

ESTUDIOS SOBRE LA METILACION Y FOSFORILACION DE LAS  
PROTEINAS DE LOS RIBOSOMAS CLOROPLASTICOS Y  
CITOPLASMATICOS DE Euclena gracilis.

Tesis

Presentada a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica

Facultad de Ciencias

SERGIO ALFONSO SANHUEZA SOTO

1987

Director de Tesis: DR. CARLOS JEREZ G.



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

Sergio Alfonso Sanhueza Soto

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Mayo de 1987.

Director de Tesis:

Dr. Carlos Jerez G.

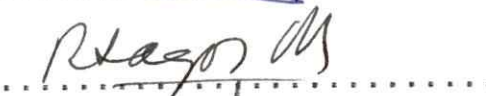


Comisión Informante de Tesis:

Dr. Javier Jordana



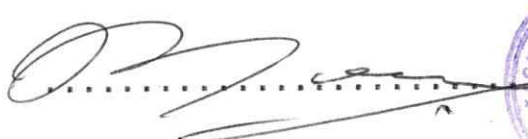
Dra. Rosalba Lagos



Dr. Octavio Monasterio



Dr. Guido Mora



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Carlos Jerez G.



A mi esposa  
Norma Cecilia  
A mis hijas  
María José y  
Paula Andrea



## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer con profunda sinceridad a las siguientes personas:

Al Dr. Carlos Jerez, por su guía, apoyo y su sincera amistad.

A Héctor Toledo, por su amistad y valiosa ayuda en la elaboración de esta tesis en la parte computacional.

A mis compañeros de trabajo y amigos: Ana María Amaro, Gabriel Campos, Ximena Espinosa, Iris Peinano y Marta Véliz por su valiosa ayuda, consejos y estímulo constante.

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



## INDICE

	Página
Lista de abreviaturas.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xviii
1. Introducción .....	1
2. Materiales y Métodos.....	11
2.1. Reactivos.....	11
2.2. Microorganismos empleados.....	12
2.3. Medios de cultivo.....	12
2.3.1. Medios de cultivo para <u>E. coli</u> .....	12
2.3.2. Medio S de cultivo para <u>S. carlsbergensis</u> .....	14
2.3.3. Medio de cultivo Hutner para <u>E. gracilis</u> .....	14
2.4. Tampones utilizados en la preparación de ribosomas.....	15
2.5. Crecimiento y marcación de células.....	16
2.6. Efecto de antibióticos sobre el crecimiento de <u>E. gracilis</u> .....	18
2.7. Preparación de ribosomas y proteínas ribosomales de células marcadas <u>in vivo</u> .....	18
2.7.1. Ruptura de células de <u>E. coli</u> .....	18



2.7.2. Ruptura de células de <u>E. gracilis</u> para obtener ribosomas citoplasmáticos.....	19
2.7.3. Ruptura de células de <u>E. gracilis</u> para obtener ribosomas de cloroplasto.....	21
2.7.4. Ruptura de células de <u>S. carlsbergensis</u> para obtener ribosomas citoplasmáticos.....	23
2.7.5. Análisis de ribosomas por centrifugación en gradientes analíticas de sacarosa.....	24
2.7.6. Preparación de proteínas ribosomales y medición de proteínas.....	24
2.8. Análisis de las proteínas ribosomales metiladas o fosforiladas <u>in vivo</u> por electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida.....	25
2.8.1. Primera dimensión .....	25
2.8.2. Segunda dimensión.....	28
2.8.3. Identificación de las proteínas ribosomales....	30
2.9. Método para determinar las proteínas ribosomales metiladas.....	30
2.10. Método para determinar las proteínas ribosomales fosforiladas.....	31
2.10.1. Determinación de la radiactividad.....	31

2.11.	Análisis de los aminoácidos metilados.....	34
2.11.1.	Hidrólisis de las proteínas ribosomales marcadas.....	34
2.11.2.	Cromatografía descendente en papel.....	35
2.12.	Determinación de fosfoaminoácidos.....	36
3.	Resultados.....	37
3.1.	Crecimiento y marcación de <u>E. gracilis</u> .....	37
3.2.	Efecto de cicloheximida y cloranfenicol sobre el crecimiento y marcación de <u>E. gracilis</u> .....	40
3.3.	Purificación de ribosomas de cloroplasto en gradientes de sacarosa.....	43
3.4.	Determinación de las proteínas ribosomales metiladas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.....	49
3.5.	Análisis de los aminoácidos metilados en las proteínas totales.....	57
3.6.	Determinación de proteínas fosforiladas en ribosomas.....	60



3.7.	Análisis de los aminoácidos fosforilados presentes en proteínas ribosomales totales.....	68
4.	Discusión .....	72
5.	Bibliografía.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ala (Me <sub>3</sub> )	:N-trimetilalanina
Ala,1,2,3	:Proteínas ribosomales 50S de <u>Alteromonas</u> : <u>espejiana</u>
Bis Tris	:bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil) :amino metano
BSL1,2,3	:Proteínas ribosomales 50S de <u>Bacillus</u> : <u>subtilis</u>
BTL1,2,3	:Proteínas ribosomales 50S de <u>Bacillus</u> : <u>stearothermophilus</u>
DNAasa	:Desoxirribonucleasa
DNP-Lys	:N-2,4-dinitrofenil-L-lisina
DTT	:Ditiotreitol
EDTA	:Acido etilendiaminotetraacético
HL1,2,3	:Proteínas ribosomales 50S de <u>Halobacterium</u> : <u>cutinubrum</u>
L1,2,3	:Proteínas ribosomales 50S de <u>Escherichia</u> : <u>coli</u>
Lis	:Lisina
Lis(Me)	: <u>E</u> -N-monometil-lisina
Lis(Me <sub>3</sub> )	: <u>E</u> -N-trimetil-lisina
MES	:Acido morfolino etanosulfónico
Met	:Metionina
Met(O)	:Metionina sulfóxido
Met(O <sub>2</sub> )	:Metionina sulfona

PMSF	:Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
POPOP	:1,4-bis 2(5-feniloxazolil)benceno
PP0	:2,5- difeniloxazol
P-Ser	:Fosfoserina
P-Tre	:Fosfotreonina
P-Tir	:Fosfotirosina
S1,2,3	:Proteinas ribosomales 30S de <u>Escherichia</u> : <u>coli</u>
SDS	:Sulfato disódico de dedecilo
TCA	:Acido tricloroacético
TEMED	:N,N,N,N tetrametilendiamina
Tris	:Tris-(hidroximetil)aminometano

## Lista de Figuras.

	Página
Figura 1 Algunas características de los ribosomas de los tres reinos propuestos por Woese y colaboradores.	2
Figura 2 Método para determinar las proteínas ribosomales metiladas en diferentes microorganismos.	32
Figura 3 Incorporación <u>in vivo</u> de ( <sup>3</sup> H-metil)metionina en <u>E. gracilis</u> .	38
Figura 4 Efecto de cicloheximida y cloranfenicol sobre el crecimiento e incorporación de ( <sup>3</sup> H-metil)metionina en <u>E. gracilis</u>	41
Figura 5 Purificación de ribosomas de cloroplastos mediante centrifugación en gradientes de sacarosa.	45
Figura 6 Comparación de los clororribosomas con ribosomas de diferentes organismos	47
Figura 7 Separación de las proteínas de diferentes ribosomas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.	50

Figura 8	Movilidad electroforética de las proteínas ribosomales metiladas en electroforesis bidimensional.	55
Figura 9	Análisis de los aminoácidos metilados presentes en los ribosomas de cloroplastos y citoplasmáticos por cromatografía descendente en papel.	58
Figura 10	Fosforilación de proteínas ribosomales de origen procariótico y eucariótico.	61
Figura 11	Comparación electroforética de proteínas ribosomales fosforiladas de diferentes organismos en electroforesis bidimensional.	66
Figura 12	Análisis de los aminoácidos fosforilados presentes en las proteínas ribosomales de <u>E. gracilis</u> por cromatografía en capa fina y autoradiografía.	69

## Lista de Tablas.

	Página
Tabla I Cepas y medios de cultivo.	13
Tabla II Proteínas metiladas en los ribosomas de <u>E. gracilis</u> .	53
Tabla III Fosforilación de proteínas ribosomales en diferentes microorganismos.	64,65
Tabla IV Proteínas ribosomales metiladas en varios organismos.	74
Tabla V Proteínas ribosomales fosforiladas <u>in vivo</u> en varios organismos.	79

## RESUMEN

Los ribosomas son las partículas que sintetizan proteínas en la célula. Se encuentran presentes en toda clase de organismos desempeñando la misma función, por lo que han sido un excelente material para estudios evolutivos. Sin embargo, existen diversos tipos de ribosomas. En organismos vegetales y ciertos protozoos se han descrito tres clases diferentes de ribosomas: el citoplasmático, el cloroplástico y el mitocondrial.

Analizando el RNA ribosomal 16S en varios organismos y en base a una serie de otros antecedentes, Woese ha propuesto una clasificación de los seres vivos en la que se postulan tres grupos, los que se originaron de un supuesto antepasado común denominado progenote y que son las arqueobacterias, las eubacterias y los eucariontes. Lo interesante es que esta clasificación apoya la hipótesis de un origen endosimbionte para el cloroplasto y la mitocondria.

Como los ribosomas ejercen el mismo papel en los tres tipos de organismos, los componentes de la partícula deberían estar conservados. De acuerdo con esto, las modificaciones post-sintéticas de los componentes ribosomales tales como las metilaciones, las fosforilaciones, etc. también podrían estar conservadas.

En este sentido, recientemente se ha demostrado en el laboratorio que las metilaciones de las proteínas ribosomales son aparentemente conservadas en las eubacterias con un patrón de metilación característico. Encontramos varias proteínas metiladas, algunas de las cuales participan activamente en la función ribosomal.

De acuerdo a estos hallazgos, y teniendo en cuenta el planteamiento de la hipótesis de un origen endosimbiótico para los cloroplastos, hemos querido extender nuestros estudios sobre la modificación de proteínas del aparato traduccional para establecer si los clororribosomas presentan también metilaciones y/o fosforilaciones de sus proteínas y si estas modificaciones coinciden o no con el patrón determinado para las eubacterias.

Se estudió la metilación in vivo de los ribosomas de E. gracilis creciendo las células en presencia de (<sup>3</sup>H-metil)metionina y (1-<sup>14</sup>C)metionina. Se obtuvieron las proteínas ribosomales de los clororribosomas o de los ribosomas citoplasmáticos por los métodos convencionales. La separación de las proteínas se efectuó mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. El grado de metilación fué determinado midiendo la razón <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C de cada proteína. Encontramos que en los ribosomas de cloroplastos el número de proteínas metiladas y su distribución en geles de electroforesis bidimensional es



similar a las de los procariontes. Para aportar mayores antecedentes en este sentido se analizaron también los aminoácidos metilados encontrándose cantidades similares de Lis(Me<sub>3</sub>) y Lis(Me) en los ribosomas de cloroplasto tal como ocurre en los ribosomas de E. coli. En cambio, los ribosomas citoplasmáticos presentan cantidades diferentes de ambos aminoácidos metilados. Estos resultados parecen sugerir que existiría un cierto grado de conservación y una similitud entre el patrón de metilación de los clororribosomas y el patrón de metilación de "tipo eubacteriano".

Por otro lado se estudió la fosforilación in vivo de las proteínas ribosomales de E. gracilis, creciendo las células en presencia de (<sup>32</sup>P)ortofosfato. En estas condiciones se detectaron sólo 2 proteínas fosforiladas en los clororribosomas y 5 proteínas fosforiladas en los citorribosomas. Los residuos fosforilados encontrados en ambos tipos de ribosomas fueron serina y treonina, siendo la razón treonina/serina de 1,9 para los ribosomas de cloroplastos y de 1,1 para los ribosomas citoplasmáticos.

En conclusión, los estudios de estas modificaciones post-sintéticas de las proteínas ribosomales de bacterias y cloroplastos y aquellos ya publicados anteriormente por otros grupos, permiten sugerir que las metilaciones del aparato traduccional aparentemente presentan un cierto grado de conservación evolutiva. Esto podría deberse a que estas

modificaciones tienen un papel mas bien estructural.

En el caso de las fosforilaciones se debería esperar un resultado similar. Sin embargo se encontraron fosforilados sólo los ribosomas de cloroplastos y no los ribosomas de E. coli. Se podría especular entonces que las fosforilaciones de las proteínas ribosomales, que han sido descritas sólo en eucariontes, aparecieron en el cloroplasto con posterioridad a su origen.

## ABSTRACT.

The ribosomes synthesize all the proteins in the cell. Therefore, they are present in all kind of organisms and have the same role. Due to this, they are an excellent material for evolutive studies. In plants and certain protozoa, three types of ribosomes have been described: cytoplasmic, chloroplastic and mitochondrial.

Analyzing the 16S ribosomal RNA from various organisms and according to several other criteria, Woese proposed a classification postulating three living groups: archebacteria, eubacteria and eukaryotes. They would have a common ancestor called progenote. Interestingly, this classification supports the hypothesis of an endosymbiotic origin for the chloroplast and mitochondria.

As ribosomes have a similar function in the three types of organisms, the components of the particles should be preserved. According to this, the post-synthetical modifications of the ribosomal components such as methylation and phosphorylation, should also be conserved. Our laboratory has recently demonstrated that the ribosomal protein methylation is highly conserved in eubacteria, showing a typical methylation pattern. Many of these methylated proteins have an important role in ribosome function.

Taking into account these findings and considering the hypothesis of an endosymbiotic origin for the chloroplast, we have extended our studies of the modification of the proteins from the translational apparatus in order to establish if chloroplastic ribosomes show methylation and/or phosphorylation of their proteins, and if these modifications show a pattern similar to the one found for eubacteria.

The in vivo methylation of the ribosomes from E. gracilis was studied by growing the cells in the presence of (<sup>3</sup>H-methyl)methionine and (1-<sup>14</sup>C)methionine. Ribosomal proteins were then obtained from either chloroplast or cytoplasmatic ribosomes by conventional methods. The ribosomal proteins were then analyzed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. The degree of methylation was determined by measuring the <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C ratio for each protein. We found that chloroplast ribosomes showed a distribution of methylated proteins in two-dimensional gels similar to that shown by prokaryotes. To confirm this, we also analyzed the methylated aminoacids present in the total ribosomal proteins. We found similar amounts of Lys(Me<sub>3</sub>) and Lys(Me) in both chloroplast and E. coli ribosomes. On the other hand, the cytoplasmatic ribosomes showed different amounts of each methylated aminoacid.

These results suggest a certain degree of conservation of the methylation pattern since this one was similar in both the chloroplastic and the eubacterial ribosomes.

The *in vivo* phosphorylation of the ribosomal proteins from E. gracilis was studied by growing the cells in the presence of (<sup>32</sup>P)orthophosphate. Under these conditions, only two phosphorylated proteins were detected in chloroplast ribosomes and five in the cytoplasmic ribosomes. The phosphorylated residues found in both types of ribosomes were serine and threonine with a threonine/serine ratio of 1,9 for chloroplastic ribosomes and 1,1 for the cytoplasmatic ribosomes.

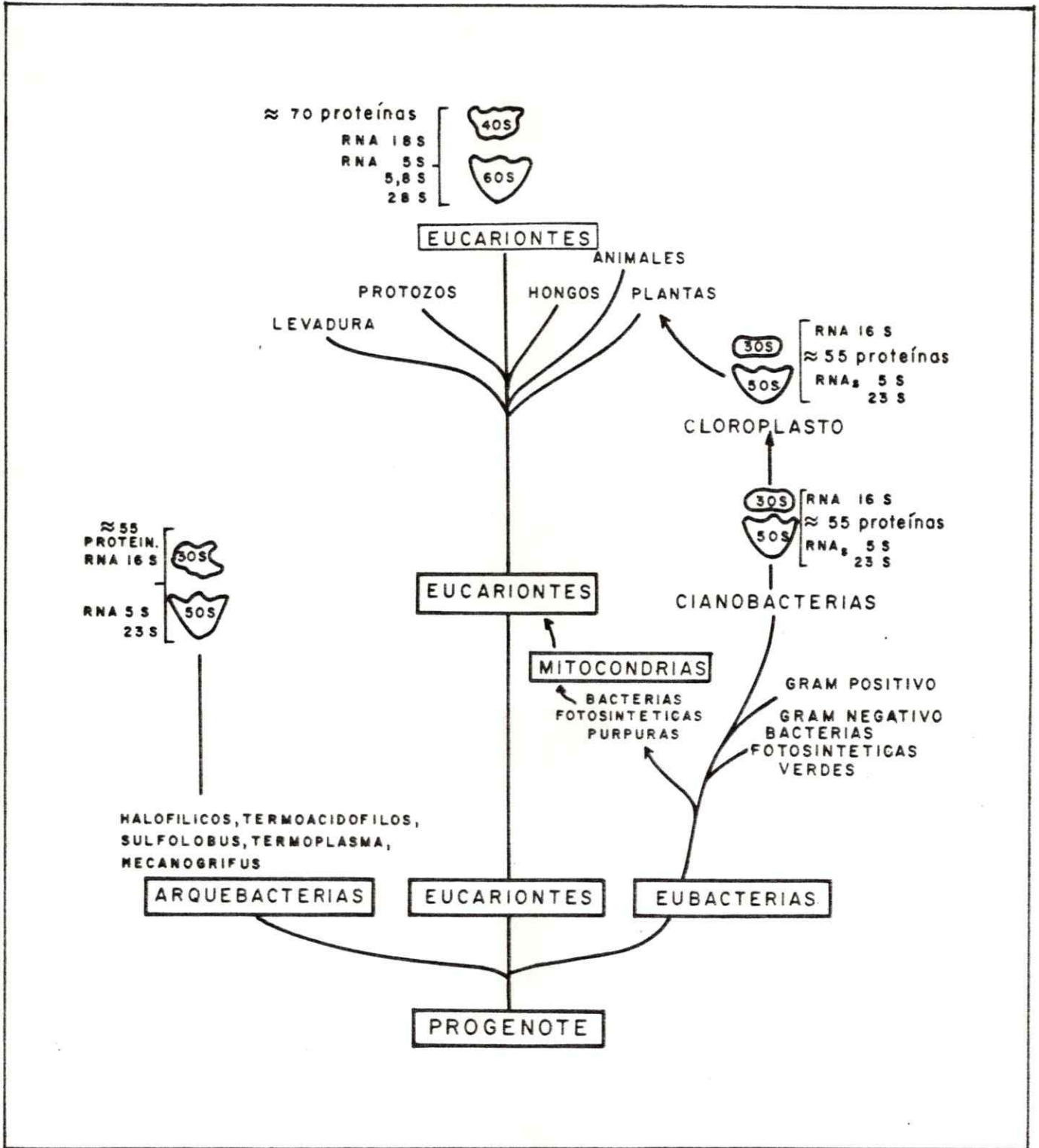
In conclusion, the study of these post-synthetic modifications of ribosomal proteins from bacteria and chloroplasts together with previous work already published by other groups suggest that the methylation of the translational apparatus shows a certain degree of evolutionary conservation. A similar situation was expected for the phosphorylation of ribosomal proteins. However, only the chloroplast ribosomes were phosphorylated when compared with the E. coli ribosomes. One could assume that the ribosomal protein phosphorylations, which have been described in eukaryotes only, appeared after the organelle origin.

