Así, la

calmodulina arginina-115 mantuvo su máxima capacidad de activar la NAD quinasa al igual que la calmodulina Lis(Me₃)-115. En cambio, la calmodulina lisina-115 no metilada, posee una mayor capacidad de activación de la enzima (Roberts, D. M. y col., 1986).

Los estudios comparativos de la metilación del EF-Tu realizados en esta tesis sugieren un cierto grado de conservación para la metilación del factor de elongación EF-Tu en algunas bacterias y en cloroplastos, aunque esta modificación parecería ser menos conservada que en el caso de la metilación de las proteínas ribosomales (Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1984). Por otra parte, el factor EF-1 α , el factor de elongación eucariótico equivalente al EF-Tu de los procariontes, también ha sido descrito como altamente metilado en varias especies (Amons, R. y col., 1983; Hiatt, W. R. y col., 1982; Nagata, S. y col., 1984; Lenstra, J. A. y col., 1986; van Hemert, F. J. y col., 1983), aunque esta modificación ocurre en secuencias diferentes a la de *E. coli*, indicando que las enzimas metiltransferasas serían diferentes (Toledo, H. y col., 1988).

Todos estos resultados, junto a otros antecedentes que se discutirán más adelante, nos sugieren un posible papel importante para la metilación de las proteínas del aparato traduccional.

4.2.- Sistemas para la metilación in vitro del factor EF-Tu de E. coli

Con el propósito de contar con un ensayo definido que permitiera estudiar la metilación *in vitro* del factor EF-Tu y además caracterizar la enzima responsable de esta modificación, se desarrolló un sistema dependiente de DNA, empleando para ello el DNA del fago λ rif^d18 que contiene el gen *tufB* que porta la información para el EF-TuB. En este ensayo se logró no sólo sintetizar de novo el factor de elongación EF-Tu, sino que también se obtuvo por primera vez la metilación *in vitro* de la proteína en forma bastante eficiente (Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985), demostrándose que se modificó un 33 % del factor sintetizado. Este resultado fue similar a los encontrados para la metilación *in vivo* del EF-Tu en presencia de cloramfenicol (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979; L'Italien, J. J. y Laursen, R., 1979).

Más aún, el análisis de los aminoácidos metilados del EF-Tu sintetizado y metilado *in vitro* permitió identificar Lis(Me) y Lis(Me₂) en aproximadamente iguales proporciones. Este resultado está en estrecho acuerdo con el obtenido para la metilación *in vivo* en presencia de cloramfenicol (Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979), señalando además que el EF-Tu sintetizado en el sistema

dependiente de DNA se estaría metilando de la misma forma que el EF-Tu *in vivo*.

En las condiciones del sistema dependiente de DNA no fue posible separar la síntesis de la metilación del factor de elongación EF-Tu, ya que este sistema está constituido por fracciones crudas de extractos obtenidos de *E. coli*, como se describe en Materiales y Métodos. Por estos motivos se desarrollaron dos sistemas que permitieron tener el EF-Tu submetilado artificialmente a partir de células que se cultivaron en condiciones limitantes para la metilación o en presencia de etionina.

Ambos sistemas mostraron ser completamente dependientes de la presencia del sustrato submetilado. Al igual que en el sistema dependiente de DNA, en estos sistemas también se obtuvieron péptidos inmunoprecipitables, con suero antiEF-Tu, de menor peso molecular que el EF-Tu, los cuales compitieron con él, en la reacción de inmunoprecipitación, señalando su identidad con el factor de elongación EF-Tu. Estos péptidos de menor peso molecular pueden ser generados por proteólisis como lo sugieren nuestros resultados

El análisis de los aminoácidos obtenidos de la hidrólisis del EF-Tu metilado *in vitro*, a partir de células crecidas en presencia de etionina, mostró la presencia de Lis(Me) y Lis(Me₂) (resultado no presentado),

de modo que el EF-Tu submetilado artificialmente también se estaría metilando como *in vivo*.

Mediante estos sistemas por lo tanto, pusimos en evidencia no sólo la metilación *in vitro* del factor de elongación EF-Tu de *E. coli* sino que también la del factor EF-Tu de cloroplasto de *E. gracilis*. Esto nos permitió asegurar la presencia de una enzima metiltransferasa de EF-Tu no sólo en *E. coli* sino que en los cloroplastos de *E. gracilis*.

Con estos últimos ensayos de metilación se intentó caracterizar la enzima responsable de la metilación utilizando como sustrato el factor de elongación EF-Tu purificado, mediante los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. Encontramos que la actividad metiltransferasa era altamente inestable, como ha sido descrito anteriormente para otras N-metiltransferasas. Por otra parte, no se pudo obtener una metilación *in vitro* eficiente del factor EF-Tu purificado, ni aún cuando se utilizaron extractos crudos de *E. coli*, como fuente de actividad metilante.

Una posible explicación a esta incapacidad de metilar el EF-Tu purificado puede deberse a la inestabilidad que presentaron las metiltransferasas o que los extractos utilizados para purificar la enzima eran los obtenidos de células crecidas hasta la fase estacionaria. De acuerdo a

los resultados de la capacidad metilante del factor EF-Tu que tiene la *E. coli* durante sus distintas fases del desarrollo, las enzimas metilantes podrían estar menos activas o inactivas en la fase estacionaria, ya que en esta etapa del crecimiento de la bacteria, el EF-Tu se encuentra totalmente metilado. Esto podría de algún modo ser una señal que implique la disminución de los niveles de la enzima metilante o la inactivación de ella. De acuerdo con esta idea, cuando se suplementaron los ensayos de metilación *in vitro*, en los cuales se utilizó tanto extractos de células crecidas en condiciones limitantes de metionina como en presencia de etionina, con S150 obtenido de células crecidas hasta la fase estacionaria tardía del crecimiento, no se obtuvo una estimulación de la cantidad de EF-Tu metilado.

Por otra parte, no se utilizaron extractos de células más jóvenes en los experimentos de metilación *in vitro* ya que no fue posible separar el sustrato endógeno de estos, es decir, el EF-Tu submetilado que se encuentra presente en estos extractos, de la actividad metiltransferasa. Al intentar purificar la actividad metilante, se consiguió sólo una fracción obtenida mediante saturación con sulfato de amonio, entre 35 y 65 %, que contenía tanto la actividad como el sustrato. Debido a la inestabilidad de las enzimas metilantes ya mencionada, la actividad metilante del

EF-Tu se perdió en las siguientes etapas de purificación que se intentaron.

Como en estos sistemas no fue posible estudiar en detalle el papel de la metilación en la función del EF-Tu, se aisló el factor EF-Tu en distintas etapas del crecimiento de la bacteria, ya que ciertas evidencias indicaban que el EF-Tu variaba su grado de metilación durante su desarrollo (L'Italien, J. J. y Laursen, R. A., 1979).

