

UCH-FC  
MAG-B  
A485

# METILACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES EN BACTERIAS

## 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

ANA MARIA AMARO SEPULVEDA

1987

Director de Tesis: DR. CARLOS JEREZ G.



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

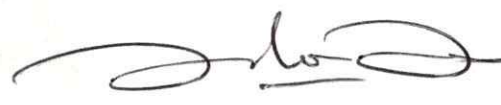
TESIS DE MAGISTER

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

Ana María Amaro Sepúlveda

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 9 de Abril de 1987.

Director de Tesis:  
Dr. Carlos Jerez G.



.....

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Jorge Babul



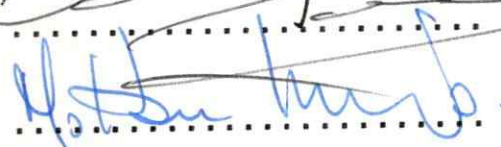
.....

Dr. Guido Mora



.....

Dr. Manuel Krauskopf



.....

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 mis hijos:

Pamela Paz y

Rolando Javier



## AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

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

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

A Héctor Toledo por su valiosa ayuda que permitió que esta tesis se elaborara en un sistema computacional.

A mis compañeros de trabajo y amigos: Iris Peirano, Marta Veliz, Gabriel Campos y Sergio Sanhueza, por su constante estímulo y su valiosa amistad.

Al Sr. José Mondaca por la confección de los dibujos de esta tesis.

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

## INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCION.....	1
Propósitos de este trabajo.....	12
MATERIALES Y METODOS.....	14
Reactivos.....	14
Cepas bacterianas.....	15
Medios de cultivo.....	15
Tampones utilizados en la preparación de ribosomas y extractos celulares.....	19
Crecimiento y marcación de las células.....	20
Preparación de ribosomas y proteínas ribosomales de células marcadas <u>in vivo</u> .....	21

Análisis de las proteínas ribosomales metiladas <u>in vivo</u> por electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida.....	25
Identificación de las proteínas ribosomales.....	29
Determinación de la radiactividad.....	32
Electroforesis en geles a pH 5.....	33
Análisis de las proteínas del complejo pentamérico del <u>Bacillus stearothermophilus</u> .....	35
Análisis de los aminoácidos metilados.....	36
Metilación in vitro del complejo (EL7L12) <sub>4</sub> .L10 de <u>E. coli</u> .....	38
Preparación de ribosomas y extractos de <u>E. coli</u> para medir síntesis de polifenilalanina.....	38
Síntesis de polifenilalanina dependiente de poli U.....	39
Análisis de EL7L12 de ribosomas marcados <u>in vivo</u> a diferentes temperaturas.....	40
RESULTADOS.....	42
Separación de las subunidades ribosomales 30S y 50S de diferentes microorganismos.....	42
Separación de las proteínas ribosomales 50S mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida...	45

	Página
Metilación de las proteínas ribosomales 50S.....	50
Análisis de los aminoácidos metilados en algunas proteínas ribosomales.....	57
Metilación <u>in vitro</u> del complejo (EL7L12) <sub>4</sub> .L10 de <u>E. coli</u> .....	60
Síntesis de polifenilalanina con ribosomas de <u>E. coli</u> crecida a 37°C y 27°C .....	66
DISCUSION.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	87

LISTA DE TABLAS.

	Página
TABLA I Cepas bacterianas y medios de cultivo.	16
TABLA II Proteínas metiladas en la subunidad 50S de varios microorganismos.	51
TABLA III Proteínas ribosomales 50S metiladas, descritas como estructural y funcionalmente homólogas en bacterias.	76

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Metilación de proteínas ribosomales en bacterias	6
Figura 2 Topografía de algunas de las proteínas ribosomales 50S de <u>E. coli</u> en el modelo ribosomal de consenso (descrito por J. Lake).	8
Figura 3 Electroforetograma de las proteínas ribosomales 50S de <u>E. coli</u> .	30
Figura 4 Separación de subunidades ribosomales mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.	43
Figura 5 Separación de las proteínas ribosomales 50S de diferentes microorganismos por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.	46
Figura 6 Metilación relativa de las proteínas ribosomales 50S de diferentes especies bacterianas.	53