## 1. INTRODUCCION.

Los ribosomas son las partículas que sintetizan proteínas en la célula (1, 2). Se encuentran presentes en toda clase de organismos desempeñando la misma función, por lo que han sido un excelente material para estudios evolutivos (2). Así se pueden distinguir diversos tipos de ribosomas. En los organismos vegetales y ciertos protozoos se han descrito tres tipos diferentes de ribosomas: el citoplasmático, el cloroplástico, y el mitocondrial (3, 4). En base fundamentalmente a la estructura y propiedades del aparato traduccional, Woese y col (5) han propuesto una clasificación en la que se postulan tres grupos de organismos, los que se originaron de un supuesto antepasado común denominado progenote y que serían las arquebacterias, las eubacterias y los eucariontes (5). En la Fig. 1 se indican los tres reinos propuestos por Woese y se señalan los tipos de ribosomas existentes con sus características principales.

Es interesante que esta clasificación apoya la hipótesis de un origen endosimbionte para el cloroplasto y la mitocondria. Esta hipótesis plantea que tanto el genoma nuclear como el genoma de los organelos, se encontraban inicialmente en diferentes clases de células. Estas células habrían entrado en simbiosis (presumiblemente endosimbiosis) y aquella que contenía el genoma

FIGURA 1. Algunas características de los ribosomas de los tres reinos propuestos por Woese y colaboradores. En estos tres tipos de organismos los ribosomas están estructuralmente formados por sub-unidades, las que en el caso de las eubacterias, cloroplastos y arqueobacterias son de un tamaño de 30 S y 50 S y poseen números de proteínas y tamaños de RNA ribosomal similares.





"protonuclear" habría servido como huésped. Alteraciones internas posteriores, así como el intercambio entre los genomas, habría dado como resultado una disminución del tamaño del genoma del organelo, adquiriendo el genoma nuclear cierta información inicialmente contenida en el genoma del "protoorganelo" (6). Esta hipótesis se basa principalmente en el análisis de la estructura y la función ribosomal y en una serie de otros antecedentes que demuestran una homología o similitud entre los organelos y las eubacterias. Entre estos antecedentes tenemos:

- a) Los ribosomas de organelos son inhibidos por los antibióticos específicos contra los ribosomas eubacterianos; en cambio los que afectan a los ribosomas citoplasmáticos no los inhiben (6, 7, 8).
- b) La estructura y la organización del RNA ribosomal de los organelos tienen un mayor parecido a las de las bacterias (5, 6, 9).
- c) Los ribosomas de organelos no sólo poseen aproximadamente el mismo número de proteínas ribosomales que poseen los ribosomas eubacterianos sino que existen varias homologías inmunológicas entre las proteínas ribosomales de cloroplastos y las proteínas ribosomales de E. coli (6,10).
- d) Los híbridos heterólogos formados por subunidades 30S de E. coli y 50S de cloroplasto o viceversa, son activos en un sistema de síntesis de polifenilalanina (6).

- e) Los organelos inician la síntesis proteica con N-formilmetionina, al igual que las bacterias (6).
- f) La estructura y función de las RNA polimerasas de cloroplastos, son similares a la de E. coli (6).
- g) La estructura y la organización del DNA de cloroplasto son similares a los del DNA eubacteriano (6).

Como los ribosomas cumplen la misma función en las tres clases de organismos, los componentes de la partícula (o sus dominios ) deberían estar conservados. Algunos de los antecedentes ya entregados apoyan esta idea. Por otro lado, se ha demostrado que existe una homología 1:1 entre las proteínas ribosomales de diferentes eubacterias (2,11). Lo mismo ha sido descrito para los RNA ribosomales de estos microorganismos (1,2).

Analizando la estructura del aparato traduccional tanto en procariontes como en eucariontes, se han encontrado varios componentes modificados, ya sea por metilación, fosforilación, acetilación, o por otros tipos de modificación química (12-17).

Estas modificaciones post-sintéticas son de especial interés ya que pueden alterar la estructura de una proteína a nivel macromolecular con un posible cambio en su función. Esta es una manera muy eficiente por la cual una célula puede convertir una proteína en otra sin que haya una síntesis de novo, lo cual constituye una gran economía celular (18,19).

El objetivo general de esta tesis es estudiar algunas de estas modificaciones en los ribosomas del cloroplasto y hacer un análisis comparativo de estas modificaciones químicas de acuerdo a la teoría del origen endosimbionte para el cloroplasto (6). La metilación de las proteínas consiste en la incorporación de uno o más grupos metilos a la cadena lateral de uno o más aminoácidos una vez que éstos han sido incorporado a la cadena polipeptídica por el proceso de traducción (18-20). Esta modificación es un proceso enzimático en el cual la S-adenosil-metionina participa como dador de grupos metilos.

Los residuos de aminoácidos que se han encontrado metilados en las proteínas ribosomales son: lisina (ε-amino), arginina (grupo guanidino), histidina (grupo imidazol) y aminoácidos N-terminales (N-metilaciones) (3). Para E. coli, se ha sugerido que la metilación de sus componentes ribosomales podría tener importancia para el ensamblaje de la partícula (2,21). Aunque el significado biológico de estas metilaciones post-sintéticas de los componentes ribosomales no se conoce, resulta interesante que algunas proteínas metiladas desempeñen importantes funciones en el ribosomas de E. coli. Por ejemplo la proteína L11, que es la proteína ribosomal más metilada, participa en la respuesta restringida del ribosoma y se ubica cerca del centro peptidiltransferásico de la partícula (1-3). Las proteínas L7 y L12 son esenciales

para la traducción en la biosíntesis de proteínas (1,2,22).

Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que las metilaciones de las proteínas ribosomales son aparentemente conservadas en las eubacterias (13) y que podría existir un patrón de metilación típico de tipo eubacteriano. Así, encontramos metilación de varias proteínas, algunas de las cuales participan activamente en la función ribosomal, y que son estructural y funcionalmente homólogas en varios microorganismos (13,15). Entre estas proteínas están las L7 y L12 (L12 es idéntica a la L7 excepto que se encuentra en forma acetilada), que son altamente conservadas tanto en las eubacterias como en las arqueobacterias y eucariontes (10). Así por ejemplo se ha determinado que la secuencia de la proteína L12 de cloroplasto de Spinacia oleracea es similar a la de las eubacterias, con un 70% de homología cuando se la compara con la proteína de E. coli (10). La proteína L12 de E. coli y otros organismos poseen  $\epsilon$ -N-monometil-lisina localizada en un segmento de siete aminoácidos que tiene la secuencia Leu-Gly-Leu-Lys(Me)-Glu-Ala-Lys. Esta secuencia es altamente conservada en varias especies bacterianas y en cloroplastos (10).

De las modificaciones post-sintéticas en general anteriormente nombradas, la fosforilación de las proteínas es una de las más intensamente estudiadas, debido a su

importancia en la regulación de algunas funciones celulares (16,23).

La fosforilación del aparato traduccional también ha sido estudiada. En eucariotes algunas proteínas ribosomales son fosforiladas en residuos de serina y treonina por proteínas quinasas citoplasmáticas asociadas a ribosomas (16,17,23-25). Estas proteínas quinasas detectadas en el citosol, pueden ser dependientes o independientes de nucleótidos cíclicos. Traugh y Traut han encontrado en el citosol de reticulocitos proteínas quinasas que fosforilan proteínas ribosomales (26). Un grupo similar de quinasas está presente en el citosol de hígado de rata (27). Algunas de estas proteínas quinasas se encuentran asociadas a ribosomas intactos (16,28) y pueden ser extraídas con tampones que contienen KCl 0,5 M.

La fosforilación in vivo e in vitro de las proteínas ribosomales ha sido observada en una variedad de células eucarióticas. La proteína más fosforilada bajo diferentes condiciones fisiológicas es la S6 que se encuentra presente en la subunidad 40S, en varios tipos de células (24,25,29-31). S6 puede contener hasta alrededor de 5 grupos fosfatos unidos a diferentes residuos de serina in vivo (24).

En los últimos 10 años ha existido una controversia sobre la fosforilación de proteínas en procariontes, pero evidencias recientes han demostrado que la fosforilación de

proteínas no es exclusiva de los sistemas eucarióticos. Existen varios estudios que describen la fosforilación de proteínas en E. coli (33), en la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum (34), en Salmonella typhimurium (35), y en Clostridium thermohydrosulfuricum(36). Pero la fosforilación de proteínas ribosomales no está aclarado aún. En este sentido, Manai y Cozzone (33) detectaron en E. coli una actividad de proteína quinasa que fosforila a un número de proteínas citoplasmáticas asociadas a los ribosomas. La fracción de proteínas ribosomales contiene una proteína fosforilada de PM 54.500 y PI 5,6 cuyo residuo fosforilado es fosfotirosina, pero el origen de esta proteína no ha sido establecido.

Se conoce que en los cloroplastos de espinacas es posible obtener la fosforilación de las proteínas cuando se incuban los cloroplastos aislados con ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato. En estas condiciones se han encontrado 2 proteínas fosforiladas: una en la subunidad 30S y la otra en la subunidad 50S. El residuo fosforilado encontrado en estas condiciones era la serina (37). Por otro lado, se han aislado y purificado proteínas quinasas provenientes de cloroplastos de espinacas (38).

Puesto que los ribosomas de los cloroplastos son estructural y funcionalmente muy similares a los ribosomas procarióticos, hemos querido en el marco de la hipótesis del origen endosimbiótico para los cloroplastos, extender

nuestros estudios sobre las modificaciones del aparato traduccional. Para ello se plantea establecer si los clororrribosomas de E. gracilis presentan también metilaciones y fosforilaciones de sus proteínas y si estas modificaciones coinciden con un patrón de tipo "eubacteriano" u otro. Estos estudios indicarían por una parte si existe universalidad de estas modificaciones del ribosoma, lo que apoyaría su posible importancia biológica, y además permitiría analizar si estas modificaciones siguen las relaciones evolutivas ya establecidas en base a la estructura de la partícula ribosomal.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1 Reactivos.

(1-<sup>14</sup>C)metionina (60 Ci/mol) y (metil-<sup>3</sup>H)metionina (87 Ci/mmol), se adquirieron en Amersham International; (<sup>32</sup>P)ortofosfato (7,6 mCi/ml) se adquirió en la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Glucosa, sacarosa, tiamina, galactosa, glicerol, EDTA, biotina, cianocobalamina, ácido málico, ácido glutámico, 2-mercaptoetanol, PMSF, alúmina, acrilamida, bisacrilamida, negro amido, MES, azul de bromofenol, azul de coomassie, SDS, ninhidrina, PPO, POPOP, DNAasa DN-100, lisozima, aminoácidos, E-N-monometil-lisina, metionina sulfona, metionina sulfóxido, beta-glucuronidasa, espermina, manitol, ácido bórico, fosfoaminoácidos (tirosina, treonina, serina) y persulfato de amonio se adquirieron en Sigma Chemical Co. N-trimetil-lisina se obtuvo en Calbiochem-Behring. Casaminoácidos, bactotripton, extracto de levadura y "nutrient broth" se adquirieron en Difco. Ácidos, solventes orgánicos y sales minerales se adquirieron en Merck. Piridina fue obtenida de Riedel de Haen. Papel filtro 3 MM, papel filtro N°1 y discos de fibra de vidrio (2,5 cm. de diámetro) GF/C se adquirieron en Whatman.



## 2.2 Microorganismos empleados

Las cepas utilizadas se obtuvieron de los siguientes investigadores:

Escherichia coli D-10 (met, rel), fue gentilmente cedida por el Dr. Hayes.

Saccharomyces carlsbergensis fue cedida por el Dr. J. R. Planta.

Euglena gracilis variedad bacillaris facilitada por los Doctores G. Mora y J. Schiff.

Euglena gracilis mutante W<sub>10</sub> BS mL facilitada por los Doctores B. Gómez y J. Schiff.

Sus condiciones de crecimiento aparecen en la Tabla I.

## 2.3 Medios de cultivo

### 2.3.1. Medios de cultivo para E. coli.

Medio mínimo de Chang (12). Contenia 0,1 M Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 mM FeCl<sub>3</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,32 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El medio se ajustaba a pH 7,4 con KOH y después de autoclavarlo se adicionaba glucosa (hasta alcanzar 0,3%), 2 µg/ml tiamina y 15 µg/l de cada uno de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, cistina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina, histidina, triptófano, ácido aspártico, asparragina y glutamina.

TABLA I

Cepas y medios de cultivos

Microorganismos y cepas	Medios de cultivo	Temperatura de crecimiento	Referencia
<u>E. coli</u> D-10 ( <u>met</u> , <u>rel</u> )	Mínimo de Chang	37°	12
	Medio rico	37°	12
<u>S. carlsber-</u> <u>gensis</u>	Medio S	30°	38
<u>E. gracilis</u> variedad bacillaris	Medio Hutner	28°	39
<u>E. gracilis</u> W <sub>10</sub> BSmL	Medio Hutner	28°	39

Medio rico (12). Contenia por litro: 10 g de bactotripton; 5 g de extracto de levaduras; 10 g de NaCl y 2 g de casaminoácidos.

**2.3.2. Medio S de cultivo para S. carlsbergensis.**

Contenia por litro: 10 g de galactosa; 2 g de extracto de levaduras; 0,5 g de NaCl; 0,4 g de CaCl<sub>2</sub>; 0,7 g de MgSO<sub>4</sub>; 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 5 mg de FeCl<sub>3</sub> (39).

**2.3.3. Medio de cultivo de Hutner para E. gracilis.**

Contenia por litro 0,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>; 0,2 g de CaCO<sub>3</sub>; 5 g de ácido glutámico; 2 g de ácido málico; 5 mg de FeCl<sub>3</sub>; 0,44 ml de una mezcla de trazas de metales; 1 ml de una mezcla de antibióticos y vitaminas (40). La mezcla de trazas contenia en g/l: 28 g de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O; 24,8 g de MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O; 52,8 g de ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 0,8 g de CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O; 0,36 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> × 4 H<sub>2</sub>O; 4,8 g de CoSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 0,37 g de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> × 16 H<sub>2</sub>O; 1,14 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. La mezcla de antibióticos y vitaminas contenia: 6 mg de tiamina; 3 mg de cianocobalamina y 2,4 × 10<sup>6</sup> unidades de penicilina sódica. Estos tres últimos compuestos se disolvían en 300 ml de H<sub>2</sub>O, se filtraban en forma estéril y se guardaban congelados a -20°C.

#### 2.4. Tampones utilizados en la preparación de ribosomas

Tampón A. (Lavado de células de E. coli) (20): 1 M KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol y 10% glicerol.

Tampón B. (Lavado de células de E. coli) (20): 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol y 10% glicerol.

Tampón C. (Ruptura de células de E. coli) (41): 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 M KCl; 1 mM EDTA; 6 mM 2-mercaptoetanol; 3,5 mM PMSF y 5% glicerol.

Tampón D. (Lavado de ribosomas de E. coli) (41): 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM acetato de Mg; 6 mM 2-mercaptoetanol; 3,5 mM PMSF y 5% glicerol..

Tampón E. (Resuspensión de ribosomas de E. coli) (41): 0,06 M NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM acetato de Mg; 6 mM 2-mercaptoetanol; 1 mM PMSF y 5% glicerol.

Tampón F. (Lavado de células de E. gracilis) (42): 0,05 M Tris-HCl pH 7,8; 0,04 M MgCl<sub>2</sub> y 0,075 M NH<sub>4</sub>Cl.

Tampón G. (Ruptura de células de E. gracilis) (42): 0,05 M Tris-HCl pH 7,8; 0,075 M NH<sub>4</sub>Cl; 0,04 M MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM espermina; 12 mM 2-mercaptoetanol y 0,2 mM EDTA.

Tampón H. (Resuspensión de ribosomas de cloroplasto) (42): 25 mM Tris-HCl pH 7,8; 25 mM MgCl<sub>2</sub>;

50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,1 mM espermina; 0,1 mM EDTA y 1 mM DTT.

Tampón I. (Lavado y ruptura de células de E. gracilis para obtener ribosomas citoplasmáticos) (43): 0,1 M Tris-HCl pH 7,6; 0,03 M KCl y 2 mM acetato de Mg.

Tampón J. (Lavado de ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis) (43): 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,03 M KCl y 2 mM acetato de Mg.

Tampón K. (Purificación de ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis) (43): 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 2 mM acetato de Mg.

Tampón L. (Lavado de células de S. carlsbergensis) (44): 1 M sacarosa; 0,02 M Tris-HCl pH 7,0 y 1 mM EDTA.

Tampón LL. (Ruptura de células de S. carlsbergensis) (44): 0,5 M sacarosa; 0,05 M Tris-HCl pH 7,0 y 1 mM EDTA.

Tampón M. (Lavado de ribosomas citoplasmáticos de S. carlsbergensis) (45): 0,5 M KCl; 5 mM acetato de Mg y 1 mM DTT.

Tampón N. (Resuspensión de ribosomas citoplasmáticos de S. carlsbergensis) (45): 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 5 mM acetato de Mg y 1 mM DTT.

## 2.5 Crecimiento y marcación de células.

Para los experimentos de doble marca se creció cada tipo de célula en 50 ml de medio definido adecuado (ver Tabla I), el cual fue suplementado con 75 uCi de  $(1-^{14}\text{C})$ metionina, 500 uCi de  $(\text{metil-}^3\text{H})$ metionina y metionina

fría en cantidades suficientes para tener una concentración final de 6 µg/ml.

Para el análisis de los aminoácidos metilados presentes en las proteínas ribosomales, las células se crecieron de igual forma que para los experimentos de doble marca excepto que se emplearon 500 µCi de (metil-<sup>3</sup>H)metionina como única fuente radiactiva (6 µg /ml de concentración final de metionina).

Los cultivos se incubaron a la temperatura apropiada (Tabla I) y con agitación ( en presencia de luz artificial con 4 tubos fluorescentes de 20 W cada uno para el caso de E. gracilis variedad bacillaris) en matraces con tubo lateral para seguir el crecimiento midiendo la absorbancia con filtro rojo (660 nm) en un fotocolorímetro de Klett-Summerson, o bien contando el número de células en una cámara Petroff-Hausser y Helder.

Para los estudios de fosforilación, los diferentes tipos de células se crecieron hasta la mitad de la fase logarítmica y en seguida se recolectaron por centrifugación en forma estéril. Luego se resuspendieron en igual volumen del mismo medio sintético, pero que contenía una baja concentración de fosfato (0,064 mM). Enseguida se tomó un volumen de 2 ml en forma estéril y se suplementaron con 1 mCi de (<sup>32</sup>P)ortofosfato. Las células se incubaron en estas condiciones a temperatura óptima (Tabla I) durante 24 horas.