4.3.- Efecto de la metilación del EF-Tu sobre su estructura y actividad

Nuestros resultados muestran que el grado de metilación *in vivo* del factor de elongación EF-Tu de *E. coli* varía en las distintas etapas del crecimiento de la bacteria, alcanzándose la máxima incorporación de grupos metilo hacia la mitad de la fase logarítmica de crecimiento, en las condiciones del ensayo. Este resultado está de acuerdo con el obtenido por van Noort y col. (van Noort y col., 1986), quienes midiendo la cantidad de lisina metilada del EF-Tu, en diferentes etapas del crecimiento de *E. coli*, encontraron que durante la fase logarítmica, la lisina-56 se va gradualmente modificando como Lis(Me) y cuando las células comienzan a entrar en la fase estacionaria, la Lis(Me) es

estructura, provocando una disminución en la velocidad de intercambio de GDP, con lo cual se disminuiría la actividad GTPásica del factor EF-TuE. Sin embargo, la velocidad de disociación del GDP, en presencia de kirromicina y a 37°, no estaría afectada en el EF-TuE, porque cuando se compara el intercambio del nucleótido de este factor con el intercambio del EF-TuM se pudo observar que ambos factores presentaron la misma velocidad de intercambio de GDP (figura 28). Por este motivo, es probable que la menor actividad GTPásica del EF-TuE se deba más bien a la submetilación, como en el caso del EF-TuM, más que a la presencia de las etioninas en su estructura.

Nuestros resultados respecto de la actividad GTPásica están en desacuerdo con los informados por van Noort (van Noort, J. M. y col., 1986), quienes encontraron que la actividad GTPásica se encuentra disminuida por la metilación del EF-Tu. Actualmente no tenemos una explicación para esta diferencia, ya que hemos empleado las mismas cepas de *E. coli* gentilmente donadas por estos autores y sus mismas condiciones tanto para las preparaciones como para los ensayos (van Noort, J. M. y col., 1986). Ciertamente, será necesario efectuar otros estudios más detallados para establecer la verdadera función de la metilación del factor EF-Tu. Sin embargo, la siguiente especulación final

La modificación de las proteínas ribosomales y del EF-Tu de *E. coli* es también aparentemente una función del crecimiento de la bacteria desde la fase exponencial a la fase estacionaria y que en forma similar a lo observado en el *M. racemosus* también existe un aumento de la actividad del EF-Tu, lo que se correlaciona con un aumento del grado de metilación de la molécula durante el desarrollo de las células.

Aunque se ha demostrado que el paso de hidrólisis del GTP es la velocidad limitante durante la hidrólisis del nucleótido mediada por EF-Tu y kirromicina (Fasano, O. y col., 1978), probamos si la disociación del GDP se encontraba afectada en las condiciones del ensayo, ya que la inhibición en la disociación del GDP podría dar cuenta de la menor actividad GTPásica. Sin embargo, al estudiar esta actividad observamos que la disociación del GDP estaba inhibida no sólo en el EF-TuL sino que también en el EF-TuM, de modo que la menor actividad GTPásica observada en el EF-TuM no se debería a una inhibición en la disociación del GDP, ya que ésta se encuentra afectada en presencia de la kirromicina en ambos factores.

El factor EF-TuE comparado con el EF-TuL, también mostró una menor actividad GTPásica. Esto se podría deber a la falta de metilación del EF-TuE o a la incorporación de etioninas, que como ya hemos comentado, alterarían su

99-108 que también están formando parte del sitio de unión de GDP. Por lo tanto, se puede especular acerca de la existencia de una modificación de las propiedades de unión del GDP al EF-TuE si se considera que la incorporación de las etioninas, al introducir un grupo metileno (-CH₂-) adicional, estaría provocando una alteración estérica en la estructura del sitio de unión del nucleótido.

Al estudiar la actividad de hidrólisis del GTP que presenta el EF-Tu, inducida por kirromicina y estimulada por aaRNA, encontramos una clara evidencia que la metilación in vivo del EF-Tu afecta la hidrólisis del GTP, de modo que el EF-TuL, metilado, presentó una mayor actividad GTPásica que el EF-TuM, submetilado. En este sentido, se ha descrito que el factor EF-1 α es altamente metilado en varios organismos (Amons, R. y col., 1983; Hiatt, W. R. y col., 1982; Nagata, S. y col., 1984; Lenstra, J. A. y col., 1986; van Hemert, F. J. y col., 1983) y en el caso del *M. racemosus* se ha observado que durante la germinación del hongo, desde su estado de espora, existe un aumento de la actividad del factor EF-1 α que está acompañada de un incremento en la metilación de la molécula, insinuándose que la actividad del EF-1 α es regulada por la metilación post-traducciona que sufre el factor (Fonzi, W. y col., 1985; Hiatt, W. R. y col., 1982; Linz, J. E. y col., 1986).

células crecidas en presencia de metionina (figuras 25 y 28).

Esta diferente capacidad del EF-TuE de intercambiar el GDP y el GTP aparentemente no se debería a la falta de metilación, ya que cuando se le compara con el factor submetilado, EF-TuM, éste no presenta la misma conducta del primero. Al cuantificar el GDP unido al factor EF-TuE purificado y el GDP unido al factor EF-TuL o EF-TuM, purificados, se pudo establecer que el EF-TuE une 50 % más GDP que los otros factores (Tabla III).

Estas observaciones sugieren que la diferencia en cuanto a la capacidad de unir GDP del EF-TuE se podría deber más bien, a una posible alteración de la estructura de esta molécula, producto de la incorporación de las etioninas en lugar de las metioninas. La introducción del análogo de aminoácido causaría un cambio conformacional en el EF-Tu, de forma tal, que afectaría el sitio de unión del nucleótido. Esta es una idea plausible, ya que al analizar la secuencia de aminoácidos implicados en el sitio de unión del GDP al EF-Tu, se puede apreciar la existencia de una metionina en la posición 139 de la región comprendida entre los aminoácidos 128-140 (Birnbaumer, L. y col., 1987; Junnak, F., 1985). Existen además tres metioninas en las posiciones 91, 98 y 112, que están próximas a la regiones 79-87 y

factor EF-Tu, debido a que este aminoácido estaría próximo al sitio de unión del nucleótido.