Figura 7	Análisis de los aminoácidos metilados presentes en la proteína L11 de bacterias Gram positivas por cromatografía descendente en papel.	58
Figura 8	Análisis de los aminoácidos neutros metilados presentes en BSL11 de <u>B. subtilis</u> por electroforesis en papel.	61
Figura 9	Electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos metilados <u>in vitro</u> , inmunoprecipitados con suero anti EL12.	64
Figura 10	Análisis del grado de metilación de L7L12 provenientes de ribosomas obtenidos de células de <u>E. coli</u> crecidas a diferentes temperaturas, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.	67
Figura 11	Síntesis de polifenilalanina con ribosomas de <u>E. coli</u> crecida a 37°C y 27°C.	70
Figura 12	Efecto del líquido sobrenadante post-ribosomal (S-150) obtenido a partir de células de <u>E. coli</u> crecidas a diferentes temperaturas, sobre la capacidad de sus respectivos ribosomas para la síntesis de polifenilalanina.	72

### LISTA DE ABREVIATURAS

- Ala(Me<sub>3</sub>) : N-trimetilalanina
- AL1,2,3 : Proteínas ribosomales 50S de Alteromonas espejiana
- ATP : Adenosina 5' trifosfato
- Bis Tris : (bis [2-hidroxietil]imino-Tris [hidroximetil] metano)
- BSL1,2,3 : Proteínas ribosomales 50S de Bacillus subtilis
- BTL1,2,3 : Proteínas ribosomales 50S de Bacillus stearothermophilus
- DNAasa : Desoxirribonucleasa
- DNP-Lys : N-2,4-dinitrofenil-L-lisina
- DTT : Ditiotreitól
- EDTA : Acido etilendiaminotetraacético
- EL1,2,3 : Proteínas ribosomales 50S de Escherichia coli
- GTP : Guanosina 5' trifosfato
- HL1,2,3 : Proteínas ribosomales 50 S de Halobacterium cutirubrum
- Lis : Lisina
- Lis(Me) : ε-N-monometil lisina
- Lis(Me<sub>3</sub>) : ε-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
PPO	: 2,5 - difeniloxazol
S-AdoMet	: S-Adenosil metionina
SDS	: Sulfato disódico de dodecilo
TCA	: Acido tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N'tetrametilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
tRNA	: Acido ribonucleico de transferencia

## RESUMEN

El aparato traduccional de Escherichia coli presenta modificaciones post-sintéticas entre las cuales se encuentra la metilación de varios componentes ribosomales. Aunque no se ha establecido el significado biológico de esta modificación, existen evidencias que indican que estas metilaciones pueden ser importantes para el ensamblaje de la partícula ribosomal. Por otro lado, varias proteínas metiladas de E. coli desempeñan una importante función dentro del ribosoma. Si estas modificaciones químicas del aparato traduccional, tienen realmente un papel funcional o estructural, se debería esperar que estuvieran presentes en diferentes especies bacterianas.

Para comprobar esta idea, estudiamos la metilación de las proteínas ribosomales 50S de las eubacterias Bacillus stearothermophilus y Alteromonas espejiana. Como una arqueobacteria, se analizó el Halobacterium cutirubrum.

Los organismos se crecieron en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )metionina. Las proteínas ribosomales se separaron por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y su grado de metilación se determinó por la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de cada una de ellas.

Las proteínas metiladas, en las eubacterias, presentaron una movilidad electroforética similar en geles bidimensionales de poliacrilamida. Por otra parte, se encontró que varias proteínas

ribosomales descritas como estructural y funcionalmente homólogas son metiladas en diferentes eubacterias. Así, se encontraron metiladas las siguientes proteínas que están involucradas en la actividad peptidil transferasa y en la síntesis de polifenilalanina en el B. stearothermophilus y en E. coli (estas últimas se indican entre paréntesis) : BTL5 (EL5), BTL6 (EL3), BTL8 (EL10), BTL11 (EL11), BTL13 (EL7L12) y BTL20 (EL16). Además, encontramos que tanto el complejo pentamérico (EL7L12)<sub>4</sub>.L10 de E. coli como el (BTL13)<sub>4</sub>.BTL8 del B. stearothermophilus, que forman parte del ribosoma y son esenciales para la síntesis proteica, están formados por proteínas que son normalmente metiladas.