## 2.6 Efecto de antibióticos sobre el crecimiento de E. gracilis

Las células de E. gracilis variedad bacillaris se cultivaron en matraces con tubo lateral en las condiciones ya descritas pero en presencia de (<sup>3</sup>H-metil)metionina (7,5 uCi/50 ml) y cicloheximida a una concentración final de 15 ug/ml o de cloranfenicol a una concentración final de 2 mg/ml (8). El crecimiento se midió en un fotocolorímetro de Klett-Summerson (660 nm) y en forma paralela se utilizaron alícuotas de 50 ul del cultivo para medir la incorporación del isótopo a las células en cultivo en la forma de material precipitable por TCA en caliente.

## 2.7. Preparación de ribosomas y proteínas ribosomales de células marcadas in vivo

### 2.7.1. Ruptura de las células de E. coli (20,41).

A 0,5 g de células marcadas radiactivamente se le agregaron 1,5 g de células frías crecidas en las mismas condiciones y se resuspendieron en 2,5 volúmenes de tampón C en presencia de macaloid (8 mg/gr de células) y lisozima (1 mg/ml concentración final). La suspensión se incubó a 37°C por 60 minutos, pasados los cuales se agregó DNAasa (10 ug/ml concentración final) y 2-mercaptoetanol (6 mM concentración final), seguido de una incubación a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, las células se sometieron a

sonicación por 5 períodos de un minuto cada uno con intervalos de 30 segundos en cada caso en un sonicador Braunasonic 1510. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 20.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una centrifugación a 30.000 x g por 30 minutos para obtener una fracción sobrenadante S-30. Los ribosomas 70S se obtuvieron por sedimentación a partir del S-30, centrifugándolo a 150.000 x g por 3 horas y media. La fracción sobrenadante obtenida en esta etapa se denominó S-150. El sedimento ribosomal se lavó dos veces resuspendiéndolo en tampón D y centrifugándolo posteriormente a 20.000 x g por 20 minutos con el objeto de eliminar el material agregado. El sobrenadante así obtenido se sometió a una centrifugación a 150.000 x g por 4 horas para recuperar los ribosomas lavados, los que se resuspendieron finalmente en tampón E a una razón de 100 unidades de densidad óptica a 260 nm por ml guardándose a -20°C.

#### 2.7.2. Ruptura de células de E. gracilis para obtener ribosomas citoplasmáticos.

Utilizando la mutante W<sub>10</sub>BSmL de E. gracilis o E. gracilis variedad bacillaris crecida en la oscuridad se pueden obtener ribosomas citoplasmáticos libres de contaminación con otro tipo de ribosomas (32,43). A 1 g de células marcadas radiactivamente se le agregaron 4 g de células frías, y se resuspendieron en un volumen de una



solución de sacarosa al 27% p/v preparada en tampón I para ser lavadas. Se resuspendieron luego en un volumen del mismo tampón y se pasaron a través de la prensa French, rompiéndose las células a una presión de 2.000-3.000 libras/pulgada<sup>2</sup>. El extracto obtenido se diluyó inmediatamente con un volumen de sacarosa al 27% p/v preparada en tampón I. Luego se centrifugó el extracto diluido a 3.000 x g por 5 minutos para eliminar los restos celulares y las células intactas, y el sobrenadante diluido se centrifugó ahora a 15.000 x g por 10 minutos para eliminar las membranas y las mitocondrias. El sobrenadante obtenido (correspondiente a 1/5 del volumen del extracto) se colocó cuidadosamente sobre un colchón de sacarosa al 40% p/v preparado en tampón K y se centrifugó a 105.000 x g por 5 horas.

Luego de la centrifugación, la solución de sacarosa al 27% p/v se removi6 por succi6n con ayuda de una bomba de vaci6, mientras que el sedimento ribosomal se resuspendi6 en el colch6n de sacarosa al 40% p/v. Posteriormente se diluyeron los ribosomas con un volumen de tamp6n K y se incub6 a 0°C durante 16 a 24 horas.

A continuaci6n, la suspensi6n ribosomal se centrifug6 a 15.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante que resulta se centrifug6 a 105.000 x g por 2 horas y media y el sedimento obtenido se resuspendi6 finalmente en tamp6n J y se volvi6 a centrifugar a 15.000 x g por 10 minutos. El

sobrenadante obtenido se volvió a colocar sobre un colchón de sacarosa al 40% p/v preparado en tampón J y se centrifugó a 105.000 x g por 16 horas. Este último sedimento representa los ribosomas citoplasmáticos purificados, los que se resuspendieron en tampón J a una razón de 100 unidades de densidad óptica a 260 nm por ml guardándose a -20°C.

### 2.7.3. Ruptura de células de E. gracilis para obtener ribosomas de cloroplastos.

Se crecieron células de E. gracilis variedad bacillaris a 28°C con agitación y luz artificial. A 1 g de células marcadas radiactivamente se le agregaron 4 g de células frías, y se lavaron con 6 volúmenes de tampón F, recuperándose las células por centrifugación a 3.000 x g por 5 minutos. Las células lavadas se resuspendieron en 2 volúmenes de tampón G y se pasaron por una prensa French a una presión de 3.000-4.000 libras/pulgada<sup>2</sup> o se rompieron por molienda en mortero con 2 volúmenes de arena. El extracto obtenido se diluyó con 1 volumen de tampón G y luego se centrifugó a 5.000 x g por 5 minutos para remover las células no rotas y la arena. El sobrenadante se filtró a través de gasa y se centrifugó nuevamente a 10.000 x g por 10 minutos para remover los restos celulares. El sobrenadante filtrado en gasa se centrifugó ahora a 30.000 x g por 30 minutos, se agregó NH<sub>4</sub>Cl para dar una concentración final de 0,5 M (para remover factores de la

síntesis proteica). El S-30 obtenido se centrifugó ahora a  $105.000 \times g$  por 6 horas. La superficie del sedimento ribosomal obtenido en esta centrifugación a alta velocidad se lavó con un volumen de tampón H, y luego de resuspenderlo en el mismo tampón se centrifugó a  $10.000 \times g$  por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a  $30.000 \times g$  por 30 minutos y del nuevo sobrenadante obtenido se recogen solamente las  $4/5$  partes (ribosomas impuros de cloroplastos).

La purificación de los ribosomas de cloroplastos se realizó mediante una gradiente lineal de sacarosa de 10 a 30% p/v preparada en tampón H. Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución patrón de sacarosa al 50%, la cual fue esterilizada en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para destruir la ribonucleasa contaminante que pudiera contener. Los gradientes se centrifugaron a  $20.000 \times g$  por 15 horas en un rotor Beckman SW 25.1 a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se colectaron fracciones de 1 ml (en un colector Gilson) y se midió la absorbancia de cada fracción a 260 nm, diluyendo 50  $\mu\text{l}$  de cada fracción en 1 ml de tampón H. Las fracciones correspondientes a los ribosomas 68S y 89S se recuperaron por centrifugación a 50.000 r.p.m. durante 15 horas en un rotor Beckman 65 a  $4^{\circ}\text{C}$ , los que se resuspendieron en tampón H a una razón de 50 unidades de densidad óptica a 260 nm por ml, guardándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  (42).

#### 2.7.4. Ruptura de células de S. carlsbergensis para obtener ribosomas citoplasmáticos.

A 1 g de células de S. carlsbergensis marcadas radiactivamente se le agregaron 4 g de células frías, se resuspendieron con 2 volúmenes de tampón L en presencia de beta-glucuronidasa (1 ml de enzima por 2,5 g de células). La suspensión se incubó a 30°C por 60-90 minutos y luego se centrifugó a 2.000 x g por 10 minutos. El sedimento de células o protoplastos obtenido se lavó 2 veces con el mismo tampón L. Luego se resuspendieron los protoplastos en 5 volúmenes de tampón LL y se rompieron en una licuadora durante 30 segundos. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 1500 x g por 5 minutos para separar los restos celulares y los fragmentos. El sobrenadante resultante se centrifugó luego a 10.000 x g por 10 minutos para eliminar las mitocondrias y el nuevo sobrenadante obtenido se centrifugó a 150.000 x g por 4 horas para obtener los ribosomas citoplasmáticos. Estos ribosomas se lavaron 2 veces con 4 volúmenes de tampón M, y luego se resuspendieron en tampón N a una razón de 100 unidades de densidad óptica a 260 nm por ml y se guardaron congelados a -20°C (44,45).

### 2.7.5. Análisis de ribosomas por centrifugación en gradientes analíticas de sacarosa.

Los diferentes ribosomas obtenidos se analizaron en gradientes continuos de concentración de sacarosa (10 al 30% p/v). Cada gradiente de 3 ml se cargó con 1,5 mg de cada uno de los diferentes tipos de ribosomas o bien con una mezcla de dos clases diferentes. La gradiente se centrifugó a 46.000 r.p.m. por 55 minutos a 4°C en un rotor Beckman SW 50 L. Se colectaron fracciones de 120 µl (en un colector Gilson) y se midió la absorbancia de cada fracción diluida en 1 ml de tampón correspondiente a cada tipo de ribosoma.

### 2.7.6. Preparación de proteínas ribosomales y medición de proteínas.

Las proteínas ribosomales de las diferentes células estudiadas se extrajeron de los respectivos ribosomas por tratamiento con ácido acético al 66% (46). Las proteínas obtenidas por este método se liofilizaron y se utilizaron directamente para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (47).

## 2.8. Análisis de las proteínas ribosomales metiladas o fosforiladas in vivo por electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida

El análisis de las proteínas metiladas o fosforiladas in vivo se realizó por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida por el método estándar descrito por Kaltschmidt y Wittmann (48). Para un mejor análisis se utilizó una cámara especial que permite la electroforesis bidimensional simultánea de 5 muestras, bajo condiciones idénticas.

### 2.8.1. Primera dimensión.

En la primera dimensión, se efectuó la separación de las proteínas ribosomales en un tubo cilíndrico de 100 mm de altura y 5 mm de diámetro, el cual contenía tres zonas de diferente concentración de acrilamida: gel de fondo, gel de muestra y gel superior. Los tubos se sellaron en la parte inferior con parafilm y se llenaron hasta 55 mm con solución de gel de fondo (5% acrilamida) y luego se cubrieron con 0,1 ml de solución de urea 4 M. Después de polimerizar (30 minutos a temperatura ambiente) se extrajo la solución de urea con papel filtro. En el siguiente paso las proteínas ribosomales (1 mg de proteínas) se resuspendieron en 0,2 ml de gel de muestra (4% acrilamida) y se transfirieron con pipeta Pasteur a la superficie del gel

de fondo ya polimerizado. El gel de muestra se cubrió con 0,1 ml de urea 4 M y se polimerizó en presencia de luz ultravioleta de onda corta y larga (1 a 2 horas a temperatura ambiente). Después de remover la urea con papel filtro, el tubo se llenó hasta el extremo con el gel superior (10% de acrilamida) y se cubrió con 0,1 ml de urea 4 M. Luego de polimerizar la poliacrilamida, los tubos se colocaron en un aparato de electroforesis Hoeffer Scientific Instruments modelo DE 101 y se llenaron los compartimientos del ánodo y cátodo con solución tampón de electrodos a pH 8,6. El compartimiento superior se conectó al ánodo y el compartimiento inferior al cátodo. La electroforesis se realizó durante 17 horas a 75 volts y a 4°C. Después de este período los geles se extrajeron cuidadosamente de los tubos de vidrio para ser utilizados en la segunda dimensión del método.

Soluciones utilizadas en la primera dimensión.

Gel de fondo (5% acrilamida). Esta solución contenía: 18 g de urea; 2,5 g de acrilamida; 0,09 g de bisacrilamida; 1,6 g de ácido bórico; 2,3 g de Tris y agua destilada en cantidad suficiente para 49,5 ml. Luego de desairear la solución en frío por 10 minutos con una bomba de vacío, se agregaron 0.15 ml de TEMED y 0,4 ml de solución de persulfato de amonio al 7% recién preparada.

Gel de muestra (4% acrilamida). Esta solución se componía de 3 soluciones, denominadas: Mezclas I, II y III.

**Mezcla I:** 24 g de urea; 2 g de acrilamida; 0,1 g de bis acrilamida; 0,043 g de EDTA- $\text{Na}_2$ ; 0,16 g de ácido bórico y agua destilada en cantidad suficiente para 49,5 ml.

**Mezcla II:** 5 mg de persulfato de amonio en 1 ml de solución de riboflavina que contiene 5 mg/10 ml de agua.

**Mezcla III:** Se combinan 10 ml de la mezcla I con 0,1 ml de mezcla II en un tubo cubierto con papel de aluminio. Se utilizaron 0,2 ml de esta mezcla para disolver las muestras de proteínas.

Gel superior (10% de acrilamida). Esta solución contenía 18 g de urea; 5 g de acrilamida; 0,19 g de bis acrilamida; 0,4 g de EDTA- $\text{Na}_2$ ; 1,6 g de ácido bórico; 2,4 g de Tris y agua destilada suficiente para 49,5 ml. Luego de desairear por 10 minutos en frío con una bomba de vacío, se agregaron 0,15 ml de TEMED y 0,4 ml de persulfato de amonio al 7% recién preparado.

Tampón de electrodos de la primera dimensión. Este tampón contenía: 770 g de urea; 4,8 g de EDTA- $\text{Na}_2$ ; 19,5 g de ácido bórico; 29,5 g de Tris y agua destilada en cantidad suficiente para 2 litros. El pH final de la solución fue de 8,6.



### 2.8.2. Segunda dimensión.

En la segunda dimensión se utilizó el aparato descrito por Kaltschmidt y Wittman, excepto que el tamaño del gel se redujo a 100 mm<sup>2</sup>. Cada compartimiento del aparato destinado a formar la placa del gel se selló con parafilm y tela adhesiva en el extremo inferior. A cada uno de los 5 compartimientos así sellados, se agregaron 3 ml del gel de sellado (25% de acrilamida). Después de polimerizar (15 minutos a temperatura ambiente) se llenó cada compartimiento con el gel de separación vertiéndolo sobre el gel de sellado, evitando que se formaran burbujas de aire. Inmediatamente, se colocó sobre el gel de separación aún no polimerizado, el gel cilíndrico de la primera dimensión y se cubrió con más gel de separación. Después de polimerizar el gel de separación y ya soldado con el gel cilíndrico de la primera dimensión, se retiró el parafilm y la tela adhesiva de los extremos inferiores de las placas de gel y se llenaron los compartimentos del ánodo y cátodo con tampón de electrodos de la segunda dimensión a pH 4,5. La electroforesis se llevó a cabo durante 23 horas a 75 volts y a 4°C. El ánodo se conectó al compartimiento superior del equipo de electroforesis.

Soluciones utilizadas en la segunda dimensión.

Gel de separación. Esta solución de gel contenía: 93,1 g de urea; 46,54 g de acrilamida; 1,2 g de bis

acrilamida; 13,56 ml de ácido acético glacial; 2,48 ml de KOH 5 N y agua destilada en cantidad suficiente para 250 ml. Después de disolver los componentes, se separaron 50 ml de esta solución para el gel de sellado. Los 200 ml restantes se desairearon en frío durante 30 minutos con una bomba de vacío y luego se agregaron 0,79 ml de TEMED y 6,7 ml de persulfato de amonio al 7% p/v recién preparado; las soluciones se mantuvieron siempre en hielo.

Gel de sellado. Esta solución contenía: 50 ml de gel separación; 3,5 g de acrilamida y 0,085 g de bis acrilamida. Después de desairear la solución por 10 minutos en frío se agregaron 0,49 ml de TEMED y 2,5 ml de persulfato de amonio al 10% p/v recién preparado.

Tampón de electrodos de la segunda dimensión. Este tampón contenía 42 g de glicina, 9 ml de ácido acético glacial y agua destilada en cantidad suficiente para 3 litros.

Tinción de los geles bidimensionales. Después de sacar cuidadosamente los geles en placas del equipo de electroforesis, estos se tñeron durante 15 minutos con solución de amido black al 0,55% p/v en ácido acético al 5%. Las placas de geles se lavaron con agua corriente durante una hora para eliminar el exceso de colorante y se destñeron en ácido acético al 1% por 48 horas. El ácido acético se cambió 4 a 6 veces durante el destñido.

### 2.8.3. Identificación de las proteínas ribosomales.

Para identificar y comparar las distintas proteínas extraídas de los diferentes ribosomas se numeraron aquellas manchas que aparecieron en forma reproducible en la misma posición del gel bidimensional. La numeración se hizo siguiendo líneas horizontales imaginarias comenzando en el extremo superior izquierdo. Esta convención fue descrita por Kaltschmidt y Wittmann (48).

### 2.9. Método para determinar las proteínas ribosomales metiladas

El método utilizado en el laboratorio para determinar las proteínas ribosomales metiladas, fue desarrollado por Chang y Chang (20). Este consiste fundamentalmente en crecer células en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $^{14}\text{C}$ )metionina, incorporándose ambos isótopos indistintamente a las cadenas polipeptídicas. Después de aislar y separar las proteínas ribosomales así marcadas mediante la electroforesis bidimensional ya descrita, se determina la radiactividad incorporada y la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de cada una de ellas. Aquellas proteínas que contengan grupos metilo en sus cadenas laterales (metiladas) tendrán un exceso de grupos metilo cuando se las compara con las no metiladas y por lo tanto, deberían presentar una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mayor que estas últimas. De esta manera se

consideran como metiladas aquellas proteínas que poseen una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mayor que la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  promedio de las proteínas ribosomales totales antes de su separación (Fig. 2).

## 2.10. Método para determinar las proteínas ribosomales fosforiladas

Las proteínas fosforiladas se determinaron midiendo directamente la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en cada mancha separada después de una electroforesis bidimensional como en el caso anterior.