La disociación del GDP es el paso limitante en el intercambio GDP-GTP, tanto en ausencia como en presencia del factor de elongación EF-Ts (Fasano, O. y col., 1978). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que no existe diferencia en la velocidad de disociación tanto del GDP como del GTP entre el EF-TuL, metilado, y el EF-TuM, submetilado, aun en presencia de EF-Ts, observación que está de acuerdo con los estudios realizados por van Noort (van Noort, J. M. y col., 1986). Este igual comportamiento, frente a la disociación de los nucleótidos del factor EF-TuL como del EF-TuM, indica que la interacción entre los factores de elongación EF-Tu y EF-Ts al igual que los efectos conformacionales que el EF-Ts produce sobre el EF-Tu probablemente no serían afectados por la metilación de la lisina-56.

Las proteínas en las que se reemplazan las metioninas por etionina aparentemente no presentarían alteraciones en sus funciones (Alix, J. H., 1982). Sin embargo, el factor de elongación EF-Tu obtenido de células crecidas en presencia de etionina, EF-TuE, posee una distinta capacidad de intercambio de GDP medida tanto a 0° como a 37° y de GTP medida a 0°, cuando se le compara con el factor obtenido de

varios organismos, la cual protegería a la calmodulina de la acción de esta proteasa (Marshak, D. R. y col., 1984). Del mismo modo, existe una línea de evidencias que sugiere que la metilación de residuos N-terminales protegerían a las proteínas del ataque por aminopeptidasas celulares (Stock, A. y col., 1987).

Por otro lado, van Noort y col. no observaron diferencias en el tratamiento del EF-Tu metilado y submetilado cuando trataron ambos factores con tripsina (van Noort, J. M. y col., 1986). Esta contradicción con nuestros resultados se puede deber a que estos autores emplearon una mayor cantidad de proteasa, lo cual pudo enmascarar el efecto protector que el grupo metilo le imprimiría a la molécula de EF-Tu.

Aunque la posición de la lisina-56 no se ha podido definir en la estructura terciaria del factor, debido a que los cristales que se utilizan para los estudios de difracción de rayos X se obtienen con el EF-Tu tratado con tripsina, que pierde el segmento comprendido entre el aminoácido 44 y el 58 (Junnak, F., 1985), es posible que este segmento se encuentre por sobre el dominio II conectando el dominio I con el III (ver figura 2). Esto es importante de señalar porque la modificación de la lisina-56 podría afectar de alguna forma la actividad del

EF-TuE, ambos submetilados, cuando también son tratados con tripsina. Estos últimos son más susceptibles a la degradación por tripsina (figuras 23 y 24). Esta diferente conducta de los factores metilado y submetilado se podría explicar por la alteración que sufriría el enlace peptídico Lis56-Ala57 cuando la lisina-56 está metilada, de modo que la especificidad de la enzima se vería afectada.

Nuestro resultado está de acuerdo con el obtenido por Wittinghofer y col. (Wittinghofer, A. y col., 1980), quienes encontraron que durante el ataque inicial de la tripsina al factor EF-Tu nativo se producían varios polipéptidos por la presencia de tres sitios adyacentes susceptibles de ser sustrato para la enzima (arginina-44, arginina-58 y lisina-56) y que uno de ellos, el enlace peptídico Lis56-Ala57, se hidrolizó a menor velocidad que los otros dos enlaces peptídicos. Los autores explicaron este hecho debido a que el enlace peptídico del cual la Lis(Me) forma parte sería hidrolizado más lentamente y que cuando el enlace peptídico está formado con la Lis(Me₂), este no sería completamente hidrolizado.

Existen además, otras evidencias que apoyan el efecto protector de la metilación frente a la digestión con tripsina. Es el caso de la lisina-115 en la estructura primaria de la calmodulina, que se encuentra metilada en

Como se señaló en Materiales y Métodos, se purificó el factor de elongación EF-Tu, en forma preparativa, de células crecidas hasta la fase estacionaria tardía del crecimiento, con el propósito de obtener el factor completamente metilado en la lisina-56 (EF-TuL); de células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial del crecimiento, para obtenerlo submetilado (EF-TuM), y de células crecidas en presencia de etionina, para submetilarlo artificialmente (EF-TuE).

La metilación puede cambiar la carga neta del aminoácido modificado. Esta modificación de la carga de los aminoácidos metilados puede estar afectando la estructura conformacional de la molécula, hecho que ha sido discutido por Poncz y Dearborn, quienes sostienen que la tripsina no es capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico adyacente a un residuo de dimetillisina en dos péptidos de apomioglobina metilados reductivamente (Poncz, L. y Dearborn, D. G., 1983). Por otra parte, Paik y Kim, no encontraron diferencias significativas en la velocidad de hidrólisis triptica entre proteínas nativas y metiladas parcialmente (Paik, W. K. y Kim, S., 1980).

Nuestros resultados, sin embargo, mostraron que cuando el factor de elongación EF-TuL, metilado, es tratado con tripsina presenta una diferencia significativa en su velocidad de degradación frente a los factores EF-TuM o

convertida en Lis(Me₂) alcanzándose el máximo de metilación del EF-Tu al final de esta fase. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por L'Italien y Laursen, quienes encontraron que el EF-Tu contiene la lisina-56 como Lis(Me) y Lis(Me₂) (L'Italien, J. J. y Laursen, R. A., 1979).

En las condiciones de corta marcación *in vivo* empleadas en nuestros experimentos (figura 20), se observó una progresiva disminución de la incorporación de grupos metilo en el EF-Tu hacia la fase estacionaria, precisamente porque el factor estaría modificado en mayor grado en estas etapas del crecimiento celular.

Estos resultados y los ya mencionados (van Noort y col., 1986) muestran que existe una correlación entre el grado de variación de metilación de la lisina-56 del EF-Tu de *E. coli* y el período de crecimiento de la bacteria, lo cual sugiere una posible función biológica para la modificación post-sintética del factor.

En general, en otros casos se ha observado variación en la modificación de proteínas del aparato traduccional con las fases del crecimiento. Por ejemplo, la acetilación de la proteína ribosomal L7/L12 (Ramagopal, S. y Subramanian, A. R., 1974), sugiriendo que esta variación de la metilación del EF-Tu durante el crecimiento celular no es un evento aislado en el metabolismo de la bacteria.