Aunque estos resultados podrían sugerir una posible participación de estas modificaciones en la actividad ribosomal, no ha sido fácil aún establecer con claridad el papel que juegan estas modificaciones en la estructura y/o función del ribosoma.

Resultados preliminares mostraron que las proteínas EL7L12 obtenidas de ribosomas de E. coli, aumentan su grado de metilación cuando las células crecen a 27°C y que estos ribosomas presentan una menor capacidad de síntesis de polifenilalanina que la de los ribosomas de células crecidas a 37°C cuando se mide esta actividad en presencia de un extracto post-ribosomal (libre de ribosomas) proveniente de las respectivas células. Sin embargo, al parecer esta disminución

se debería a algún componente presente en el extracto post-ribosomal y no a los ribosomas mismos.

Será de interés resolver en futuros trabajos, si el aumento en el grado de metilación de las proteínas L7L12 (cuando las células crecen a bajas temperaturas), tiene algún efecto en la síntesis proteica utilizando un sistema de traducción natural.

El análisis de los aminoácidos de las proteínas más altamente metiladas de B. subtilis y de B. stearothermophilus (BSL11 y BTL11 respectivamente) demostró la presencia de -N-trimetilisina como el aminoácido metilado más abundante en ambas proteínas lo que coincidió con lo descrito para la proteína EL11 de E. coli. Además, BSL11 contenía trimetilalanina, un aminoácido modificado descrito solamente en EL11 de E. coli.

Estos resultados indican, en general, un alto grado de conservación de la metilación de las proteínas ribosomales y sugieren un importante, aunque desconocido papel para la modificación de estos componentes del ribosoma de las eubacterias.

Por otra parte, los ribosomas de H. cutirubrum mostraron un patrón de metilación diferente al de las eubacterias, en favor del postulado que establece que las arqueobacterias constituyen una nueva línea de descendencia.



## ABSTRACT

The methylation of several components from the translational machinery of Escherichia. coli has been described. Although the biological significance of this modification has not yet been established, some experimental evidence suggest that these methylations may be important for the assembly of the ribosomal particle. On the other hand, some of the methylated proteins are known to have important ribosomal functions in E. coli.

If the methylation of the ribosomal components play an important structural or functional role within the ribosome, one should expect these modifications to be conserved within different bacterial species.

To test this idea, the methylation of 50S ribosomal proteins from eubacterial Bacillus stearothermophilus and Alteromonas espejiana was studied. As an archaebacteria Halobacterium cutirubrum was analyzed.

The cells were grown in the presence of (1-<sup>14</sup>C)methionine and (methyl-<sup>3</sup>H)methionine and the labeled ribosomal proteins were analyzed by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. The degree of methylation of each individual protein was determined by measuring their respective <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C ratios. Thus, we found that the methylated proteins from all eubacteria studied showed similar mobilities when analyzed by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis.

Proteins known to be structurally and functionally homologous in different eubacteria were all methylated. Thus, the following group of proteins, which appear to be involved in peptidyltransferase or in polyphenylalanine-synthesizing activity in B. stearothermophilus were methylated (possible E. coli homologs are indicated in parentheses): BTL5(EL5), BTL6(EL3), BTL8(EL10), BTL11(EL11), BTL13(EL7L12)  $\gamma$  BTL20(EL16). In addition, the pentameric ribosomal complex (BTL13)<sub>4</sub>.BTL8 analogous to the complex (EL7L12)<sub>4</sub>.L10 of E. coli also contained methylated proteins.

The facts cited above show that methylation of ribosomal proteins takes place almost exclusively on proteins with an active participation in protein biosynthesis. Therefore, one is tempted to speculate on a possible functional role for these ribosomal modifications, although at present there is no direct demonstration for this.