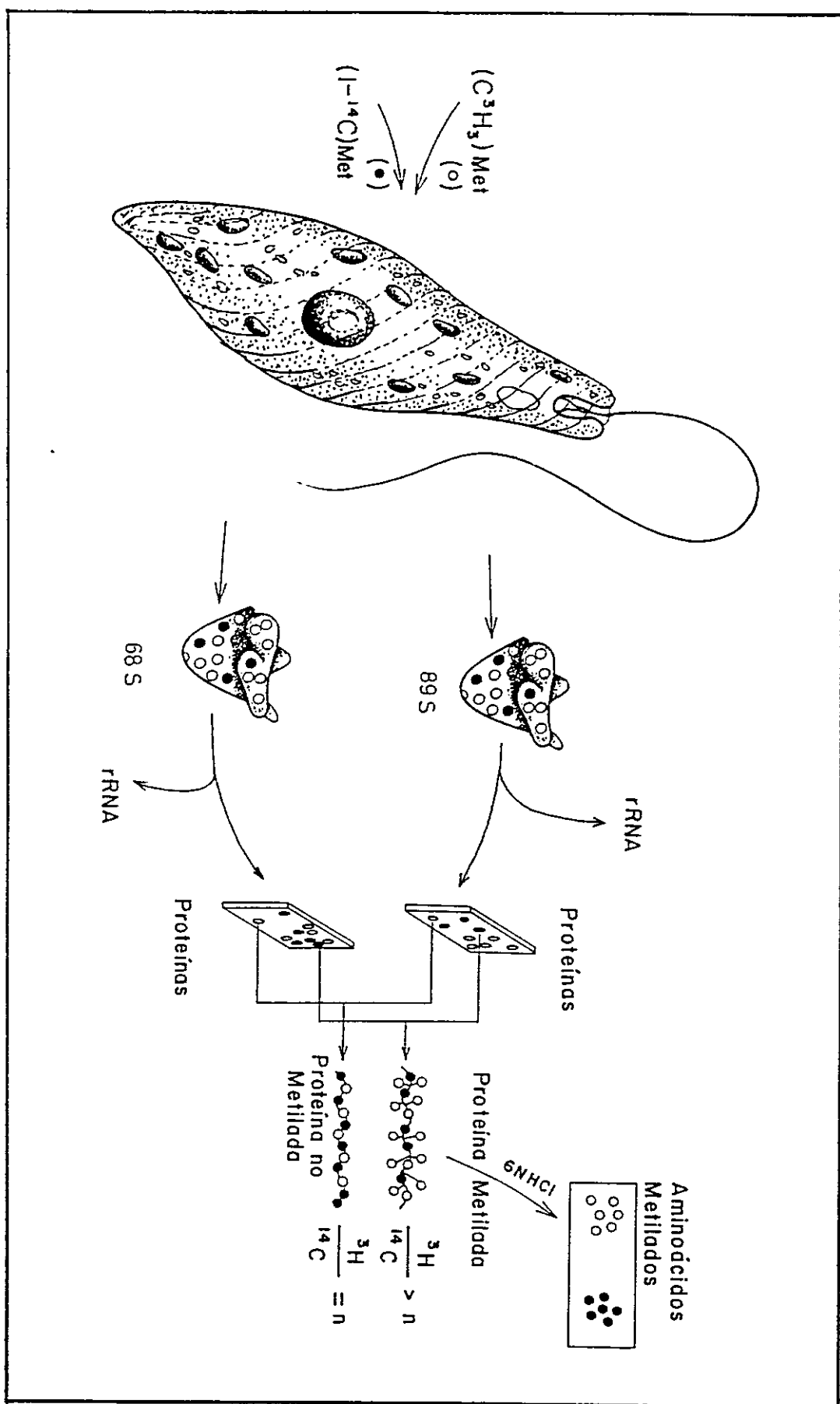
### 2.10.1. Determinación de la radiactividad

Para determinar la radiactividad de cada proteína, las manchas teñidas y numeradas se cortaron del gel con ayuda de un bisturí. Cada trozo de gel se trató con 0,4 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% por 12 horas a  $55^\circ\text{C}$  en frascos de centelleo cerrados. Una vez disueltos los trozos de gel y después de enfriar, se adicionó a cada frasco 5 ml de líquido 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. Para determinar la radiactividad se utilizó un contador de centelleo Tracor Analytic Delta 300 con un programa para  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ó  $^{32}\text{P}$  con una eficiencia de 25% para  $^3\text{H}$ ; 60% para  $^{14}\text{C}$  y 95% para  $^{32}\text{P}$ .

Para medir la radiactividad incorporada en células enteras, alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  del cultivo se trataron con TCA

FIGURA 2. Método para determinar las proteínas ribosomales metiladas en diferentes microorganismos.

( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )metionina se incorporan a todas las proteínas de la célula, marcando los ribosomas. Estos se pueden aislar, disociar y sus proteínas ser extraídas. Estas se separan por electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida. Aquellas proteínas que presentan grupos metilo en exceso (metiladas) tendrán una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mayor que el valor de la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de la mezcla de las proteínas antes de la separación. Luego de hidrolizar las proteínas individuales con  $\text{HCl } 6 \text{ N}$ , se analizan los aminoácidos por cromatografía descendente en papel.



en caliente filtrándose la muestra en filtros de fibra de vidrio GF/C, se secaron los filtros y se colocaron en frascos de centelleo, se adicionó a cada frasco 5 ml de líquido de centelleo que contenía: 5 g de PPO; 0,1 g de POPOP y tolueno en cantidad suficiente para un litro de solución y se determinó su radiactividad.

## 2.11. Análisis de los aminoácidos metilados

### 2.11.1. Hidrólisis de las proteínas ribosomales marcadas.

Para determinar los aminoácidos metilados en los diferentes ribosomas, se obtuvieron éstos y sus proteínas ribosomales marcadas se extrajeron con ácido acético al 66% como ya se describió. Alrededor de 1 mg de cada muestra de proteínas ribosomales radiactivas se liofilizó y posteriormente se hidrolizaron las proteínas con 1 ml de HCl 6 N por 24 horas a 110°C en tubos sellados al vacío (49). El hidrolizado se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio marca BUCHI empleando una temperatura de 40°C. Finalmente las muestras que contenían los aminoácidos metilados se disolvieron en 100 µl etanol al 50% y el análisis de los aminoácidos metilados se hizo por cromatografía descendente en papel.

### 2.11.2. Cromatografía descendente en papel.

Se realizó en papel Whatman N° 1 de 57 x 23 centímetros durante 15 horas a temperatura ambiente. El sistema de solvente empleado fue piridina-acetona-NH<sub>4</sub>OH 3 M (50:30:25: v/v) (12). A 100 µl de la muestra de hidrolizado de proteínas se agregaron 10 µg de DPN-Lys, como marcador del frente del solvente, y 10 µg de cada uno de los siguientes estándares: metionina, metionina sulfóxido, metionina sulfona, lisina, monometil-lisina y trimetil-lisina. La mezcla se aplicó a 9 centímetros de uno de los extremos del papel. Para localizar los aminoácidos después de la cromatografía, se pulverizó el papel con ninhidrina al 0,4% en acetona y se calentó a 70°C por 10 minutos. Para determinar la radiactividad presente en los aminoácidos, se cortó el papel en tiras de 0.5 x 2,5 centímetros, las que se colocaron en frascos de centelleo a los cuales se les adicionó 0.5 ml de agua destilada. Los frascos se agitaron durante 15 horas a temperatura ambiente y se agregaron a continuación 5 ml de líquido de centelleo con tritón X-100 y se procedió a contar cada muestra como se indicó anteriormente.



## 2.12. Determinación de fosfoaminoácidos

Las proteínas ribosomales (1mg) se hidrolizaron con HCl 5,7 M durante 2 horas a 110°C (50,51). Esto se realizó en tubos Pyrex con tapa y sin necesidad de sellarlos al vacío. Luego se evaporó el ácido en un evaporador rotatorio y se disolvió la muestra hidrolizada en 100 µl de una mezcla de H<sub>2</sub>O y alcohol 1:1.

El análisis de los fosfoaminoácidos se realizó por cromatografía en capa fina en una placa de celulosa de 20 x 20 centímetros Kodak N° 6064. Se marcó una línea a 2 centímetros del borde donde se aplicó 1 µg de cada estándar (fosfoserina, fosfotirosina y fosfotreonina) y la muestra hidrolizada (30-50 µg de proteína), y se corrió durante 10 horas. El solvente de la cromatografía contenía ácido isobutírico:hidróxido de amonio 0,5 M 5:3 (51). Para localizar los aminoácidos después de la cromatografía se pulverizó la placa con ninhidrina al 0,4%.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. Crecimiento y marcación de E. gracilis.

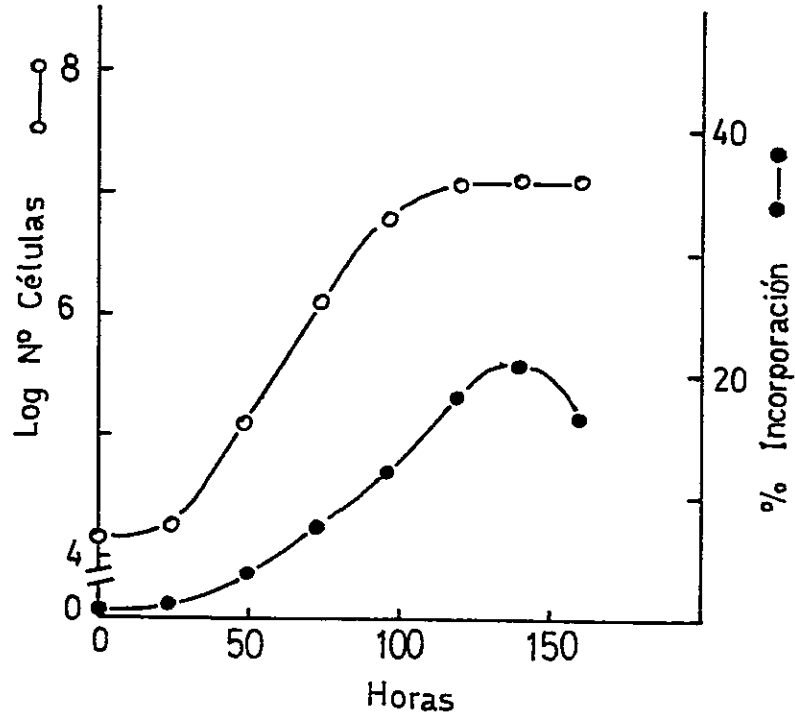
El protozoo E. gracilis puede crecer autotróficamente en presencia de luz y utiliza por lo tanto  $\text{CO}_2$  como una fuente importante de carbono. Para poder medir la metilación de los ribosomas de cloroplastos por el método escogido es indispensable que el microorganismo incorpore metionina. En general los microorganismos autotróficos incorporan muy bajos niveles de compuestos orgánicos (52). Por ello fue necesario como primera etapa, comprobar si la E. gracilis era capaz de incorporar metionina en presencia de luz. Para estudiar los ribosomas de cloroplastos empleamos E. gracilis variedad bacillaris. Para aislar los ribosomas citoplasmáticos libres de una posible contaminación con ribosomas cloroplásticos, se empleó la mutante  $W_{10}$ BSmL de E. gracilis que no poseen cloroplastos (40).

Ambos tipos de células se crecieron en medio de Hunter como se describe en Materiales y Métodos y como se aprecia en la Fig. 3, cada clase de células muestra igual capacidad de crecimiento, obteniéndose alrededor de  $10^7$  células/ml en la fase estacionaria. Sin embargo, la incorporación de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina en la mutante es un 50% menor comparada con aquella de las células silvestres. Esta menor incorporación del aminoácido radiactivo en las

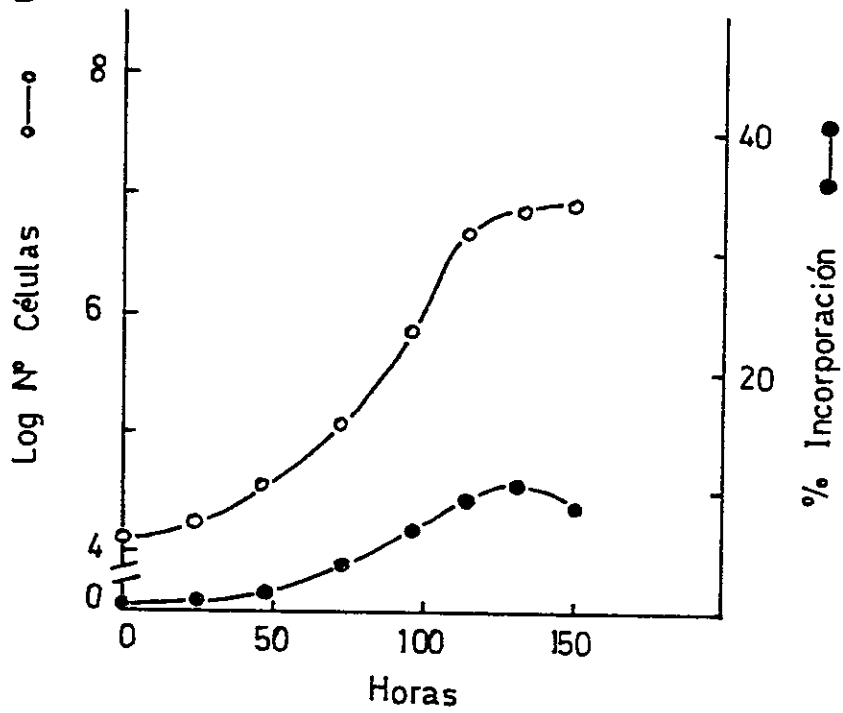
FIGURA 3. Incorporación in vivo de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina en E. gracilis

Se crecieron células de E. gracilis variedad bacillaris (A) y E. gracilis W<sub>10</sub>BSmL (B), en presencia de luz y 10  $\mu\text{Ci}$  de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina en 50 ml de medio Hutner, se midió el crecimiento y la incorporación total del isótopo a los componentes celulares como se describe en Materiales y Métodos. En A, 100 % de incorporación = 5.698.700 cpm; B, 100 % de incorporación = 4.092.000 cpm. No se detectó diferencias en el tamaño de ambos tipos de células.

A



B



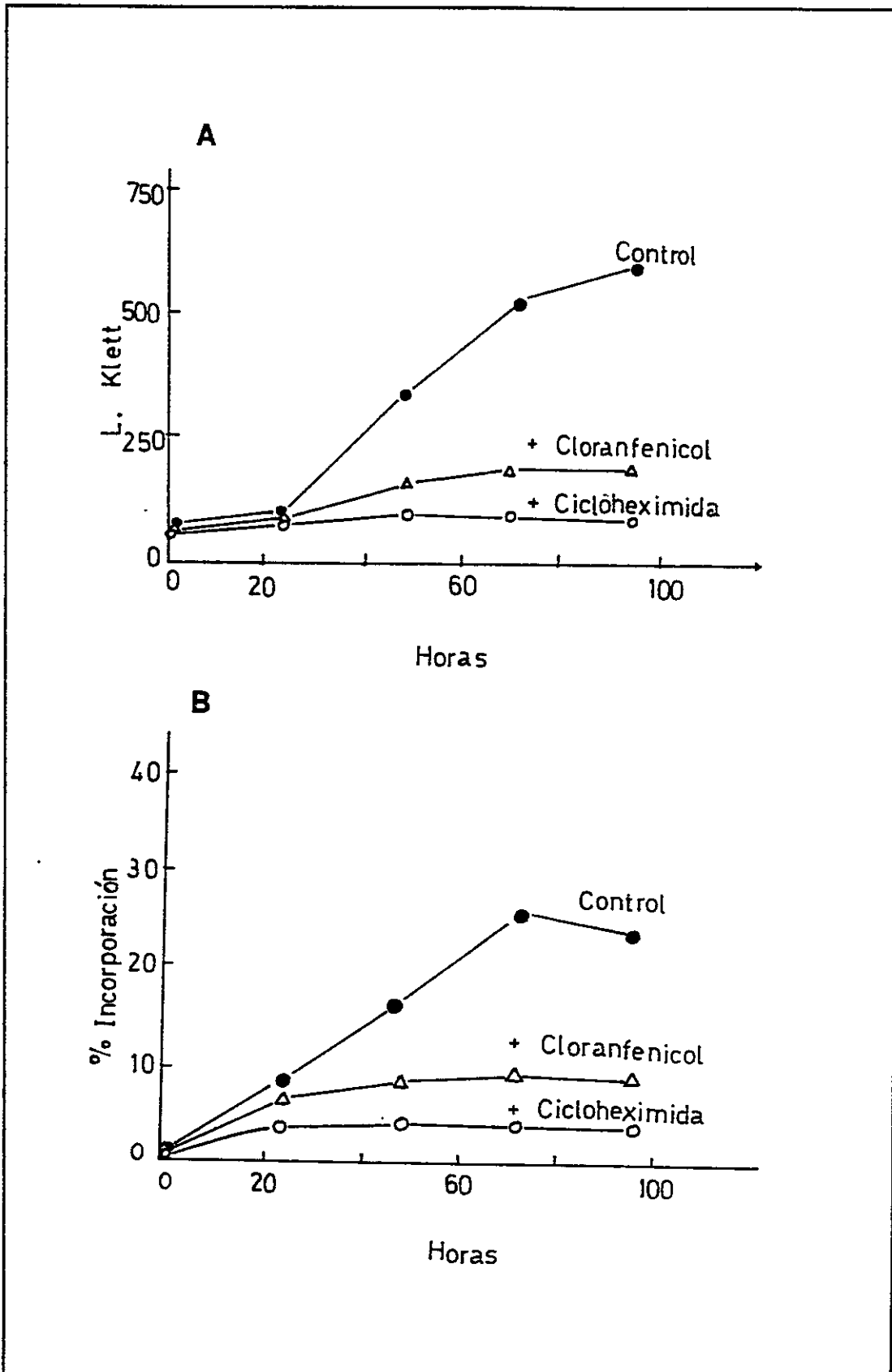
células de la mutante se debe probablemente a que éstas no poseen cloroplastos y por lo tanto carecerían de la radiactividad que incorporan éstos en las células silvestres.

### 3.2. Efectos de cicloheximida y cloranfenicol sobre el crecimiento y marcación de *E. gracilis*

Habiendo establecido que *E. gracilis* es capaz de incorporar metionina en cantidades relativamente similares a las que incorporan las bacterias (13), comprobamos que esta incorporación ocurría también en los cloroplastos mediante la acción de antibióticos. Por otro lado, es importante considerar que una posible contaminación bacteriana podría falsear los resultados. Para comprobar esto se cultivó *E. gracilis* en presencia de (<sup>3</sup>H-metil)metionina con cicloheximida o cloranfenicol. Como se observa en la Fig. 4, en presencia de cicloheximida tanto el crecimiento como la incorporación del aminoácido se ven afectados por este antibiótico, que inhibe la síntesis proteica en los sistemas eucariontes (8). Como la cicloheximida inhibe específicamente a las células eucarióticas, si la incorporación de (<sup>3</sup>H-metil)metionina se debiera a la presencia de bacterias, esta no debería afectarse en presencia del antibiótico. Estos resultados por lo tanto nos

FIGURA 4. Efecto de cicloheximida y cloranfenicol sobre el crecimiento e incorporación de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina en E. gracilis

Se crecieron células de E. gracilis variedad bacillaris a  $28^\circ\text{C}$  en presencia de luz y  $7,5 \mu\text{Ci}$  de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina en 50 ml de medio Hutner, ya sea en ausencia de antibiótico ( $\text{---}\bullet\text{---}\bullet\text{---}$ ) o en presencia de cicloheximida ( $15 \mu\text{g/ml}$  concentración final) ( $\text{---}\circ\text{---}\circ\text{---}$ ) o en presencia de cloranfenicol ( $2 \text{ mg/ml}$  concentración final) ( $\text{---}\triangle\text{---}\triangle\text{---}$ ). El crecimiento (A) se siguió midiendo el aumento en la lectura Klett ( $660 \text{ nm}$ ) y la incorporación del isótopo (B) se midió como material precipitable por TCA en caliente, como se describe en Materiales y Métodos. A las 98 horas se observaron en el control  $1,04 \times 10^6$  cpm incorporadas, en presencia de cloranfenicol  $3,6 \times 10^5$  cpm incorporadas y con cicloheximida  $1,6 \times 10^5$  cpm incorporadas.



indican que la incorporación de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina está ocurriendo únicamente en un eucariote.