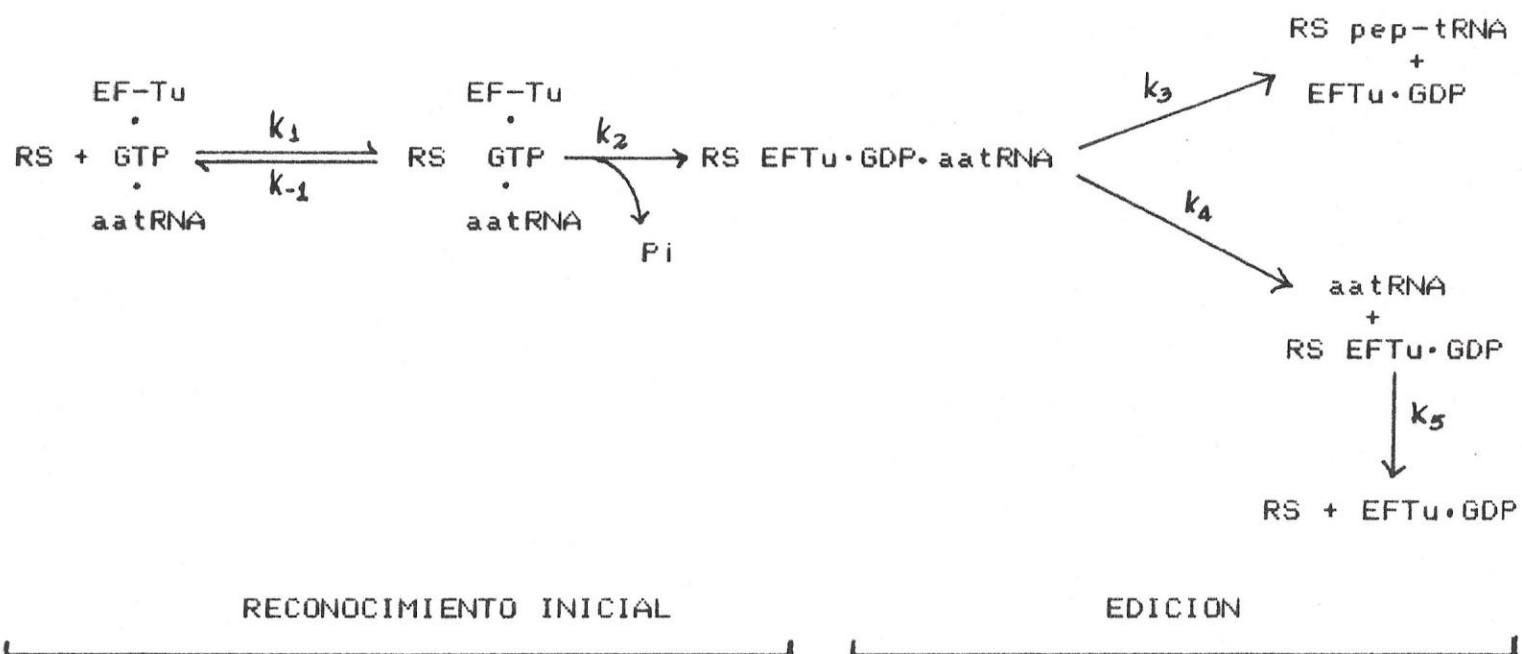
intentará correlacionar el aumento observado en la actividad GTPasa del factor EF-Tu metilado con alguna posible función celular. Para ello supondremos que esta mayor actividad GTPasa observada *in vitro* también podría ocurrir *in vivo*.

Como ya hemos visto, el mayor grado de metilación del factor EF-Tu ocurre hacia el final de la fase tardía de crecimiento de la bacteria. En esta etapa se tiene, en general, un aumento de las modificaciones post-sintéticas de la célula (Ramagopal, S. y Subramanian, A. R., 1974; van Noort, J. M. y col., 1986). También se ha sugerido que en esta etapa la *E. coli* podría mostrar un proceso similar al "envejecimiento" en el que probablemente, entre otros factores, el número de errores en la síntesis proteica podría aumentar (Harman, D., 1981). Como ya lo mencionáramos, el EF-Tu desempeña un importante papel en la fidelidad de la síntesis proteica.

La selección del aa-tRNA por un ribosoma programado con un mRNA, se realiza de acuerdo a un mecanismo que se desarrolla en dos etapas (figura 29). Primero, el complejo ternario, EF-Tu·GTP·aa-tRNA, se une al ribosoma (k_1) y luego puede ocurrir la disociación de este complejo ternario (k_{-1}), o la hidrólisis del GTP (k_2), en una etapa llamada de reconocimiento inicial en la que la interacción codón-anticodón es importante. A continuación, mediante

Figura 29.- Mecanismo de edición

El esquema representa el mecanismo mínimo por el cual el aa-tRNA es incorporado a una cadena de proteína que se está sintetizando. RS, ribosomas; pep-tRNA, peptidil-tRNA.



un proceso llamado de "proofreading" o edición, se produce una segunda etapa de control destinada a verificar si el aaRNA unido es el correcto. Así, el aaRNA es aceptado incorporándolo a la cadena de proteína naciente (k_3), o se disocia del ribosoma (k_4) (Thompson, R., 1988; Thompson, R. y col., 1986; Thompson, R. y Karim, A. M., 1982). De este modo, en esta segunda etapa se corrigen todos los errores cometidos en el primer paso de reconocimiento (Hopfield, J. J., 1974).

Sin embargo, una disminución en la velocidad de hidrólisis del GTP produce un aumento considerable en la fidelidad para discriminar entre un complejo ternario correcto y uno incorrecto (Thompson, R. y Karim, A. M., 1982). Por otro lado, la constante de velocidad para la hidrólisis del GTP y la disociación del EF-Tu·GDP está determinada exclusivamente por la interacción del EF-Tu con el ribosoma y es independiente del aaRNA, en contraposición a la fuerte dependencia de la naturaleza del aaRNA que determina el valor de la constante de velocidad para la disociación del complejo ternario del ribosoma (Thompson, R. y col., 1986).

Una mayor fidelidad en la traducción implica necesariamente una menor velocidad de síntesis de proteína (Thompson, R. y Karim, A. M., 1982). Sin embargo, al aumentar la actividad GTPásica disminuiría el tiempo

empleado por el sistema para el período de reconocimiento inicial, provocando un aumento en la velocidad de la síntesis. Además, esta mayor hidrólisis del GTP se traduce en que el EF-Tu·GDP se disocia más rápidamente del ribosoma, con lo cual la etapa de "proofreading" sería la única instancia de control en la fidelidad de la traducción con lo que la fidelidad sería menor.

La fidelidad tiene un costo definido para la célula en términos de velocidad (Thompson, R. C. y Dix, B. D., 1982; Thompson, R. C. y Karim, A. M., 1982) o de eficiencia (Bohman, K. y col., 1984) de la síntesis de proteínas. Así es concebible que la célula pueda encontrar ventajoso alterar la fidelidad de la traducción para obtener un balance de velocidad y fidelidad que le permita adaptarse a las condiciones ambientales. En este sentido es importante recalcar que el EF-Tu y los ribosomas se modifican post-traduccionalmente, por lo tanto no es difícil imaginar que la N-metilación que sufre el EF-Tu podría estar jugando un papel en la capacidad del factor de formar el complejo con el aa-tRNA, los ribosomas y el mRNA de modo de facilitar la hidrólisis del GTP.