In this regard, some preliminary results showed that the L7L12 proteins present in the ribosomes from E. coli grown at 27°C had an increased degree of methylation. These ribosomes had a lower capacity to synthesize polyphenylalanine in vitro in the presence of post-ribosomal extracts from the same cells, when compared with the ribosomes from E. coli grown at 37°C. However, it appears that this lower activity may be due to some factor present on the post-ribosomal extract rather than to a less active ribosome.

It will be of interest to further analyze if the higher degree of L7L12 methylation (when cells grow at low temperatures) affects protein synthesis when a natural mRNA is translated.

Analysis of the methylated amino acids in the most heavily methylated proteins, BSL11 from B. subtilis and BTL11 from B. stearothermophilus showed the presence of  $\epsilon$ -N-trimethyllysine as the major methylated amino acid in both proteins in agreement with known data for E. coli. In addition, BSL11 appeared to contain trimethylalanine a characteristic modified amino acid described only in EL11 from E. coli.

These results show in general a high degree of conservation for ribosomal protein methylation and suggest an important, albeit unknown, role for the modification of these components in eubacterial ribosomes.

On other hand, the H. cutirubrum ribosomes showed a different methylation pattern, in agreement with the fact that this microorganism belongs to a new line of descent.

## INTRODUCCION

La estructura primaria de una protefna está determinada por la secuencia de los aminoácidos que la constituyen. Sin embargo, esta estructura puede ser modificada post-traduccionalmente en algunas protefnas, mediante uniones covalentes de grupos químicos a los residuos aminoacídicos que la constituyen. (3,61)

Estas modificaciones post-sintéticas son de especial interés ya que pueden alterar la estructura de una protefna a nivel macromolecular con un posible cambio en su función. Esta es una manera muy eficiente por la cual una célula puede convertir una protefna en otra sin que haya una síntesis de novo, lo cual constituye una gran economía celular (3,61). Entre estas modificaciones se incluyen la metilación, acetilación, fosforilación, hidroxilación, ADP-ribosilación, nucleotidilación, carboxilación y glicosilación (61).

La fosforilación de protefnas es una de las modificaciones más estudiadas por su importancia en la regulación del metabolismo, especialmente el de los hidratos de carbono (36). Sin embargo, el significado biológico de la mayoría de las modificaciones de la cadena lateral de los aminoácidos en las protefnas no es muy claro.

La metilación de protefnas ha sido de especial interés durante los últimos 20 años y se ha investigado en forma activa en procesos tales como: quimiotaxis bacteriana, exocitosis,



regulación de la expresión de genes, contracción muscular, transporte de electrones, síntesis del transportador de grupos acilo (carnitina). (3,61).

La metilación de las proteínas consiste en la incorporación de uno o más grupos metilo a la cadena lateral en uno o más aminoácidos después que estos se han incorporado a la cadena polipeptídica por el proceso de traducción (1,3,13,61). Esta modificación es un proceso enzimático que ocurre principalmente con la participación de S-adenosil metionina.

Los residuos de aminoácidos que se han encontrado metilados son: lisina ( $\epsilon$ -amino), arginina (grupo guanidino), histidina (grupo imidazol), aminoácidos N-terminales (N-metilaciones) y los grupos carboxilo de los aminoácidos glutámico y aspártico (14,61).

Es interesante destacar que este tipo de modificaciones se ha encontrado en diversos organismos y en proteínas altamente especializadas tales como histonas, flagelina, miosina, actina, opsina, citocromo c (61).

Por otra parte, se ha descrito que en Escherichia coli (1,13,14) y en algunos eucariontes (15,29) las proteínas ribosomales y el RNA se encuentran metilados, pero aún no está claro el papel que juegan estas modificaciones en la estructura y función del ribosoma. El objetivo general del presente trabajo es estudiar algunos aspectos de la metilación de las proteínas ribosomales en bacterias.

El ribosoma es un organelo universal que cumple en todos los seres vivos la función de realizar el proceso de traducción de la información genética (58). Está formado por dos subunidades de diferente tamaño constituidas cada una de ellas por proteínas y diferentes clases de RNA.