Por otro lado, en presencia de cloranfenicol, que inhibe la síntesis de proteínas en procariontes e inhibe el desarrollo del cloroplasto en E. gracilis (8), se ven afectados en forma parcial tanto el crecimiento como la incorporación del isótopo. Esto se debe probablemente a que, a pesar de que las células se crecieron en presencia de luz, hay una inhibición de la síntesis de los cloroplastos, y las células no crecen por falta de una fijación de  $\text{CO}_2$  adecuada. La inhibición de la incorporación de metionina es parcial porque a pesar de que no habría incorporación en los cloroplastos, sí ocurre ésta en las proteínas citoplasmáticas. La posible presencia de algún contaminante eucariótico se controló siempre por análisis al microscopio óptico al inicio y al final de cada cultivo.

### 3.3. Purificación de ribosomas de cloroplasto en gradientes de sacarosa

Hasta el advenimiento del método descrito por Graves, Breitenberger y Spremuli (42), era difícil obtener ribosomas de cloroplastos de E. gracilis, los que se degradaban con facilidad (42). Este método tiene la ventaja de que al emplear una alta concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  (40 mM) precipitan selectivamente los ribosomas citoplasmáticos,



como se describe en Materiales y Métodos. Los ribosomas que se obtienen normalmente con el método en cuestión, sedimentan con un coeficiente aproximado a 68S como se muestra en la Fig. 5. Finalmente, estos clororibosomas obtenidos se purificaron por una segunda gradiente de sacarosa en las mismas condiciones.

La pureza de los clororibosomas 68S (42) y de los ribosomas citoplasmáticos 89S de E. gracilis (32,53), se analizó mediante centrifugación en gradientes analíticas de sacarosa. Como controles se utilizaron ribosomas 70S de E. coli (54) y ribosomas 80S de S. carlsbergensis (17). En la Fig. 6 se muestran las gradientes analíticas obtenidas con estos ribosomas. Se aprecia en general un buen grado de pureza para los ribosomas utilizados y como era de esperar, los ribosomas de cloroplasto presentan un tamaño que corresponde a los de tipo procariótico (Fig. 6 A, B) y los ribosomas del citoplasma de E. gracilis muestran el tamaño característico del tipo eucariótico (Fig. 6 C, D). Esto se corrobora analizando el comportamiento de una mezcla de ambos tipos de ribosomas purificados en la gradiente (Fig. 6 E y F).

FIGURA 5. Purificación de ribosomas de cloroplasto mediante centrifugación en gradientes de sacarosa.

Se aislaron ribosomas de cloroplastos de E. gracilis variedad bacillaris como se describe en Materiales y Métodos, y se purificaron colocando 12 mg de ribosomas en cada gradiente lineal de sacarosa al 10-30 %. Después de centrifugar a 20.000 rpm x 15 horas (rotor Beckman SW 25.1), se recolectaron fracciones de 1 ml y se determinó la absorbancia a 260 nm de cada una de ellas. Las fracciones indicadas por la región achurada se mezclaron y los ribosomas de cloroplastos libres de contaminantes se recuperaron por una nueva centrifugación. El aumento de densidad es de izquierda a derecha.

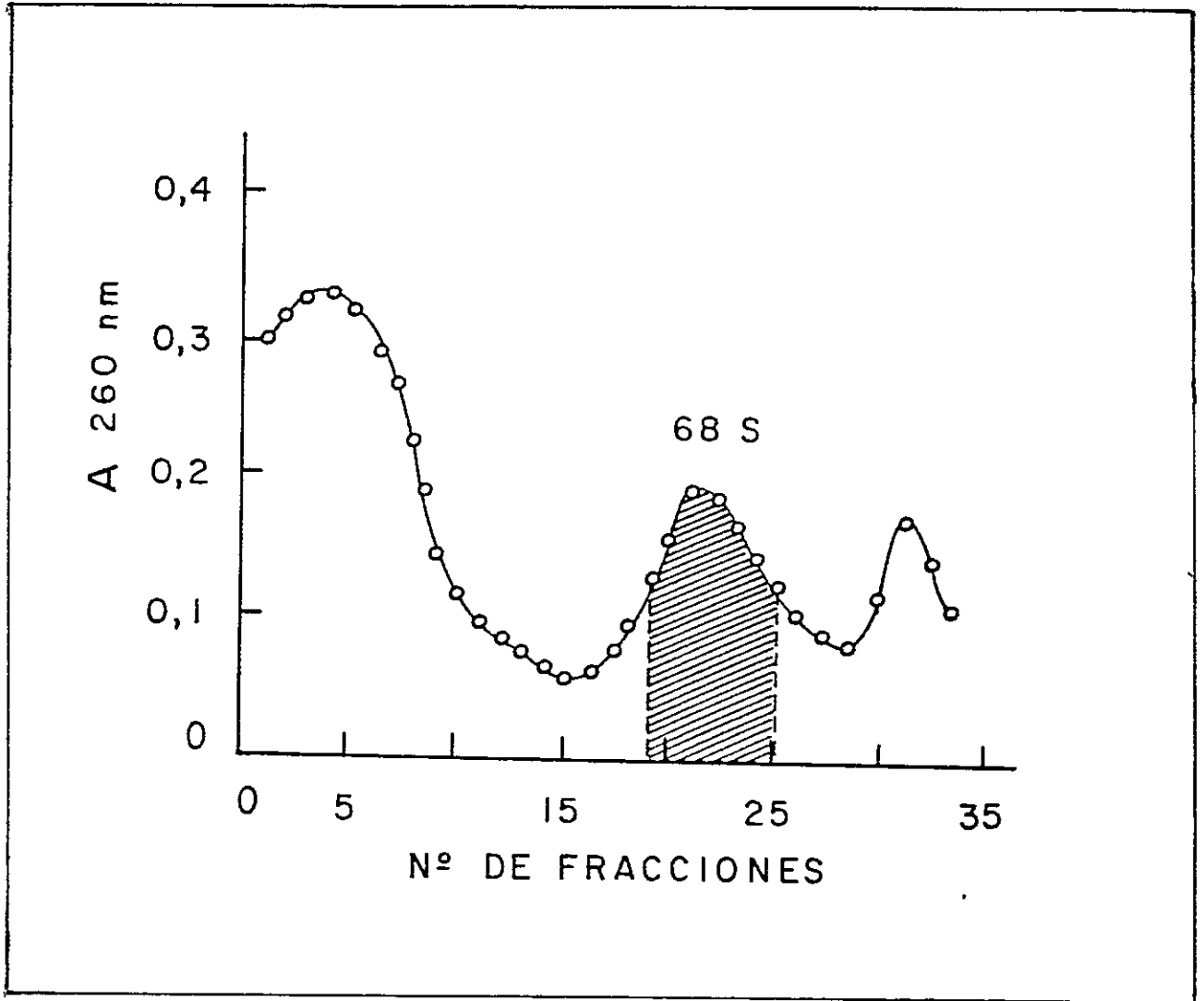
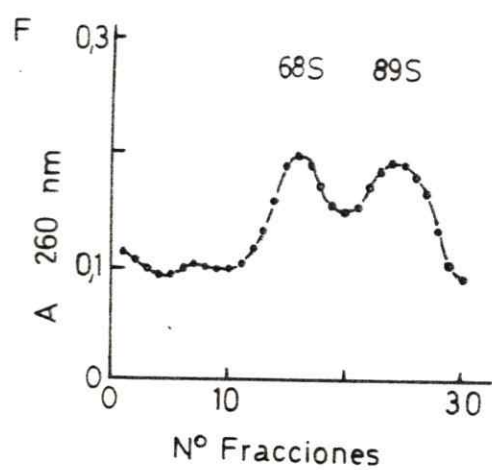
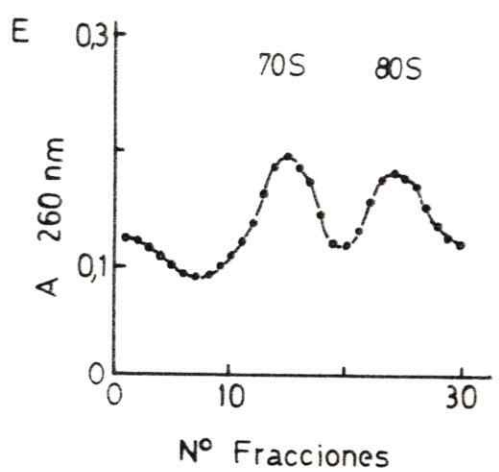
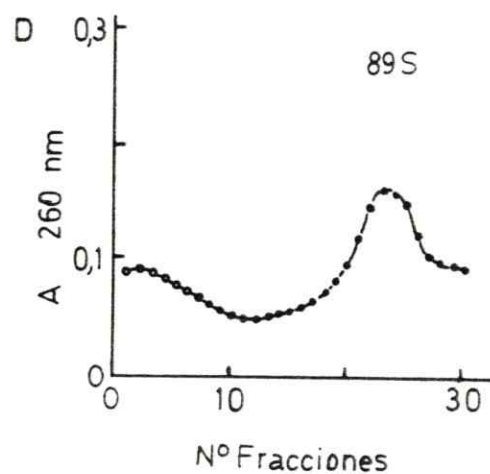
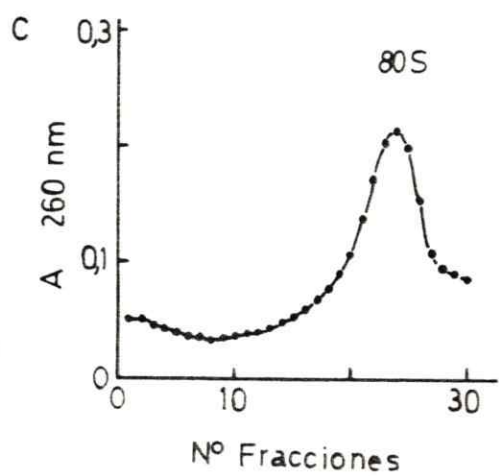
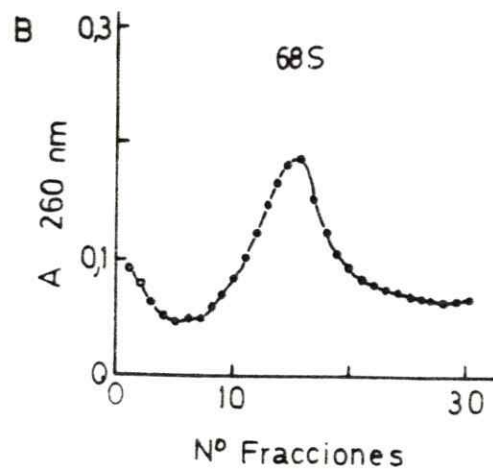
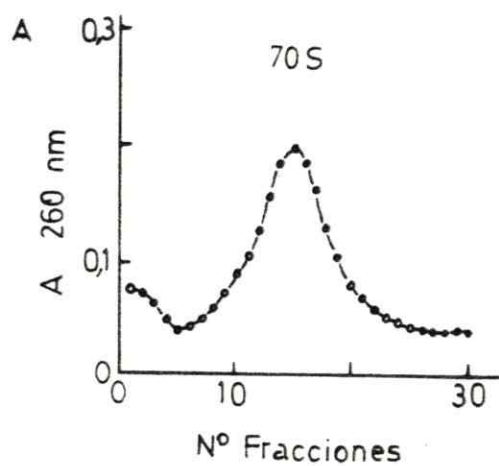


FIGURA 6. Comparación de los cloronribosomas con ribosomas de diferentes organismos.

Los ribosomas aislados y purificados de E. gracilis y los de otros microorganismos (1,5 mg de cada uno) se cargaron en gradientes analíticos lineales de sacarosa del 10 al 30% y se centrifugaron a 48.000 rpm por 1,5 horas en un rotor Beckman SW 50 L. Se colectaron fracciones de 0,1 ml y se determinó la absorbancia de cada una a 260 nm. A, ribosomas 70 S controles de E. coli; B, ribosomas de cloroplastos 68 S; C, ribosomas 80 S controles de S. carlsbergensis; D, ribosomas citoplasmáticos 89 S de E. gracilis; E, mezcla de ribosomas de E. coli y de S. carlsbergensis; F, mezcla de ribosomas de cloroplastos 68 S y citoplasmáticos 89 S de E. gracilis. Los distintos coeficientes de sedimentación fueron obtenidos de la literatura (1). El aumento de densidad es de izquierda a derecha.



### 3.4. Determinación de las proteínas ribosomales metiladas mediante electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida.

La metilación de las diferentes proteínas se determinó por el método de Chang y colaboradores (12,13,20,52). Las células se crecieron en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)- metionina y ( $^{14}\text{C}$ )metionina, incorporándose ambos isótopos a las proteínas. Se consideraron metiladas aquellas proteínas que presentaron una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mayor que la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  del total de las proteínas sin fraccionar (13,20). Este método es muy sensible para proteínas con bajo contenido de metioninas, como lo son las proteínas ribosomales (12,13,20).

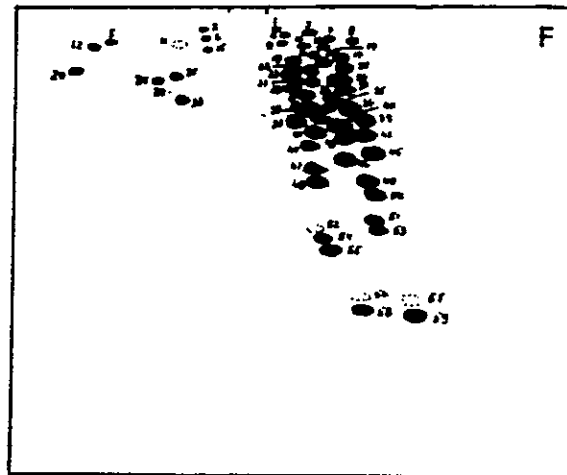
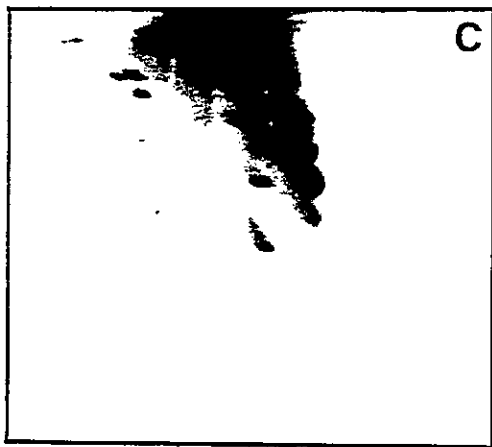
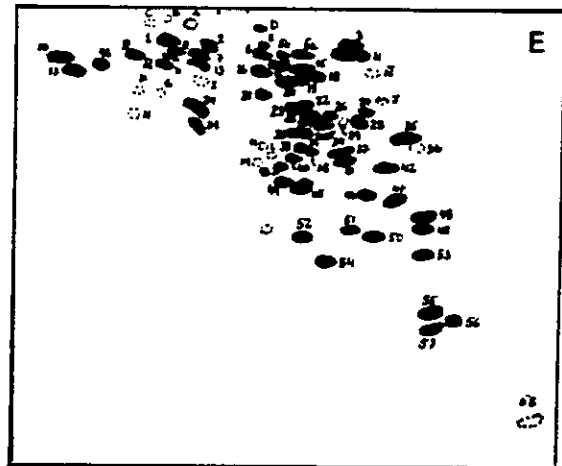
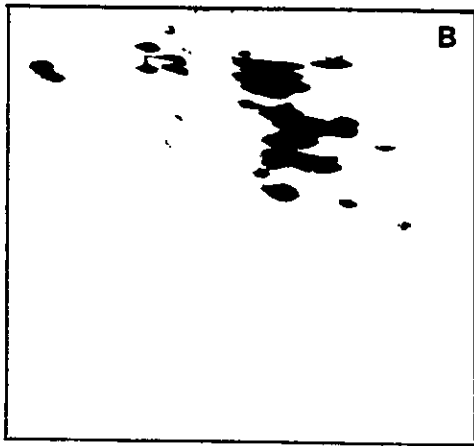
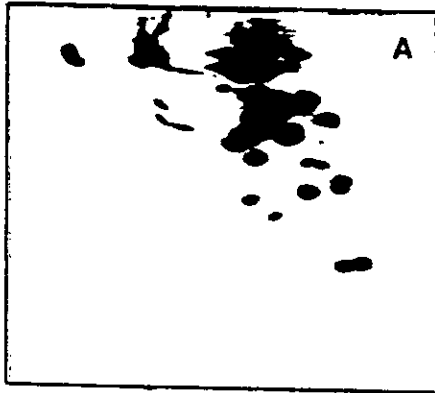
En la fig. 7 se muestra la migración electroforética de las proteínas ribosomales de E. coli y E. gracilis. En A, B y C podemos ver la separación de las proteínas y en D, E y F la representación diagramática de esta separación en la que se indica el sistema de numeración utilizado para identificar cada una de las proteínas ribosomales estudiadas. Las proteínas de E. coli fueron numeradas, de acuerdo a la ubicación y nomenclatura ya descrita para el total de las proteínas ribosomales (54).

Aunque las proteínas ribosomales de E. coli y E. gracilis (cloroplasto y citoplasma) habían sido caracterizadas previamente por electroforesis bidimensional

FIGURA 7. Separación de las proteínas de diferentes ribosomas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

Después de crecer los diferentes organismos en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $^{14}\text{C}$ -metionina se aislaron las proteínas ribosomales como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas radiactivas (1 mg) se separaron luego por electroforesis bidimensional. En A, B y C, se muestra la separación electroforética de las proteínas. En D, E y F, se muestra la representación diagramática de las proteínas y su numeración. Las diferencias entre el número de manchas que aparecen en los diagramas y aquellas que aparecen en las fotografías se debe a que en estas últimas no aparecen muchas manchas debilmente teñidas.

Proteínas ribosomales 70 S de E. coli (A y D), 68 S de E. gracilis variedad bacillaris (B y E) y 89 S de E. gracilis mutante  $W_{10}$ BSmL (C y F).





en geles de poliacrilamida (53,54), es interesante recalcar la similitud general del patrón de migración de las proteínas provenientes de los ribosomas 70S de E. coli y de aquellas provenientes de los ribosomas 68S de cloroplastos en cuanto al número de proteínas presentes (entre 55 y 60) y la distribución de las proteínas en el gel, sobre todo en la región básica del mismo. Aunque los ribosomas citoplasmáticos generalmente contienen alrededor de 70 proteínas, el menor número aparente que encontramos (Fig. 7 C, F) se debe a que en estas condiciones la resolución de estas proteínas no es completa y algunas de las manchas pueden representar 2 ó 3 proteínas sin separar.

A continuación se analizó cada mancha identificada, extrayéndola del gel y determinando tanto su radiactividad como su razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  correspondiente. Estos resultados se muestran en la Tabla II, donde se indican las proteínas metiladas utilizando el criterio ya descrito. Como control se determinó la metilación de las proteínas 70S de E. coli que ya ha sido descrita previamente (12,20). Nuestros resultados confirman aquellos de Chang y Chang para E. coli (20), ya que encontramos que no solo L11 es la proteína más metilada, sino que varias otras proteínas metiladas coinciden con las ya descritas (por ejemplo L5, L 16, L1, S11, etc). El número de proteínas metiladas en cloroplastos (Tabla II) es similar al número de proteína metiladas en E. coli (12,18,20). Por otro lado, el número

TABLA II

Proteínas metiladas en los ribosomas de *E. gracilis*.