La mayor actividad GTPasa observada en este trabajo explicaría en parte que se produjera una menor fidelidad en la síntesis proteica durante la fase post-exponencial del crecimiento de la *E. coli*. En la etapa logarítmica de

crecimiento los microorganismos se encuentran en activa síntesis de proteínas y es precisamente en este período, cuando se requiere que los mecanismos de control de la fidelidad de la traducción funcionen más eficientemente.

4.4.- Conclusiones

1. Los estudios comparativos de la metilación del factor de elongación EF-Tu en distintos organismos nos indicaron un cierto grado de conservación para la metilación del factor de algunas bacterias y de los cloroplastos, lo que sugiere junto con datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio un posible papel importante para la metilación de las proteínas del aparato traduccional.
2. Desarrollamos varios sistemas para estudiar la metilación *in vitro* del EF-Tu de *E. coli*. Con estos sistemas se obtuvo por primera vez la síntesis eficiente y la metilación del EF-Tu. Además, estos sistemas permitieron poner en evidencia la metilación *in vitro* del factor EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis* y asegurar la presencia de metiltransferasas de EF-Tu en *E. coli* y en cloroplastos. Estas metiltransferasas no pudieron ser caracterizadas en detalle debido a su alta inestabilidad.
3. Encontramos diferencias significativas en la velocidad de degradación por tripsina de las preparaciones purificadas de EF-Tu de *E. coli* metilado y submetilado. Estos resultados sugieren que la metilación de la lisina-56 del EF-Tu, que se encuentra en una región expuesta de la molécula, protegería a la molécula del ataque proteolítico. Esto

indica una posible función para la metilación del EF-Tu y posiblemente de otras proteínas.

4. Al medir la velocidad de disociación de los nucleótidos GDP y GTP en las distintas preparaciones de EF-Tu, esta pareció no estar afectada por la metilación. Sin embargo, la actividad GTPasa, que presenta el EF-Tu estimulada por aa-tRNA en presencia de kirromicina, se encontró significativamente aumentada cuando el EF-Tu estaba metilado. Este efecto de la metilación sobre la actividad GTPasa del EF-Tu podría tener una importancia fisiológica para la bacteria, ya que la actividad GTPasa está directamente correlacionada con la fidelidad en el proceso de traducción mediado por los ribosomas.

5. Finalmente, los estudios iniciados en esta tesis se podrán ampliar empleando mutantes condicionales para la actividad metiltransferasa, para la obtención del factor EF-Tu no metilado, o bien técnicas tales como la mutación sitio dirigida para obtener diferentes preparaciones puras de EF-Tu que no contengan la Lis-56 metilada. Por otra parte será de interés establecer en forma detallada mediante experimentos cinéticos la función que la metilación del factor EF-Tu puede tener sobre la fidelidad durante el proceso de traducción.

5.- BIBLIOGRAFIA

- Alix, J-H., 1982. Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, and analog of methionine. Microbiol. Rev. 46: 281-295.
- Alix, J-H. y Hayes, D., 1974. Properties of ribosomes and RNA synthesized by *Escherichia coli* grown in the presence of ethionine. III. Methylated proteins in 50S ribosomes of *E. coli* EA₂. J. Mol. Biol. 86: 139-159.
- Alix, J-H. y Hayes, D., 1983. Why are macromolecules modified post-synthetically? Biol. Cell. 47: 139-159.
- Allende, J. E., 1988. GTP-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems. FASEB J. 2: 2356-2367.
- Allende, J. E., Seeds, N. W., Conway, T. W. y Weissbach, H., 1967. Guanosine triphosphate interaction with an amino acid polymerization from *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 58: 1566-1573.
- Amaro, A. M., 1987. Metilación de las proteínas ribosomales en bacterias. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Amaro, A. M. y Jerez, C.A., 1984. Methylation of ribosomal proteins in bacteria: evidence of conserved modification of the eubacterial 50S subunit. J. Bacteriol. 158: 84-93.
- Amons, R., Pluijms, W., Roolbol, K. y Moller, W., 1983. Sequence homology between EF-1 α , the α - chain of elongation factor 1 from *Artemia salina* and elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 153: 37-42.
- An, G. y Friesen, J. D., 1980. The nucleotide sequence of tuf B and four nearby tRNA structural genes of *Escherichia coli*. Gene 12: 33-39.
- An, G., Lee, J. S. y Friesen, J. D., 1982. Evidence for an internal promoter preceding tufA in the str operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 149: 548-553.

- Arai, K., Clark, B. F. C., Duffy, L., Jones, M. D., Kaziro, Y., Laursen, R. A., L'Italien, J., Miller, D. L., Nagarkatti, S., Nakamura, S., Nielsen, K. M., Petersen, T. E., Takahashi, K. y Wade, M., 1980. Primary structure of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77: 1326-1330.
- Arai, K., Nakamura, S., Arai, T., Kawakita, M. y Kaziro, Y., 1976. Limited hydrolysis of the polypeptide chain elongation factor Tu by trypsin. Isolation and characterization of the polypeptide fragments. J. Biochem. 79: 69-83.
- Arai, K., Ota, Y., Arai, N., Nakamura, S., Henneke, C., Oshima, T. y Kaziro, Y., 1978. Studies on polypeptide chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. 1. Purification and some properties of the purified factors. Eur. J. Biochem. 92: 509-519.
- Avadhani, N. G. y Buetow, D. E., 1972. Isolation of active polyribosomes from the cytoplasm, mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. Biochem. J. 128: 353-365.
- Bartsch, M., Kimura, M. y Subramanian, A., 1982. Purification, primary structure, and homology relationships of a chloroplast ribosomal protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6871-6875.
- Beck, B. D., Arscott, P. G. y Jacobson, A., 1978. Novel properties of bacterial elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 1250-1254.
- Bingham, S. y Schiff, J. A., 1979. Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta. 547: 531-543.
- Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Vatani, A., Scherer, N., Toro, M-J. y Brown, A. M., 1987. Signal transduction by G proteins. Kidney Int. 32: S14-S37.
- Black, M. T., Meyer, D., Widger, W. R. y Cramer, W. A., 1987. Light-regulated methylation of chloroplast proteins. J. Biol. Chem. 262: 9803-9807.
- Blumenthal, T., Landers, T. A. y Weber, K., 1972. Bacteriophage Q β replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1313-1317.