Bajo ciertas condiciones, tales como a concentración baja del ión  $Mg^{+2}$ , los ribosomas de E. coli se disocian completamente en sus dos subunidades las que poseen coeficientes de sedimentación de 30S y 50S. La subunidad grande, de 50S, contiene aproximadamente 34 proteínas y 2 clases de RNA de 5S y 23S, mientras que la subunidad pequeña, de 30S, posee 21 proteínas y un RNA de 16S (58).

En 1966, Comb y colaboradores (19) describieron la presencia de residuos de lisina metilados en proteínas ribosomales de Blastocladiella emersonii. Sin embargo, no identificaron las proteínas metiladas ni la naturaleza de las lisinas metiladas. En 1971 Beaud y Hayes (8) encontraron además que cuando crecían células de E. coli ( $met^{-}$ ) en un medio mínimo suplementado con etionina (un análogo de la metionina) se obtenían componentes celulares sub-metilados debido a que aún cuando la etionina se incorporaba a las proteínas en el lugar de la metionina, no era sustrato para las adenosil transferasas que son las enzimas que participan en la formación de S-adenosilmetionina la cual es utilizada en la mayoría de las metilaciones celulares (3,61). Beaud y Hayes (8) encontraron además que cuando las subunidades ribosomales 30S de células de E. coli crecidas en etionina eran

metiladas in vitro con S-adenosil-L-(metil- $^{14}\text{C}$ )metionina los grupos metilo radiactivos se incorporaban exclusivamente en el RNA ribosomal. Sin embargo, cuando se utilizaban subunidades 50S submetiladas, el 60 % de los grupos metilo incorporados se encontraron en las protefnas ribosomales de E. coli (8).

En 1972, Terhorst y colaboradores (74) encontraron  $\epsilon$ -N-monometillisina en el 50 % de las cadenas polipeptídicas de las protefnas ribosomales L7L12 de E. coli. Por otro lado, Alix y Hayes realizando experimentos similares a los descritos por Beaud y Hayes identificaron residuos de trimetillisina en las protefnas ribosomales L11, L5 y L3 de E. coli con el 85 % de la radiactividad incorporada en L11 (1).

Chang y Chang por otra parte, desarrollaron un método más sensible para la determinación de las protefnas ribosomales metiladas (13). Este método consiste fundamentalmente en crecer células de E. coli en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $^{14}\text{C}$ -metionina) los cuales se incorporan indistintamente a las cadenas polipeptídicas. Después de aislar y separar las protefnas ribosomales así marcadas, se determina la radiactividad incorporada y la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de cada una de ellas. Aquellas protefnas 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 protefnas



que poseen una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mayor que la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de las proteínas totales antes de su separación (ver figura 1).

Mediante este método, Chang y Chang (12,14) demostraron que la metilación de las proteínas ribosomales de E. coli ocurre fundamentalmente en la subunidad 50S. La figura 2A muestra la ubicación de algunas de las proteínas ribosomales en la superficie del ribosoma de acuerdo a datos obtenidos de la literatura (9,39). En la figura 2B se indica la ubicación sólo de aquellas que son metiladas (13,14), a excepción de L3 y L33, que también son metiladas pero cuya ubicación topográfica aún no se conoce. Es interesante considerar que algunas de estas proteínas metiladas tienen una importante función en el ribosoma. Así, las proteínas L7L12 se han descrito como esenciales para la función ribosomal ya que participan en las etapas de iniciación, elongación, y término de la síntesis proteica (10,50). Estas proteínas son idénticas entre sí excepto que la L7 posee el grupo amino terminal acetilado. Recientemente L. A. Kirsebom y L. A. Isaksson (35) trabajando con mutantes que presentan las proteínas L7L12 electroforéticamente alteradas, demostraron que estas mutaciones aumentan los errores en la traducción tanto in vivo como in vitro, lo que indica que de alguna forma L7L12 están involucradas en el control de la fidelidad traduccional.

La proteína L11 de E. coli, es la más metilada de todas y participa en el control restringido (62). Esta proteína junto con L7L12 y L10, están implicadas en un importante cambio

Figura 1. Metilación de proteínas ribosomales en bacterias. ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )metionina se incorporan indistintamente en las proteínas celulares. Los ribosomas así marcados se disocian en subunidades ribosomales. Las proteínas ribosomales se separan por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Aquellas proteínas que presenten 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. Después de hidrolizar las proteínas individuales con  $\text{HCl}$  6 N, se analizan los aminoácidos por electroforesis de alto voltaje, o cromatografía en papel.