Clororribosomas			
Proteínas	$^3\text{H}$ cpm	$^{14}\text{C}$ cpm	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
A	749	277	2,7
E	324	136	2,4
4	566	202	2,8
5b	419	177	2,4
7	95	47	2,2
14	382	164	2,3
18	708	153	4,6
22	688	236	2,9
23	200	82	2,4
25	265	98	2,7
Proteínas ribosomales totales sin fraccionar			
	7667	4594	1,7
Citorribosomas			
Proteínas	$^3\text{H}$ cpm	$^{14}\text{C}$ cpm	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
39	968	220	4,4
41	1629	370	4,4
47	825	242	3,4
49	805	168	4,8
51	645	99	6,5
56	825	249	3,3
Proteínas ribosomales totales sin fraccionar			
	26011	11887	2,2

Los métodos utilizados para el crecimiento y marcación de células, purificación de ribosomas y extracción de proteínas ribosomales fueron descritos en Materiales y Métodos. Las manchas correspondientes a las proteínas identificadas y separadas en geles bidimensionales de poliacrilamida se cortaron del gel y se determinó el contenido de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  de cada una y su razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ .

Para facilitar la comparación, solo se incluyen en esta tabla aquellas proteínas que se consideran metiladas de acuerdo a la diferencia entre su cociente  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  y el valor respectivo para el total de las proteínas sin fraccionar (12,13,18,20). El resto de las proteínas de la Fig. 7 presentaron un valor para la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  igual o menor que el valor respectivo para el total de las proteínas ribosomales sin fraccionar.

de proteínas metiladas en los ribosomas citoplasmáticos es menor que en los ribosomas ya mencionados.

En la Fig. 8 se muestra una comparación general de la metilación y la movilidad electroforética de las proteínas ribosomales que se encontraron metiladas en E. gracilis y en E. coli. Se puede apreciar que tal como ocurre en E. coli, la mayoría de las proteínas metiladas de E. gracilis, ya sea de los cloroplastos o de los ribosomas citoplasmáticos, son de carácter básico. El patrón de movilidad electroforética de las proteínas ribosomales metiladas de cloroplastos en términos generales presenta algunas similitudes con el de las proteínas metiladas de E. coli. Esto no es de extrañar ya que el patrón general de movilidad electroforética de las proteínas de cloroplastos, es similar al de E. coli (Fig. 7 A, B), lo cual sugiere una posible similitud estructural entre ambos grupos de proteínas. Así la proteína de cloroplasto más metilada presente en la parte básica del gel migra en una posición relativamente similar a la de la proteína L11 de E. coli que es también la más metilada en esta bacteria (1) y se encuentra presente y metilada en varios procariontes (13,15). En cambio, el patrón de modificación de las proteínas ribosomales de los ribosomas citoplasmáticos difiere del de E. coli tanto en el número como en la movilidad electroforética de las proteínas (Fig. 7 C y Fig. 8).

FIGURA 8. Movilidad electroforética de proteínas metiladas en electroforesis bidimensional. Las proteínas que son metiladas se identificaron en la representación diagramática de los geles bidimensionales (Fig. 7). La posición de cada mancha se normalizó considerando el "Rd" de cada una como la razón entre la distancia recorrida por la mancha y la distancia desde el origen hasta el extremo de la placa en cualquier dimensión. Proteínas ribosomales citoplasmáticas 89 S ( X ), de cloroplasto 68 S ( □ ) y de E. coli 70 S ( ● ).



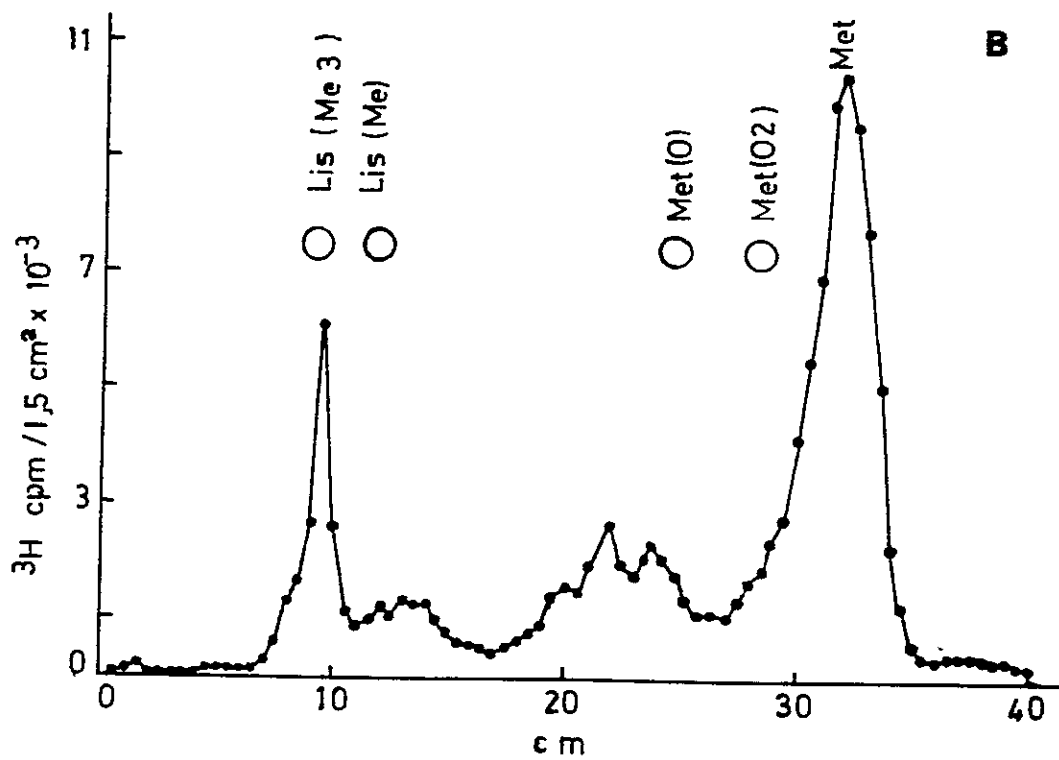
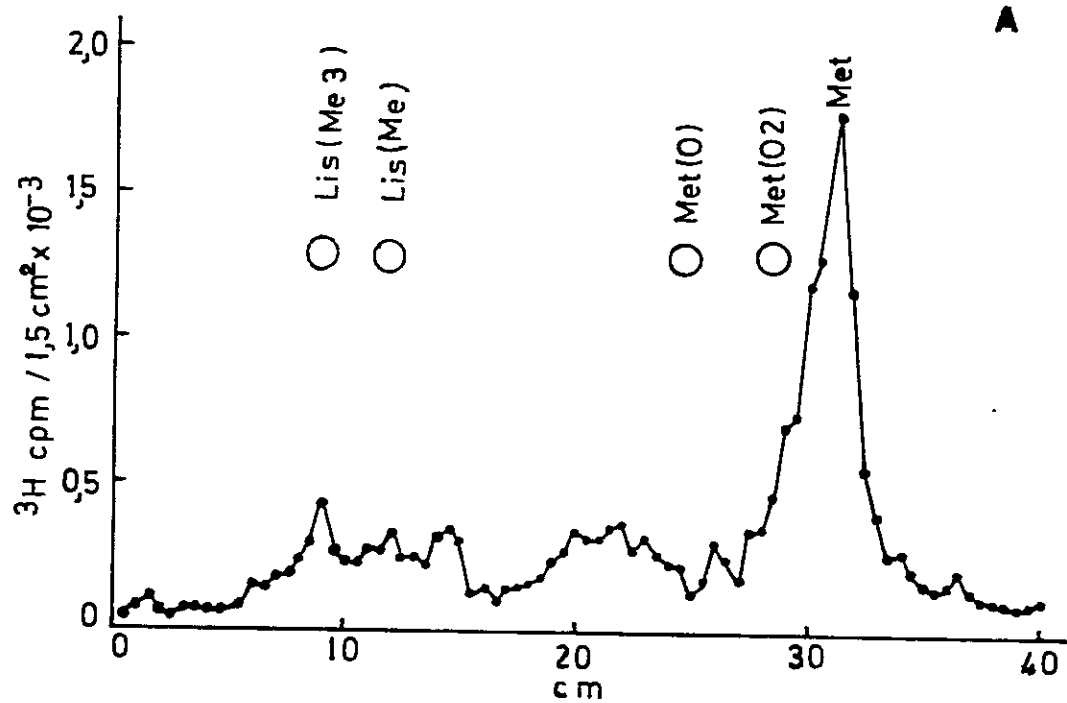
### 3.5. Análisis de los aminoácidos metilados en las proteínas totales.

Para establecer si los aminoácidos metilados de las proteínas ribosomales de E. gracilis son similares a los que se encuentran en las proteínas ribosomales de bacterias, se analizaron los aminoácidos metilados presentes en las proteínas ribosomales de cloroplasto y en los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis. Para ello se emplearon células crecidas en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina. Luego de obtener los ribosomas y extraer sus proteínas, éstas se hidrolizaron como se describe en Materiales y Métodos y los productos se separaron por cromatografía descendente en papel. Como se muestra en la Fig. 9 A, en los cloroplastos existen cantidades aproximadamente equivalentes de  $^3\text{H}$  en trimetil-lisina y en monometil-lisina. El resto de los productos que aparecen corresponden principalmente a metionina y sus productos de oxidación (20). En cambio, los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis (Fig. 9 B) muestran diferencias entre las cantidades de  $^3\text{H}$  en estos dos aminoácidos metilados.

FIGURA 9. Análisis de los aminoácidos metilados presentes en los ribosomas de cloroplastos y citoplasmáticos por cromatografía descendente en papel.

Se hidrolizó 1 mg de proteínas ribosomales de cada tipo (Materiales y Métodos) y el producto de cada hidrólisis (100  $\mu$ l) se aplicó a un papel filtro Whatman N°1 y junto con 10  $\mu$ g de cada uno de los siguientes aminoácidos estándares: His, His(Me), Arg(Me), Arg (Me 2), Lis, Lis(Me), Lis(Me 3), Met, Met(O), Met(O<sub>2</sub>). El solvente utilizado fue piridina-acetona-NH<sub>4</sub>OH 3 M, 50:30:25 (vol/vol/vol). Los cromatogramas se cortaron en trozos de 3 x 0,5 cm y se determinó la radiactividad de cada uno como se describe en Materiales y Métodos.

A, hidrolizado de proteínas ribosomales de cloroplasto; B, hidrolizado de proteínas de ribosomas citoplasmáticos.





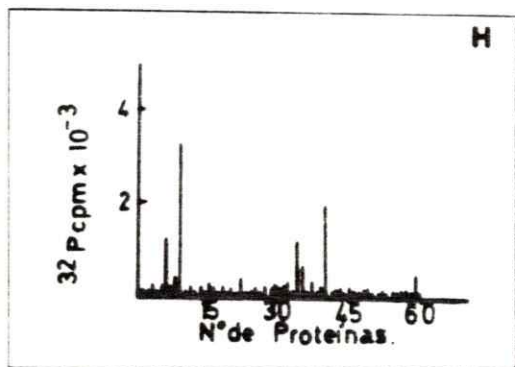
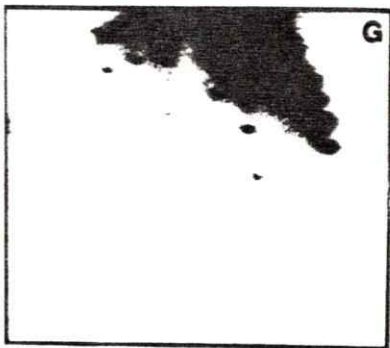
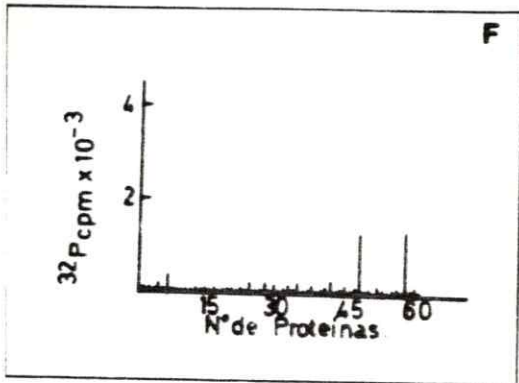
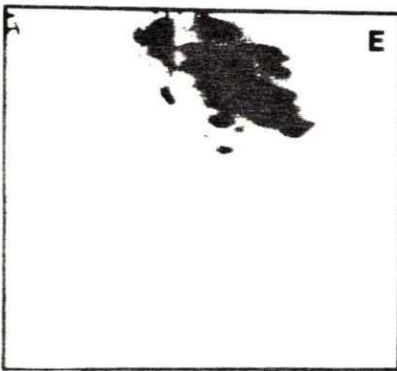
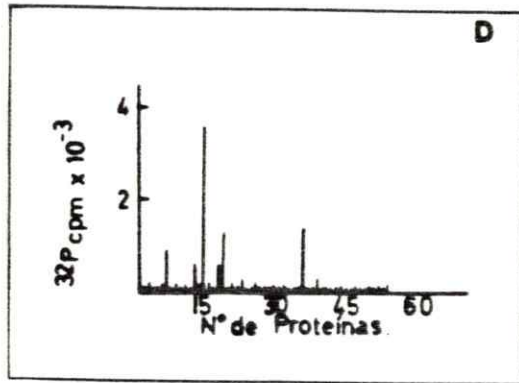
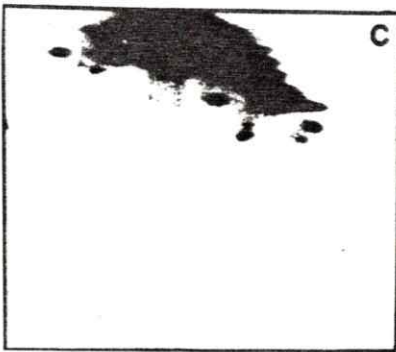
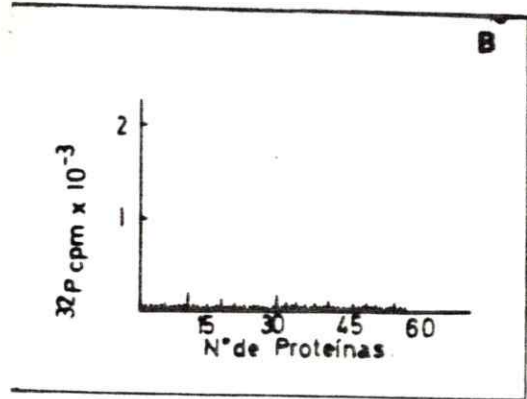
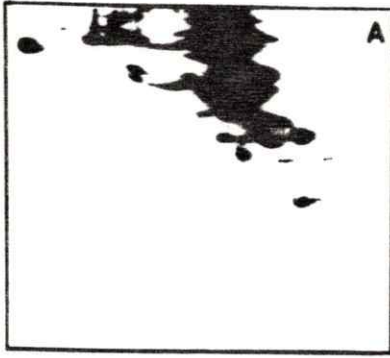
### 3.6. Determinación de proteínas fosforiladas en ribosomas.

La fosforilación de las diferentes proteínas ribosomales se determinó utilizando el método descrito en Materiales y Métodos después de crecer las células en presencia de 1 mCi de ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato. Se aislaron luego las proteínas ribosomales y se separaron mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

En la Fig. 10 podemos ver la separación electroforética de las proteínas ribosomales de E. coli (A), de S. carlsbergensis (C), de cloroplasto (E) y de citoplasma (G) de E. gracilis y en B,D,F y H vemos gráficamente el grado de fosforilación de cada una de las proteínas de los distintos ribosomas. Se puede apreciar que, considerando fosforiladas, aquellas proteínas que mostraron valores claramente mayores que el promedio incorporado por la mayor parte de las proteínas, sólo unas pocas proteínas presentan fosforilación en los distintos ribosomas, a excepción de las proteínas de E. coli, cuyos ribosomas presentaron niveles muy bajos de incorporación, a pesar de que las incorporaciones totales de  $^{32}\text{P}$  en las diferentes células estuvo dentro de un rango similar.

Los resultados encontrados nos indican que sí ocurre, fosforilación en las proteínas ribosomales de cloroplasto

FIGURA 10. Fosforilación de proteínas ribosomales en ribosomas de tipo procariótico y eucariótico. En A, C, E y G, se muestra la separación electroforética de 1 mg de cada tipo de proteínas. En B, D, F y H, se muestra un gráfico de barras que representa el grado de fosforilación relativa de cada mancha en el gel. (A, B) proteínas ribosomales 70 S de E. coli. (C, D) proteínas 80 S de S. calisbergensis. (E, F) proteínas ribosomales 68 S de E. gracilis variedad bacillaris y (G, H) proteínas ribosomales 89 S de E. gracilis mutante W<sub>10</sub>BSmL.



y en las proteínas ribosomales citoplasmáticas de E. gracilis. Por otro lado, en S. carlsbergensis también encontramos proteínas ribosomales fosforiladas como ya se ha descrito anteriormente utilizando otro método (17). Se puede apreciar en general, que el número de proteínas fosforiladas es parecido en los dos tipos de ribosomas eucarióticos (C, D y G, H) y que este difiere del encontrado en los clororribosomas (E, F).

La Tabla III nos entrega los valores de radiactividad incorporada por cada una de las proteínas analizadas en la Fig. 10.

En la Fig. 11 se muestra una comparación general de la fosforilación relativa y la movilidad electroforética de las proteínas ribosomales que se encuentran fosforiladas en los diferentes ribosomas estudiados en este trabajo.

Se puede apreciar que excepto para el cloroplasto, existen proteínas fosforiladas ácidas y básicas. Además, el patrón de movilidad electroforética de las proteínas modificadas de cloroplasto es completamente diferente al de las proteínas ribosomales de tipo eucariótico (ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis y S. carlsbergensis).

TABLA III

Fosforilación de proteínas ribosomales en diferentes microorganismos

<u>E. coli</u>		<u>S. carlsbergensis</u>					
Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm
S8	54	S4	66	1	64	27	60
S6	54	S3	106	2	141	28	230
L8/9	66	L2	70	3	63	29	59
L10	52	L3	194	4	76	30	51
L4	84	L1	74	5	145	31	98
L4	50	L18	100	6	<u>771</u>	32	50
L34	58	L5	56	7	59	33	93
L13	60	L14	72	8	92	34	59
L33	58	S10	74	9	55	35	<u>1272</u>
L32	195	L19	40	10	49	36	63
L31	68	L20	62	11	111	37	51
L30	44	L25	60	12	<u>589</u>	38	343
L29	52	L9	118	13	165	39	63
S20	88	L15	58	14	<u>3545</u>	40	76
L28	62	C	74	15	179	41	64
S21	56	B	70	16	58	42	59
S27	44	L21	68	17	<u>516</u>	43	61
S19	162	L17	60	18	<u>1247</u>	44	94
S18	58	L12	70	19	40	45	52
L16	64	L7	60	20	138	46	64
S9	72	S12	60	21	91	47	84
L24	110	A	66	22	364	48	57
L23	50	S17	252	23	63	49	68
S13	58	L11	72	24	49	50	78
S11	60	S5	118	25	136	51	186
L22	76	L6	62	26	67	52	54
S15	82	S7	134	53	71		
S16	56						

Los métodos utilizados para el crecimiento y marcación de las diferentes células, purificación de ribosomas y extracción de proteínas ribosomales se describen en Materiales y Métodos. Las manchas correspondientes a las proteínas identificadas y separadas en geles bidimensionales de poliacrilamida se cortaron de los geles y se determinó el (continúa...)