- Boch, L., Kraal, B., van der Meide, P. H., Duisterwinkel, F. I. y van Noort, J. M., 1983. The elongation EF-Tu and its two encoding genes. Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 30:91-126.
- Bohman, K., Ruusala, T., Jelec, P.C. y Kurland, C. G., 1982. Kinetic impairment of restrictive streptomycin-resistant ribosomes. Mol. Gen. Genet. 198: 90-99.
- Brauer, D. y Wittmann-Liebold, B., 1977. The primary structure of the initiation factor IF3 from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 79: 269-275.
- Clark, B. F. C., 1980. The elongation step of protein biosynthesis. Trends Biochem. Sci. 5: 207-210.
- Clark, B. F. C., la Cour, T. F. M., Nielsen, K. M., Nyborg, J., Petersen, H. U., Siboska, G. E. y Wikman, F. P., 1984. Structure of bacterial elongation factor EF-Tu and its interaction with aminoacyl-tRNA. En: Gene expression, a Benzon Symposium 19. pp.127-148. B. C. F. Clark y H. U. Petersen, Munksgaard, Copenhagen.
- Cleveland, D. W., 1983. Peptide mapping in one dimension by limited proteolysis of sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. Meth. Enzymol. 96: 222-229.
- Conway, T. W., 1964. On the role of ammonium or potassium ion in amino acid polymerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 51: 1216-1220.
- Coppard, N. J., Clark, B. F. C. y Cramer, F., 1983. Methylation of elongation factor 1 α in mouse 3T3B and 3T3B/SV40 cells. FEBS Lett. 164: 330-334.
- Crechet, J-B., Canceill, D., Bocchini, V. y Parmeggiani, A., 1986. Characterization of the elongation factors from calf brain. 1. Purification, molecular and immunological properties. Eur. J. Biochem. 161: 635-645.
- Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatization of agarose and polyacrylamide beads. J. Biol. Chem. 245: 3059-3065.
- Chang, C. N. y Chang, F. N., 1974. Methylation of ribosomal proteins in vitro. Nature 251: 731-733.

- Chang, C. N. y Chang, F. N., 1975. Methylation of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. Nature and stiochiometry of methylated aminoacids in 50S ribosomal proteins. Biochem. 14: 468-477.
- Chang, F. N., Chang, C. N. y Paik, W. K., 1974. Methylation of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 120: 651-656.
- Chang, F. N., Navickas, I. J., Chang, C. N. y Dancis, B. M., 1976. Methylation of ribosomal proteins in HeLa cells. Arch. Biochem. Biophys. 172: 627-633.
- Chu, F., Miller, D. L., Schulz, T., Weissbach, H. y Brot, N., 1976. DNA-directed in vitro synthesis of elongation factor Tu. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73: 917-927.
- Douglass, J. Blumenthal, T., 1979. Conformational transition of protein synthesis elongation factor Tu induced by guanine nucleotide. Modulation by Kirromycin and elongation factor Ts. J. Biol. Chem. 254: 5383-5387.
- Duisterwinkel, F. J., Kraal, B., De Graaf, J. M., Talens, A., Bosch, L., Swart, G. W. M., Parmeggiani, A., La Cour, T. F. M., Nyborg, J. y Clark, B. F. C., 1984. Specific alterations of the EF-Tu polypeptide chain considered in the light of its three-dimensional structure. EMBO J. 3: 113-120.
- Fasano, O., Bruns, W., Crechet, J., Sander, G. y Parmeggiani, A., 1978. Modification of elongation-factor-Tu Guanine nucleotide interaction by Kirromycin. A comparison with the effect of aminoacyl-tRNA and elongation factor Ts. Eur. J. Biochem. 89: 557-565.
- Ferro-Luzzi, G. y Niakido, K., 1979. In vivo methylation of prokaryotic elongation factor Tu. J. Biol. Chem. 254: 9947-9950.
- Filer, D. y Furano, A. U., 1980. Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. J. Biol. Chem. 255: 728-734.
- Fonzi, W. A., Katayama, C., Laethers, T. y Sypherd, P. S., 1985. Regulation of protein synthesis factor EF-1 α in *Mucor racemosus*. Mol. Cel. Biol. 5: 1100-1103.

- Furano, A. V., 1975. Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 4780-4784.
- Furano, A. V., 1977. The elongation factor Tu coded by the *tufA* gene of *Escherichia coli* K-12 is almost identical to that coded by the *tufB* gene. J. Biol. Chem. 252: 2154-2157.
- Furano, A. V., 1978. Direct demonstration of duplicate *tuf* genes in enteric bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 3104-3108.
- Gilham, P. T., 1971. The covalent binding of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids to cellulose. Meth. Enzymol. 21: 191-197.
- Gray, M. W. y Doolittle, W. F., 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microbiol. Rev. 46: 1-42.
- Gurevitz, M., Kratz, H. y Ohad, I., 1977. Polypeptides of chloroplastic origin required for the development of photosystem II activity, and chlorophyll-protein complexes, in *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta. 461: 475-488.
- Hachmann, J., Miller, D. L. y Weissbach, H., 1971. Purification of factor Ts: studies on the formation and stability of nucleotide complexes containing transfer factor Tu. Arch. Biochem. Biophys. 147:457-466.
- Harman, D., 1981. The aging process. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 7124-7128.
- Hernández, F. Cannon, M. y Davies, J., 1978. Methylation of proteins in 40S ribosomal subunits from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 89: 271-275.
- Hiatt, W. R., Garcia, R., Merrick, W. C. y Sypherd, P. S., 1982. Methylation of elongation factor 1 α from the fungus *Mucor*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 3433-3437.
- Hudson, L., Rossi, J. y Landy, A., 1981. Dual function transcripts specifying tRNA and mRNA. Nature 294: 422-427.
- Hwang, Yu-Wen y Miller, D. L., 1987. A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein. J. Biol. Chem. 262: 13081-13085.

- Isono, K., 1980. En: Ribosomes, Structure, Function and Genetics. (Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Kahan, L. y Nomura, M., eds.) pp: 641-669, University Park Press Baltimore.
- Jacobson, G. R. y Rosenbusch, J. P., 1976. Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli*. Nature 261: 23-26.
- Jacobson, J. y Rosenbusch, J. P., 1977. Affinity purification of elongation factor Tu and Ts. FEBS Lett. 79: 8-10.
- Jaskunas, S. R., Fallon, A. M. y Nomura, M., 1977. Identification and organization of ribosomal protein genes of *Escherichia coli* carried by λ fus2 transducing phage. J. Biol. Chem. 252: 7323-7336.
- Jaskunas, S. R., Lindahl, L., Nomura, M. y Burgess, R. R., 1975. Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu in *E. coli*. Nature 257: 458-462.
- Jerez, C. A. y Weissbach, H., 1980. Methylation of newly synthesized ribosomal protein L11 in a DNA-directed *in vitro* system. J. Biol. Chem. 255: 8706-8710.
- Johnson, A. E., Miller, D. L. y Cantor, C. R., 1978. Functional covalent complex between elongation factor Tu and an analog of lysyl-tRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 3075-3079.
- Jonák, J., Petersen, T. E., Clark, B. F. y Rychlík., 1982. N-tosyl-L-phenylalanylchloromethane reacts with cysteine 81 in the molecule of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 150: 485-488.
- Jonák, J., Pokorná, K., Meloun, B. y Karas, K., 1986. Structural homology between elongation factors EF-Tu from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli* in the binding site for aminoacyl-tRNA. Eur. J. Biochem. 154: 355-362.
- Jones, M. D., Petersen, T. E., Nielsen, K. M., Magnusson, S., Sottrup-Jensen, L., Gausing, K. y Clark, B. F. C., 1980. The complete amino-acid sequence of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 108: 507-526.