TABLA III (Continuación)

E. gracilis

Cloroplasto				Citoplasma			
Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm	Prot.	$^{32}\text{P}$ cpm
1	59	31	70	1	40	32	248
2	134	32	179	2	72	33	62
3	54	33	52	3	224	34	<u>1028</u>
4	53	34	178	4	46	35	<u>526</u>
5	222	35	55	5	156	36	50
6	62	36	59	6	<u>1024</u>	37	206
7	310	37	131	7	58	38	60
8	49	38	52	8	344	39	140
9	59	39	48	9	<u>2910</u>	40	<u>1858</u>
10	63	40	130	10	60	41	98
11	59	41	203	11	176	42	66
12	54	42	58	12	46	43	100
13	63	43	56	13	56	44	42
14	61	44	124	14	44	45	52
15	54	45	47	15	102	46	74
16	59	46	125	16	50	47	58
17	67	47	<u>1178</u>	17	234	48	116
18	79	48	139	18	112	49	76
19	57	49	130	19	54	50	66
20	59	50	63	20	94	51	138
21	56	51	261	21	46	52	136
22	58	52	78	22	332	53	116
23	56	53	64	23	54	54	78
24	160	54	57	24	134	55	80
25	50	55	125	25	54	56	58
26	61	56	69	26	78	57	110
27	201	57	<u>1192</u>	27	76	58	50
28	46	58	122	28	84	59	314
29	197	59	204	29	132	60	46
30	56			30	76	61	78
				31	150	62	34

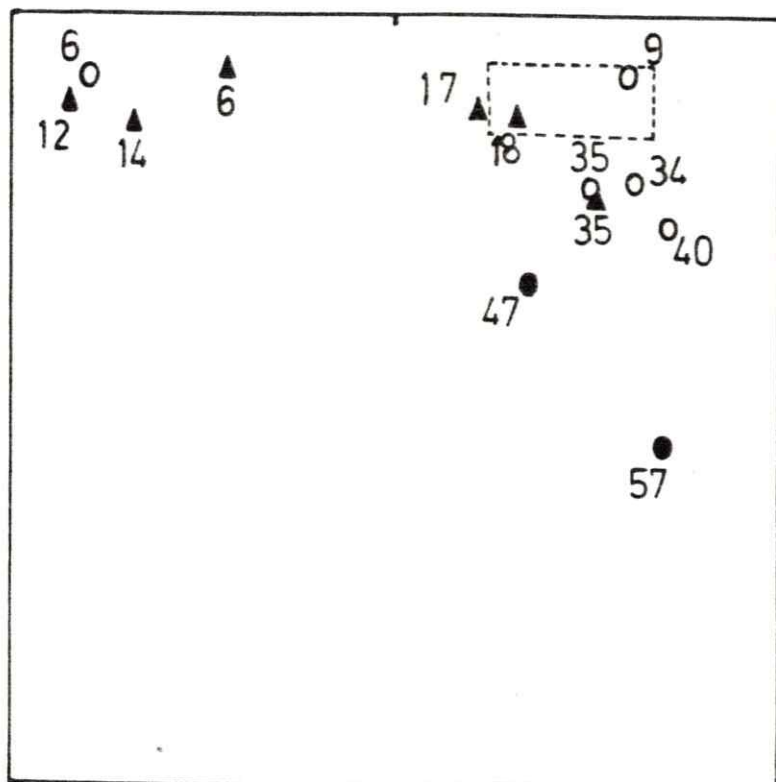
contenido de  $^{32}\text{P}$  de cada una.

La incorporación total de ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato en las células fueron:  $2,9 \times 10^6$  cpm en E. coli,  $4,9 \times 10^6$  cpm en S. carlsbergensis,  $1,8 \times 10^6$  cpm en E. gracilis para analizar cloroplastos y  $1 \times 10^6$  cpm en E. gracilis para el análisis de los ribosomas citoplasmáticos.

FIGURA 11. Comparación electroforética de proteínas ribosomales fosforiladas de diferentes organismos en electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

En la representación diagramática de la electroforesis bidimensional se identificaron las proteínas que son fosforiladas, y se determinó para cada una de ellas su "Rd". (○), proteínas ribosomales 89 S de E. gracilis; (●) proteínas ribosomales 68 S de E. gracilis; (▲) proteínas ribosomales 80 S de S. carlsbergensis.

El rectángulo de línea cortada indica la región aproximada donde migra la proteína ribosomal S6 en el sistema de electroforesis empleado (55). Esta región varía horizontalmente dependiendo del número de grupos fosfatos que contenga la proteína (24). Las proteínas 12 y 17 de S. carlsbergensis podrían también considerarse como fosforiladas (Fig 10).

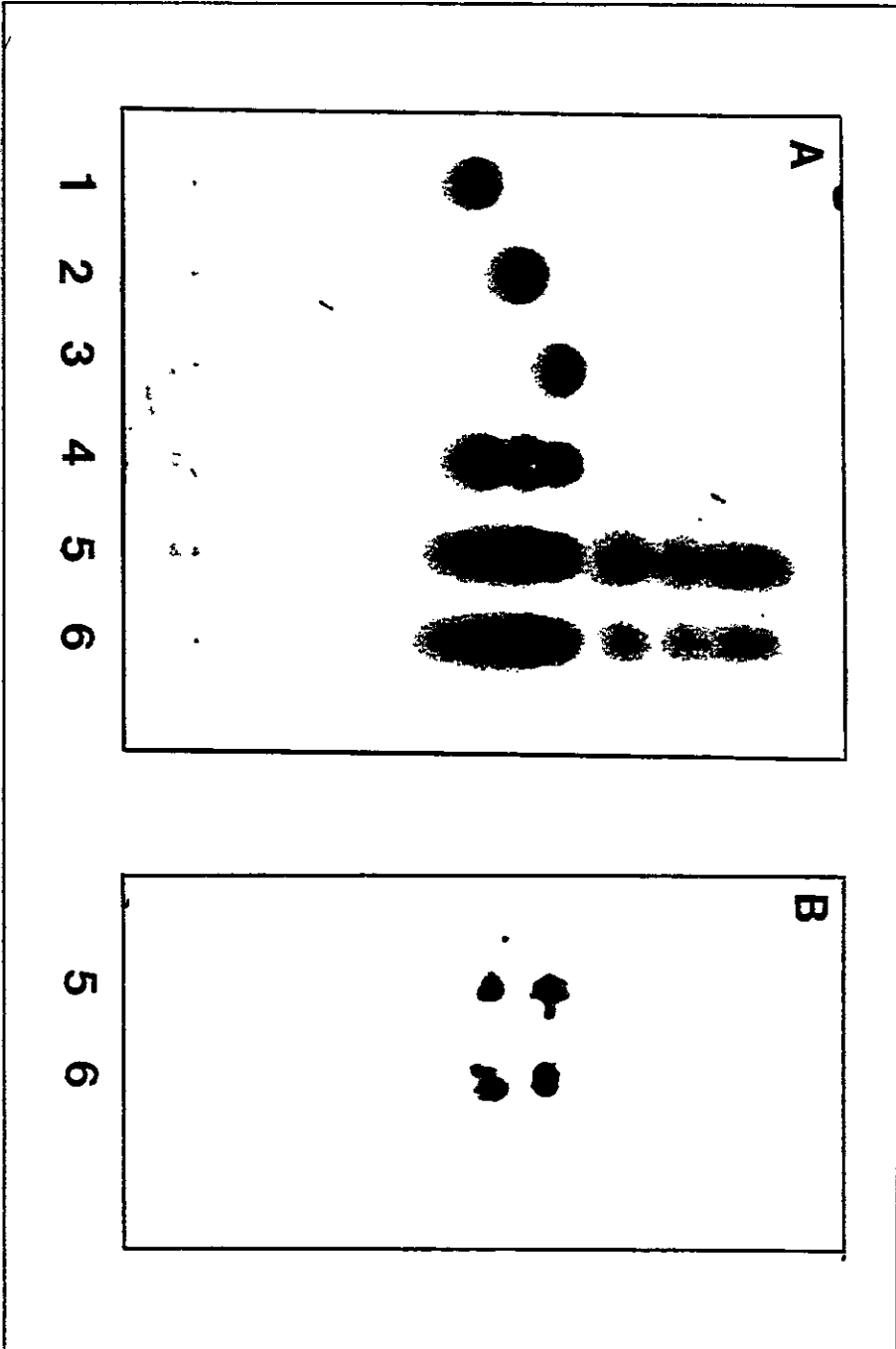




### 3.7. Análisis de los aminoácidos fosforilados presentes en proteínas ribosomales totales.

Para determinar los aminoácidos fosforilados en los ribosomas citoplasmáticos y de cloroplasto de E. gracilis, se aislaron los ribosomas a partir de células crecidas en presencia de ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato. Luego de obtener los ribosomas y separar sus proteínas por electroforesis bidimensional, se hidrolizaron éstas como se describe en Materiales y Métodos. Los productos de la hidrólisis se separaron por cromatografía en capa fina de celulosa. En la Figura 12 A se muestra la cromatografía de los productos de hidrólisis en la que se emplearon como estándares fosfotreonina, fosfotirosina y fosfoserina. La Figura 12 B muestra la autorradiografía de este cromatograma y que los aminoácidos fosforilados encontrados tanto en las proteínas ribosomales de cloroplasto como en los ribosomas citoplasmáticos son la fosfoserina y la fosfotreonina. La cantidad relativa de cada uno de estos fosfoaminoácidos se determinó raspando la celulosa en cada una de las manchas, midiendo posteriormente la radiactividad o bien por densitometría del autorradiograma. De esta manera se encontró que las proteínas totales de clororibosomas de E. gracilis presentaron 266 cpm ( $^{32}\text{P}$ ) de fosfoserina, 502 cpm ( $^{32}\text{P}$ ) de fosfotreonina y los ribosomas citoplasmáticos

FIGURA 12. Análisis de los aminoácidos fosforilados presentes en las proteínas ribosomales de E. gracilis por cromatografía en capa fina y autoradiografía. Las proteínas ribosomales (1 mg) provenientes de E. gracilis crecidas en presencia de ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato se hidrolizaron (Materiales y Métodos) y 2,5  $\mu\text{l}$  del producto de la hidrólisis se aplicó sobre una placa de celulosa junto con 2  $\mu\text{g}$  de cada uno de los siguientes estándares: fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina. El solvente empleado fue ácido isobutírico- $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.5 M) 50:30 (vol/vol). Las condiciones y el revelado de la cromatografía se describe en Materiales y Métodos. A, cromatografía en capa fina y tinción con ninhidrina. Puntos de aplicación: 1, P-Ser; 2, P-Treo; 3, P-Tir; 4, mezcla de los tres fosfoaminoácidos; 5, hidrolizado de proteínas ribosomales 68 S y mezcla de los tres estándares; 6, hidrolizado de proteínas ribosomales de citoplasma 89 S y mezcla de los 3 estándares. B, Autorradiografía del cromatograma; solo aparecen manchas en los puntos de aplicación 5 (68 S) y 6 (89 S).



presentaron 308 cpm ( $^{32}\text{P}$ ) de fosfoserina y 352 cpm ( $^{32}\text{P}$ ) de fosfotreonina.

## DISCUSION

Estudios previos de nuestro laboratorio con respecto a las modificaciones químicas del aparato traduccional han demostrado que la metilación de las proteínas ribosomales es un fenómeno general y altamente conservado en las eubacterias (13). Esto sugiere un papel importante aunque desconocido aún para estas modificaciones (13,21,56,57), y permite plantear interesantes aspectos evolutivos con respecto a estas modificaciones post-sintéticas, ya que, aparentemente existirían diferencias en el patrón de modificación de la nueva línea de descendencia denominada arqueobacterias (13). Por otro lado, si de acuerdo a la teoría del origen endosimbionte para el cloroplasto, se acepta que éstos se originaron a partir de una bacteria o eubacteria (5,6), cabe preguntarse si existen éstas modificaciones en los ribosomas de cloroplastos y si estas presentan características similares a las que ocurren en las bacterias. Es justamente en el análisis de la secuencia de proteínas y ácidos nucleicos, en los estudios comparativos de la biología molecular, en la organización de los genomas nucleares y de organelos donde se podrá encontrar en último término apoyo para la validez de la hipótesis endosimbionte (6).

Así, el argumento más convincente en favor de un origen eubacteriano independiente para el cloroplasto se basa en las similitudes de la estructura general y la función entre los ribosomas de organelos y los de las eubacterias y obviamente en las diferencias que presentan estos dos últimos tipos de ribosomas con respecto a los citoplasmáticos.

Con el propósito de aportar otros antecedentes en este sentido, el objetivo del actual trabajo fue por lo tanto, analizar la presencia y características de algunas de estas modificaciones químicas en los ribosomas de un plastidio como el cloroplasto de E. gracilis.

Los resultados obtenidos en esta tesis describen por primera vez la metilación de las proteínas ribosomales de cloroplastos e individualizan las proteínas de los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis que se encuentran metiladas. En la Tabla IV se muestran las proteínas metiladas descritas en varias especies y en las especies caracterizadas en el presente estudio. La metilación de proteínas ribosomales de eubacterias hasta ahora es aparentemente universal (13,15,20) y ocurre en un número variable de proteínas, pero que generalmente se ubican en la subunidad mayor del ribosoma (12,13) y que no pasa generalmente de 10 polipéptidos. Algo parecido ocurre con las proteínas de ambos tipos de ribosomas de E. gracilis en estudio.

TABLA IV

Proteínas ribosomales metiladas en varios organismos

## Eubacterias.

<u>E. coli</u> (12)	<u>E. subtilis</u> (15)	<u>B. steano.</u> (13)	<u>A. espejiana</u> (13)
L1	BSL9	BTL5	AL2
L3	BSL10	BTL6	AL5
L5	BSL11	BTL11	AL10
L7/L12	BSL16	BTL13(13c)	AL12
L8+L9	BSL18	BTL16	AL13
L11	BSL20	BTL20ab	AL14
L18			AL15

## Arqueobacteria.

<u>H. cutirubrum</u> (13)
HL3
HL8
HL10
HL11
HL14

E. gracilis

Cloroplasto (este trabajo)	
A	14
E	18
4	22
5b	23
7	25

## Eucariontes.

<u>S. carlsber.</u> (59)	<u>S. cerevisiae</u> (60,61)	Células HeLa. (58)	<u>E. gracilis</u> (Citoplasma) (este trabajo)
S31	S4	S1	39
S32	S10	S18	41
L15	S15a	S38	47
L41	S25	L30	49
	L3	L42	51
	L8		56
	L9		
	L25		

Estos datos se obtuvieron de los diferentes grupos de trabajos indicados en las referencias (entre paréntesis).

En eubacterias como E. coli y B. stearothermophilus, la mayor parte de las proteínas metiladas en ambas especies son estructural y funcionalmente homólogas y por lo tanto cumplen el mismo papel dentro del ribosoma. Todas estas proteínas presentan un patrón de movilidad electroforética similar en sistemas de electroforesis bidimensionales, por lo tanto es posible establecer que un patrón de movilidad electroforética similar, sugiere una posible relación estructural entre proteínas (11,13,62). Así podemos considerar que las proteínas ribosomales metiladas de clororribosomas, presentan en general un patrón de movilidad electroforética parecida a la de las proteínas metiladas de E. coli, sugiriendo algún grado de similitud (Fig. 8). En cambio los ribosomas citoplasmáticos, presentan proteínas metiladas con movilidades muy diferentes (Fig. 8). Obviamente para confirmar estas posibles similitudes será necesario un análisis de secuencia o al menos de tipo inmunológico. En este sentido existen solo algunas proteínas (alrededor de 12) de clororribosomas de S. olereacea, que se sabe son homólogas a algunas de E. coli por reacción inmunológica con anticuerpos específicos contra proteínas purificadas de E. coli (63). Entre las proteínas metiladas de clororribosomas de E. gracilis que presentan una movilidad electroforética parecida a las metiladas de E. coli y las que dan reacción inmunológica en S. olereacea, están las



que reaccionan con los antisueros contra las proteínas de E. coli L1 y L3 (63) (ver Fig. 7 y 8). L11 es una proteína ribosomal metilada altamente conservada en eubacterias, y es la proteína más metilada en muchos microorganismos (13,20). Como ya se destacara en los resultados, en los clonorrribosomas de E. gracilis también existe una proteína que es la más metilada y que presenta una movilidad electroforética relativamente similar a la L11 y que podría por lo tanto ser homóloga. Otra proteína ribosomal metilada con una importante función y altamente conservada no sólo en procariontes sino también en los eucariontes es la L7/L12. En cloroplastos también se ha aislado una proteína equivalente a L7/L12, lo cual fue demostrado determinando la secuencia de la proteína (10). Sin embargo nuestros resultados no muestran una proteína metilada en los clonorrribosomas de E. gracilis en la región donde migran estas proteínas ácidas (Fig. 7, 8). Esto podría deberse a que el grado de metilación de esta proteína es variable con las condiciones de crecimiento (64), y por lo tanto es posible que en nuestras condiciones experimentales no se observó la modificación post-traducciona1.

Al parecer entonces, existirían al menos algunas proteínas metiladas en clonorrribosomas que podrían ser homólogas con algunas de las proteínas metiladas de E. coli, sugiriendo también un cierto grado de conservación

del patrón de metilación de los clororribosomas y un grado de similitud con el patrón de metilación de "tipo eubacteriano" (13).

Para aportar mayores antecedentes en este sentido analizamos también los aminoácidos metilados. Reporter (65) encontró anteriormente que los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis contenían una mayor cantidad de Lis (Me 3) que de Lis (Me) cuando se los comparaba con los de E. coli, que presentaban cantidades similares de ambos aminoácidos modificados. Nuestros resultados no solo confirman los obtenidos con ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis sino que muestran que los clororribosomas, poseen cantidades aproximadamente iguales de ambos aminoácidos metilados, por lo que se asemejan entonces a los ribosomas bacterianos en esta modificación.

Todos estos antecedentes preliminares nos han permitido contestar algunas de las interrogantes planteadas hace algunos años por Reporter (65) y nos sugieren además que los clororribosomas aparentemente tendrían un patrón de metilación de tipo eubacteriano, lo cual estaría en favor de la hipótesis endosimbionte para el origen del cloroplasto.

Numerosas proteínas ribosomales eucarióticas son fosforiladas en residuos de serina y treonina por quinasas citoplasmáticas y asociadas a ribosomas (29). E. coli

posee quinasas que fosforilan algunas proteínas asociadas a los ribosomas (33,66). La fracción ribosomal cruda contiene una proteína mayoritariamente fosforilada con un peso molecular de 54.000 pero cuyo origen es desconocido (33).