- Jurnak, F., 1985. Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. Science **230**: 32-36.
- Kaziro, Y., 1978. The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. Biochim. Biophys. Acta **505**: 95-127.
- Kaziro, Y., 1983. Structure, function and biosynthesis of *E. coli* elongation factor Tu. En: Nucleic Acid Research, Future Development (K. Mizobuchi, I. Watanabe y J. D. Watson eds.) Academic Press, Tokyo. pp.:437-456.
- Koller, B. y Delius, H., 1984. Intervening sequences in chloroplast genomes. Cell. **36**: 613-622.
- Koshland Jr., D. E., 1980. Biochemistry of sensing and adaptation. Trens. Biochem. Sci. **5**: 297-302.
- Krebs, G. E. y Beavo, J. A., 1979. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Annu. Rev. Biochem. **48**: 923-959.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Laursen, R. A., L'Italien, J. L., Nagarkatti, S. y Miller, D. L., 1981. The amino acid sequence of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. The complete sequence. J. Biol. Chem. **256**: 8102-8109.
- Laursen, R. A., Nagarkatti, S. y Miller, D. L., 1977. Amino acid sequence of elongation factor Tu. Characterization and alignment of the cyanogen fragments and location of the cysteine residues. FEBS Lett. **80**: 103-106.
- Lechner, K. y Bock, A., 1987. Cloning and nucleotide sequence of the gene for an archaebacterial protein synthesis elongation factor Tu. Mol. Gen. Genet. **208**: 523-528.
- Lee, J. S., An, G., Friesen, J. D. y Fiil, N. P., 1981. Location of the *tufB* promoter of *E. coli*: cotranscription of *tufB* with four transfer RNA genes. Cell **25**: 251-258.

- Lenstra, J. A., Vliet, A. V., Arnberg, A. C., van Hemert, F. J. y Moller, W., 1986. Genes coding for the elongation factor EF-1 α in *Artemia*. Eur. J. Biochem. **155**: 475-483.
- Linz, J. E., Katayama, C. y Sypherd, P., 1986. Three genes for the elongation factor EF-1 α in *Mucor racemosus*. Mol. Cel. Biol. **6**: 593-600.
- L'Italien, J. J. y Laursen, R. A., 1979. Location of the site of methylation in elongation factor Tu. FEBS Lett. **107**: 359-362.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- Lucas-Lenard, J. y Lipmann, F., 1971. Protein biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. **40**: 409-448.
- Mardones, E., Amaro, A. M. y Jerez, C. A., 1980. Methylation of ribosomal proteins in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **142**: 355-358.
- Marshak, D. R., Clarke, M., Roberts, D. M. y Watterson, D. M., 1984. Structural and functional properties of calmodulin from the eukaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*. Biochem. **23**: 2891-2899.
- Miller, D. L. y Weissbach, H., 1970. Studies on the purification and properties of factor Tu from *E. coli*. Arch. Biochem. Biophys. **141**: 26-37.
- Miller, D. L. y Weissbach, H., 1977. En: Molecular mechanisms of protein biosynthesis (Weissbach, H. y Pestka, S., eds.) pp. 323-373, Academic Press, New York.
- Montandon, P. E. y Stutz, E., 1983. Nucleotide sequence of a *Euglena gracilis* chloroplast genome region coding for the elongation factor Tu; evidence for a spliced mRNA. Nucleic Acid Res. **11**: 5877-5892.
- Morrissey, J. J., Cupp, L. E., Weissbach, H. y Brot, N., 1976. Synthesis of ribosomal proteins L7L12 in relaxed and stringent strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **251**: 5516-5521.

- Nagata, S., Nagashima, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujimura, K., Miyazaki, M. y Kaziro, Y., 1984. Polypeptide chain elongation factor 1 (EF-1 α) from yeast: nucleotide sequence of one of the two genes for EF-1 α from *Saccharomyces cerevisiae* EMBO J. 3: 1825-1830.
- Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Naito, A. y Kaziro, Y., 1983. Molecular cloning and sequence determination of the nuclear gene coding for mitochondrial elongation factor Tu of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 6192-6196.
- Nakamura, S., Arai, K., Takahashi, K. y Kaziro, Y., 1977. Alignment of the tryptic fragments and location of sulfhydryl groups of the polypeptide chain elongation factor Tu. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 1418-1424.
- Nierhaus, K. H., 1982. Structure, assembly, and function of ribosome. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 97: 82-155.
- Nierhaus, K. H. y Dohme, F., 1979. Total reconstitution of 50S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes. Meth. Enzymol. 49 (G): 443-449.
- O'Farrell, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
- Ohama, T., Yamao, F., Muto, A. y Osawa, S., 1987. Organization and codon usage of the streptomycin operon in *Micrococcus luteus*, a bacterium with a high genomic G+C content. J. Bacteriol. 169: 4770-4777.
- Ohba, M., Koiwai, O., Tanada, S. y Hayashi, H., 1979. In vivo methylation of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. J. Biochem. 86:1233-1238.
- Paik, W. K. y Kim, S., 1971. Protein methylation. Enzymatic methylation of preteins after translation may take part in control of biological activities of proteins. Science 174: 114-119
- Paik, W. K. y Kim, S., 1980. Methylation of the ϵ -amino group of lysine residues. En: Protein methylation, pp. 142-183. En: A. Meister (ed.) Biochemistry. A series of monographs. John Willey & Sons, Inc. New York.

- Paik, W. K. y Kim, S., 1980. Effect of methylation on the susceptibility of proteins to proteolytic enzymes. En: Protein methylation. pp. 176-177. En: A. Meister (ed.) Biochemistry. A series of monographs. John Willey & Sons. Inc. New York.
- Parmeggiani, A. Y Swart, G. W. M., 1985. Mechanism of action of Kirromycin-like antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 39: 557-577.
- Pingoud, A., Block, W., Urbanke, C. y Wolf, H., 1982. The antibiotics kirromycin and pulvomycin bind to different sites on the elongation factor Tu from *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 123: 261-265.
- Poncz, L. y Dearborn, D. G., 1983. The resistance to tryptic hydrolysis of peptide bonds adjacent to N, N-dimethyllysyl residues. J. Biol. Chem. 258: 1844-1850.
- Post, L. E., Anfsten, A. E., Nomura, M. y Jaskunas, S. R., 1978. Isolation and characterization of a promoter mutant in the *str* ribosomal protein operon in *E. coli*. Cell 15: 231-236.
- Ramagopal, S. y Subramanian, A. R., 1974. Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71: 2136-2140
- Reech, S. y Perdersen, S., 1978. En: Gene Expression 43 of FEBS Symposia (Clark, B. F. C., Klenow, H. y Zenthel, J. eds.) pp. 89-98, Pergamon Press.
- Roberts, D. M., Rowe, P. M., Siegel, F. L., Lukas, T. J. y Watterson, D. M., 1986. Trimethyllysine and protein function. Effect of methylation and mutagenesis of lysine 115 of calmodulin on NAD kinase activation. J. Biol. Chem. 261: 1491-1494.
- Rubin, J.R., Morikawa, K., Nyborg, J., la Cour, T. F. M., Clark, B. F. C. y Miller, D. L., 1981. Structural features of the GDP binding site of elongation factor Tu from *Escherichia coli* as determined by X-ray diffraction. FEBS Lett. 129: 177-179.
- Sanhueza, S. A., 1987. Estudios sobre la metilación y fosforilación de las proteínas de los ribosomas cloroplásticos y citoplasmáticos de *Euglena gracilis*. Tesis de Magister. Universidad de Chile.

- Schilstra, M. J., Slot, J. W., van der Meide, P. H., Posthuma, G., Cremers, A. F. M. y Bosch, L., 1984. Immunocytochemical localization of the elongation factor Tu in E coli cells. FEBS Lett. 165:175-179.
- Seidler, L., Peter, M., Meissner, F. y Sprinzl, M., 1987. Sequence and identification of the nucleotide binding site for the elongation factor Tu from *Thermus thermophilus* HB8. Nucl. Acids Res. 15: 9263-9277.
- Smith, I. y Paress, P., 1978. Genetic and biochemical characterization of kirromycin resistance mutations in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 135: 1107-1117.
- Smith, R. C. y W. D. Salmon, 1965. Effect of ethionine on the ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and protein content of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 89: 687-692.
- Stock, A., Clarke, S. Clarke, C. y Stock, J., 1987. N-terminal methylation of proteins: structure, function and specificity. FEBS Lett. 220: 8-14.
- Thompson, R. C., 1988. EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy. Trends Biochem. Sci. 13: 91-93.
- Thompson, R. C. y Dix, D. B., 1982. Accuracy of protein biosynthesis. A kinetic study of the reaction of poly(U)-programmed ribosomes with a leucyl-tRNA₂ elongation factor Tu-GTP complex. J. Biol. Chem. 257: 6677-6682.
- Thompson, R. C., Dix, D. B. y Karim A. M., 1986. The reaction of ribosomes with elongation factor Tu-GTP complexes. Aminoacyl-tRNA-independent reactions in the elongation cycle determine the accuracy of protein synthesis. J. Biol. Chem. 261: 4868-4874.
- Thompson, R. C. y Karim A. M., 1982. The accuracy of protein biosynthesis is limited by its speed: High fidelity selection by ribosomes of aminoacyl-tRNA ternary complexes containing GTP(S). Proc, Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 4922-4926.
- Toledo, H., Amaro, A. M., Sanhueza, S. y Jerez, C. A., 1988. Methylation of proteins from the translational apparatus: an overview. Arch. Biol. Med. Exp. 21: 219-229.

- Toledo, H. y Jerez, C. A., 1985. In vitro methylation of the elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 193: 17-21.
- Travers, A., 1973. Control of ribosomal RNA synthesis in vitro. Nature 244: 15-18.
- van Hemert, F. J., Amons, R., Pluijms, J. M., van Ormondt, H. y Moller, W., 1984. The primary structure of elongation factor EF-1 α from the brine shrimp *Artemia*. EMBO J. 3: 1109-1113.
- van Noort, J. M., Kraal, B. y Bosch, L., 1986a. GTPase center of elongation factor Tu is activated by occupation of the second tRNA binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 4617-4621.
- van Noort, J. M., Kraal, B., Singorge, K. M. C., Persoon, N. L. M., Johanns, E. S. D. y Bosch, L., 1986. Methylation in vivo of elongation factor EF-Tu at lysine-56 decreases the rate of tRNA-dependent GTP hydrolysis. Eur. J. Biochem. 160: 557-561.
- Yokota, T., Sugisaki, H., Takanami, M. y Kaziro, Y., 1980. The nucleotide sequence of the cloned tufA gene of *Escherichia coli*. Gene 12:25-31.
- Watson, J. C. y Surzycki, S. J., 1982. Extensive sequence homology in the DNA coding for elongation factor Tu from *Escherichia coli* and the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 2264-2267.
- Weiser, J. y Mikulik, K., 1981. Studies on the elongation factor Tu from *Streptomyces aureofaciens* producing tetracycline. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99: 16-22.
- Weissbach, H., Miller, D. L. y Hachmann, J., 1970. Studies on the role of factor Ts in polypeptide synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 137: 262-269.
- Williams, L. y Freundlich, M., 1969. Control of isoleucine, valine and leucine biosynthesis. VII. Role of valine transfer RNA in repression. Biochim. Biophys. Acta 186: 305-316.
- Wittinghofer, A., Frank, R. y Leberman, R., 1980. Composition and properties of trypsin-cleaved elongation factor Tu. Eur. J. Biochem. 108: 423-431.

- Wittinghofer, A. y Leberman, R., 1976. Elongation factor T from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. Purification and some properties of EF-Tu and EF-Ts from *Bacillus stearothermophilus*. Eur. J. Biochem. 62: 373-382.
- Wittmann, H. G., 1982. Components of bacterial ribosomes. Annu. Rev. Biochem. 51: 155-183.
- Wold, F., 1981. In vivo chemical modification of proteins (Post-translational modification). Annu. Rev. Biochem. 50: 783-814.
- Wolf, H., Chinali, G. y Parmeggiani, A., 1974. Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71: 4910-4914.
- Wurmbach, P. y Nierhaus, K. H., 1979. Isolation of the protein synthesis elongation factor EF-Tu, EF-Ts and EF-G from *Escherichia coli*. Meth. Enzymol. 60 (H): 593-605.
- Zarucki-Schulz, T., Jerez, C., Goldberg, G., Kung, H. F., Huang, K. H., Brot, N. y Weissbach, H., 1979. DNA-directed in vitro synthesis of proteins involved in bacterial transcription and translation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 6115-6119.
- Zegel, J. M. y Lindahl, L., 1982. Oversynthesis of elongation factors G and Tu in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 149: 793-797.