Para comparar este tipo de modificación con las metilaciones ya estudiadas, analizamos la fosforilación de las proteínas ribosomales de clororribosomas y ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis.

En la Tabla V se muestra un resumen de las proteínas ribosomales fosforiladas in vivo en este trabajo y en algunos otros tipos de ribosomas descritos por otros grupos de investigación (17,24,67). Los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis se fosforilan de manera similar a los de S. carlsbergensis y de reticulocitos, en cuanto al número aproximado de proteínas fosforiladas. Además, varios autores han encontrado fosforilada sólo la proteína S6 o esta proteína en forma mayoritaria (24,25,29,30). La proteína que denominamos 18 en S. carlsbergensis y la 9 en los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis (Fig. 11) podrían corresponder a la proteína S6 por su movilidad electroforética aproximada y por ser las que tienen un mayor grado de fosforilación relativa, ya que la proteína S6 como ya se ha mencionado ha sido descrita como la proteína mayoritariamente fosforilada en varias especies (23).

TABLA V  
 Proteínas ribosomales fosforiladas in vivo

Organismo	Proteínas	Referencias
<u>S. carlsbergensis</u>	S2,S10,L9,L44,L45	( 17)
<u>S. carlsbergensis</u> *	6,12,14,17,18,35	este trabajo
<u>E. gracilis</u> rib. citoplasmáticos.	6,9,34,35,40	este trabajo
Reticulocitos de conejo.	10 proteínas	( 67)
<u>E. gracilis</u> cloroplasto.	47,57	este trabajo
<u>S. olereacea</u> cloroplasto.	L18,S31	( 37)
<u>E. coli</u>	ninguna	este trabajo y 33

\* Las proteínas fosforiladas de S. carlsbergensis encontradas en esta tesis no se pueden comparar directamente con las del grupo de Planta y col.(17) pues estos autores emplearon un sistema electroforético de separación diferente al de Kaltschmidt y Wittmann (48).

Es interesante considerar también que existe una proteína ribosomal acídica aparentemente análoga a la L7/ L12 de E. coli que es la proteína más fosforilada en la subunidad 60S de células ascíticas de ratón (68) , en los fibroblastos de hamster (68), en hígado de rata (69) y en levaduras (70). Si analizamos la Fig. 11 y la Tabla V, podemos ver que tanto las proteínas acídicas L44 y L45 de S. carlsbergensis (17) como la que denominamos 14 en la misma especie son altamente fosforiladas. La proteína 12 podría ser derivada de la 14 o viceversa ya que podrían diferir en su movilidad, tal como ocurre con la proteína ribosomal acídica de hígado de rata, que forma tres derivados que contienen respectivamente uno, dos o tres grupos fosfato (68). Los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis, también presentan la proteína 6 como una proteína acídica fosforilada (Fig. 11). Estos resultados indican una posible conservación generalizada de la fosforilación de estas proteínas acídicas sólo en los ribosomas eucarióticos, ya que las proteínas análogas a L7/L12 no son fosforiladas en las eubacterias. En todo caso estas proteínas desempeñan una importante función en ambos tipos de ribosomas (22).

Con respecto a la fosforilación de proteínas en los ribosomas de cloroplastos, la Tabla V nos muestra que existen sólo 2 proteínas ribosomales fosforiladas en este tipo de ribosomas provenientes de Spinacea oleracea.

Nosotros hemos encontrado un resultado idéntico para los clororribosomas de E. gracilis pues detectamos sólo 2 proteínas con esta modificación. Desafortunadamente, no podemos establecer si las proteínas son equivalentes en ambas especies ya que se emplearon diferentes sistemas electroforéticos en cada caso. De todas formas en ambos estudios las proteínas fosforiladas son de carácter básico.

Cozzone y col. (33) encuentran poco probable que la proteína fosforilada asociada a los ribosomas de E. coli corresponda a una proteína ribosomal auténtica. En nuestras condiciones las células de E. coli aún cuando incorporan una cantidad aproximadamente equivalente de ( $^{32}\text{P}$ )ortofosfato, a la incorporada por E. gracilis in vivo no presentan proteínas ribosomales fosforiladas (Fig. 11). Al analizar el tipo de aminoácidos fosforilados, se ha encontrado que numerosas proteínas ribosomales eucarióticas son fosforiladas en residuos de serina y treonina (16,23). En cambio, en bacterias los dos aminoácidos más frecuentemente fosforilados en las proteínas celulares corresponden a la serina y en menor grado a treonina, aunque recientemente también se ha descrito la presencia de fosfotirosina, tal como ocurre en los eucariotes (33).

Nuestros resultados muestran que los clororribosomas

presentan una razón entre P-treonina y P-serina de 1,9 y en cambio los ribosomas citoplasmáticos del mismo organismo tienen una razón de 1,1. Por otro lado Guittou y col.(37) encuentran sólo fosfoserina en las proteínas ribosomales fosforiladas de cloroplastos de espinacas.

En general existen diferencias en las clases de fosfoaminoácidos y en las cantidades relativas presentes en las proteínas de diferentes especies. Esto puede reflejar por una parte, diferentes grados de especificidad de las proteínas quinasas que participan y por otro lado, pueden reflejar variaciones en la fosforilación debido a que algunos estudios han sido efectuados en distintas fases del crecimiento para un mismo organismo o bien pueden ser consecuencia de genuinas diferencias entre especies. Aunque la fosforilación de las proteínas ribosomales de cloroplastos es claramente diferente de la observada en los eucariotes de la Tabla V, los resultados son muy preliminares aún como para establecer similitudes evolutivas como se ha intentado en el caso de la metilación. La variación observada en la fosforilación de las proteínas podría deberse a que las quinasas que participan poseen una menor especificidad de sustrato comparadas con las metil transferasas. De hecho, estas últimas enzimas presentan una gran especificidad tanto in vivo como in vitro en las bacterias (19). En cambio las quinasas de proteínas

son capaces de fosforilar un gran número de proteínas ribosomales in vitro, mientras que el número de proteínas fosforiladas en el mismo sistema es mucho menor cuando se determina in vivo (16,23).

En conclusión, los estudios de modificaciones post-sintéticas de las proteínas ribosomales presentados y los efectuados previamente por varios grupos de investigación (13,16,23) permiten sugerir que las metilaciones aparentemente presentan un cierto grado de conservación evolutiva. Esto puede ser un reflejo de un papel más bien estructural para estas modificaciones (2,13). Como una especulación final, se podría suponer que las metilaciones de las proteínas ribosomales de las bacterias surgieron mucho antes de la posible simbiosis de algún procarionte para formar el cloroplasto. De esta forma se podría esperar, como nuestros resultados lo sugieren, que estuvieran presentes y conservadas en los ribosomas del organelo. En el caso de las fosforilaciones, se debería esperar un resultado similar si éstas tuvieron un mismo origen. Los resultados obtenidos sin embargo indican que sólo los ribosomas de cloroplastos son fosforilados y no los ribosomas de E. coli. Esto podría explicarse suponiendo que las fosforilaciones de proteínas ribosomales, que se han descrito sólo en eucariotes, aparecieron en el cloroplasto



con posterioridad a su origen. Estudios sobre las modificaciones de las proteínas ribosomales de cianobacterias, que son un precursor evolutivo inmediato del cloroplasto, aportarían interesantes resultados a este respecto.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Möller, W., M. Nomura., A. Tissières, and P. Lengyel (eds). 1974 Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Nierhaus, K. H. 1982. Structure, assembly, and function of ribosomes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 97: 82-155.
3. Boyton, J. E., N. W. Gilham, and A. M. Lambowitz. 1980. In Ribosomes (eds) G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, and M. Nomura. (Univ. Park Press, Baltimore) pp: 903-950.
4. Freyssinet, G., and J. A. Schiff. 1974. The chloroplast and cytoplasmic ribosomes of Euglena gracilis. *Plant. Physiol.* 53: 543-554.
5. Woese, C. R. 1981. Archaeobacteria. *Sci. Am.* 244: 98-122.
6. Gray, M. W., and W. F. Doolittle. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proved? *Microbiol. Rev.* 46: 2-30.
7. Gurevitz, M., H. Kratz, and I. Ohad. 1977. Polypeptides of chloroplastic origin required for the development of photosystem II activity, and chlorophyll-protein complexes, in Euglena gracilis. *Biochem. Biophys. Acta.* 461: 475-488.
8. Bingham, S., and J. A. Schiff. 1979. Events surrounding the early development of Euglena chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 547: 531-543.
9. Koller, B., and H. Delius. 1984. Intervening sequences in chloroplast genomes. *Cell.* 36: 613-622.
10. Bartsch, M., M. Kimura., and A. Subramanian. 1982. Purification, primary structure, and homology relationships of a chloroplast ribosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 6871-6875.
11. Fahnestock, S. R., W. A. Strycharz, and D. M. Marquis. 1981. Immunochemical evidence of homologies among 50S ribosomal proteins of Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 256:10111-10116.

12. Chang, C. N., and F. N. Chang. 1975. Methylation of the ribosomal proteins in Escherichia coli. Nature and stoichiometry of the methylated aminoacids in 50 S ribosomal proteins. Biochemistry. 14: 468-477.
13. Amaro, A. M., and C. A. Jerez. 1984. Methylation of ribosomal proteins in bacteria: evidence of conserved modification of the eubacterial 50 S subunit. J. Bacteriol. 158: 84-93.
14. Toledo, H., and C. A. Jerez. 1985. In vitro methylation of the elongation factor EF-Tu from E. coli. FEBS Lett. 193:17-21.
15. Mardones, E., A. M. Amaro. and C. A. Jerez. 1980. Methylation of ribosomal proteins in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 142:355-558.
16. Rubin, C. S., and O. M. Rosen. 1975. Protein phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 44: 831-887.
17. Kruiswijk, T., J. T. de Hey, and R. J. Planta. 1978. Modification of yeast ribosomal proteins. J. Biochem. 175: 213-219.
18. Alix, J. H., and D. Hayes. 1982. Why are macromolecules modified post-synthetically ? Biol. Cell. 47: 139-159.
19. Paik, W. K., and S. Kim. 1980. Protein methylation. pp 142-183. In A. Meister (eds) Biochemistry. A series of monographs. J. Wiley & Sons. Inc. New York.
20. Chang, F. N., C. N. Chang, and W. K. Paik. 1974. Methylation of ribosomal protein in Escherichia coli. J. Bacteriol. 120: 651-656.
21. Alix, J. H., D. Hayes, and K. H. Nierhaus. 1979. Properties of ribosomes and RNA synthesized by Escherichia coli grown in the presence of ethionine. V. Methylation dependence of the assembly of Escherichia coli 50S ribosomal subunit. J. Mol. Biol. 127: 375-395.
22. Moller, W., P. J. Schrier., J. A. Maassen., A. Zantena., E. Schop., H. Reinalda., A. F. M. Cremers, and J. E. Mellema. 1983. Ribosomal proteins L7/L12 of Escherichia coli. Localization and possible molecular mechanism in translation. J. Mol. Biol. 163: 553-573.

23. Ochoa, S., and C. De Haro. 1979. Regulation of protein synthesis in eucaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 549-580
24. Wettenhall, R. E., and F. G. Morgan. 1984. Phosphorylation of hepatic ribosomal protein S 6 on 80 and 40 S ribosomes. *J. Biol. Chem.* 259: 2084-2091.
25. Perez, J. M., and G. Thomas. 1983. Ordered phosphorylation of 40 S ribosomal protein S 6 after serum stimulation of quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 926-930.
26. Traugh, J. A., and R. R. Traut. 1974. Characterization of protein kinases from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 249: 1207-1212.
27. Ventimiglia, F. A., and I. G. Wool. 1974. A kinase that transfers the  $\gamma$ -phosphoryl group of GTP to proteins of eukaryotic 40 S ribosomal subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 350-354.
28. Walton, G. M., G. N. Gill., I. B. Abrass, and L. D. Garren. 1971. Phosphorylation of ribosome-associated protein by an adenosine 3,5 cyclic monophosphate-dependent protein-kinase: Location of the microsomal receptor and protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 880-884.
29. Thomas, G., M. Siegmann., A. M. Kubler., J. Gordon, and L. Jimenes de Asua. 1980. Regulation of 40 S ribosomal protein S 6 phosphorylation in swiss mouse 3T<sub>3</sub> cells. *Cell.* 19: 1015-1023.
30. Perisic, O., and J. A. Traugh. 1983. Protease-activated kinase II mediates multiple phosphorylation of ribosomal protein S 6 in reticulocyte. *J. Biol. Chem.* 258: 13998-14002.
31. Lastick, S. M., and E. H. Mc Conkey. 1981. HeLa ribosomal protein S 6. *J. Biol. Chem.* 256: 583-585.
32. Vasquez, C. C., and G. Mora. 1979. The proteins of the cytoplasmic ribosomes of *Euclena gracilis*. *Arch. Biol. Med. Exper.* 12: 367-372.
33. Cortay, J. C., B. Duclos, and A. J. Cozzone. 1986. Phosphorylation of an *E. coli* protein at tyrosine. *J. Mol. Biol.* 187: 305-308.

34. Holuigue, L., H. A. Lucero, and R. Vallejos. 1985. Protein phosphorylation in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum. FEBS. Lett. 181: 103-108.
35. Wang, J. Y., and D. E. Koshland. 1982. The reversible phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of Salmonella typhimurium. Arch. Biochem. Biophys. 218: 59-67.
36. Londesborough, J. 1986. Phosphorylation of proteins in Clostridium thermohydrosulfuricum. J. Bacteriol. 165: 595-601.
37. Guitton, C., A. M. Donne, and R. Mache. 1984. In organello and in vitro phosphorylation of chloroplast ribosomal proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 297-303.
38. Lin, Z. F., H. A. Lucero, and E. Racker. 1982. Protein kinases from spinach chloroplast. J. Biol. Chem. 157: 12153-12156.
39. Mason, T. L., R. O. Poyton., D. C. Wharton, and G. Schatz. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. J. Biol. Chem. 248: 1346-1354.
40. Schiff, J. A., H. Lyman, and G. K. Russell. 1971. Isolation of Mutants from Euglena gracilis. Meth. Enzymol. 23: 143-163.
41. Jerez, C. A., E. Mardones, and A. M. Amaro. 1976. Alteration of the acidic ribosomal proteins from dormant spores of Bacillus subtilis. FEBS. Lett. 67: 276-280.
42. Graves, H. C., C. A. Breitenberger, and L. L. Spremulli. 1980. Euglena gracilis chloroplast ribosomes: improved isolation procedure and comparison of elongation factor specificity with prokaryotic and eukaryotic ribosomes. Arch. Biochem. Biophys. 204: 444-454.
43. Schwartzbach, S. D., G. Freyssinet, and J. A. Schiff. 1974. The chloroplast and cytoplasmic ribosomes of Euglena. Plant. Physiol. 53: 533-542.
44. Grivell, L. A., L. Reijnders, and P. Bortst. 1971. Isolation of yeast mitochondrial ribosomes highly active in protein synthesis. Biochem. Biophys. Acta. 247: 91-103.

45. Lang, B., G. Burger., I. Doxiadis., D. Y. Thomas W. Bandlow, and F. Kaudewitz. A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal. Biochem.* 77: 110-121.
46. Hardy, S. J., C. G. Kurland, P. Voynow, and G. Mora. 1969. The ribosomal proteins of Escherichia coli. Purification of the 30 S ribosomal proteins. *Biochemistry.* 8: 2897-2905.
47. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
48. Kaltschmidt, E., and H. G. Wittman. 1970. Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal. Biochem.* 36: 401-412.
49. Moore, S., and W. Stein. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Meth. Enzymol.* 6: 819-831.
50. Cooper, J. A., B. M. Sefton, and T. Hunter. 1983. Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Meth. Enzymol.* 99: 387-402.
51. Martensen, T. M., and R. L. Levine. 1983. Base hydrolysis and aminoacid analysis for phosphotyrosine in proteins. *Meth. Enzymol.* 99: 402-405.
52. Marin, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 433-468.
53. Freyssinet, G. 1977. Characterization of cytoplasmic and chloroplast ribosomal proteins of Euglena gracilis. *Biochimie.* 59: 597-610.
54. Geisser, M., W. Tischendorf., G. Stoffler, and H. G. Witmann. 1973. Immunological and electrophoretical comparison of ribosomal proteins from eight species belonging to Enterobacteriaceae. *Molec. Gen. Genet.* 127: 111-126.
55. Kouyanou, S., E. Fragoulis, and C. Kafatos. 1983. Developmental and evolutionary comparisons of proteins from purified ribosomal subunits in two silkworms. *Eur. J. Biochem.* 135: 1-8.

56. Alix, J. H., and D. Hayes. 1974. Properties of ribosomes and RNA synthesized by E. coli grown in the presence of ethionine III. Methylated proteins in 50 S ribosomes of E. coli EA<sub>2</sub>. J. Mol. Biol. 86: 139-159.
57. Nierhaus, K. H. 1979. Analysis of the assembly and function of the 50S subunit from Escherichia coli ribosomes by reconstitution, p. 267-294. In G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, and Nomura (eds), Ribosomes: structure, function and genetics, University Park Press, Baltimore.
58. Goldenberg, C., and G. L. Eliceini. 1977. Methylation of ribosomal proteins in HeLa cells. Biochem. Biophys. Acta. 479:220-234.
59. Kruiswijk, T., A. Kunts, R. J. Planta, and W. H. Mager. 1978. Modification of yeast ribosomal proteins. Biochem. J. 175: 221-225.
60. Cannon, M., D. Schindler, and J. Davies. 1977. Methylation of proteins in 60S ribosomal subunits from Sacharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 75:187-191.
61. Hernandez, F., and M. Cannon. 1978. Methylation of proteins in 40S ribosomal subunit from Sacharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 89:271-275.
62. Marquis, D., and S. R. Fahnestock. 1978. A complex of acidic proteins in the Bacillus stearothermophilus ribosomes. J. Mol. Biol. 119:557-567.
63. Bartsch, M. 1985. Correlation of chloroplast and bacterial ribosomal proteins by cross-reaction of antibodies specific to purified Escherichia coli ribosomal proteins. J. Biol. Chem. 260: 237-241.
64. Chang, F. N. 1978. Temperature-dependent variation in the extent of methylation of ribosomal proteins L7 and L12 in Escherichia coli. J. Bacteriol. 135:1165-1166.
65. Reporter, M. 1972. Methylation of basic residues in structural proteins. Mech. Age. Dev. 1: 367-372.
66. Enami, M., and A. Ishihama. 1984. Protein phosphorylation in Escherichia coli and purification of a protein kinase. J. Biol. Chem. 259: 526-533.

67. Kabat, D. 1970. Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. *Biochemistry*. 9:4160-4173.
68. Wool, J. G. 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 48:719-754.
69. Gressner, A. M., and I. G. Wool. 1974. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. *J. Biol. Chem.* 249:6917-6925.
70. Vidales, J., S. Madrid., M. Saenz-Robles, and J. Ballesta. 1983. Purification and characterization of ribosomal proteins. *Eur. J. Biochem.* 136: 275-281.