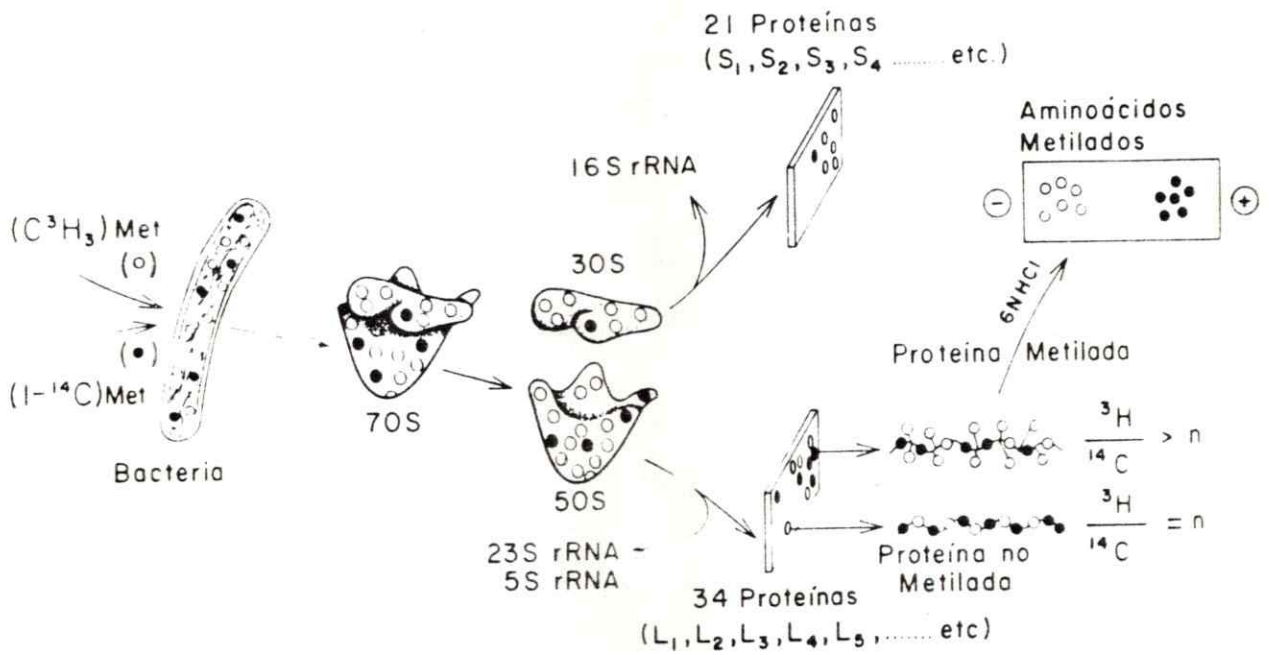
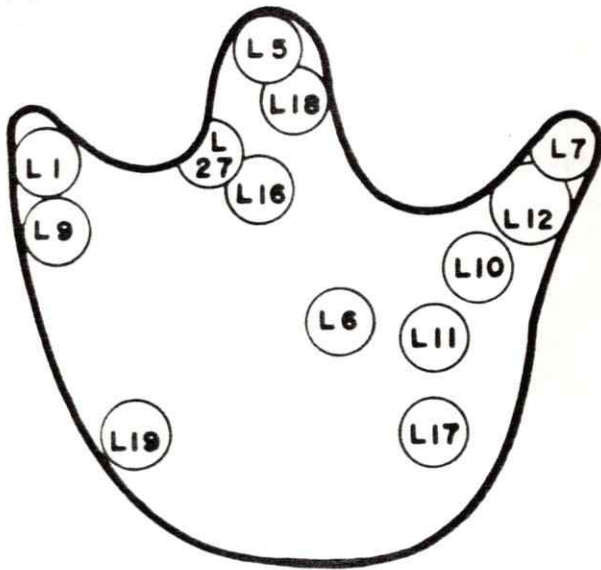


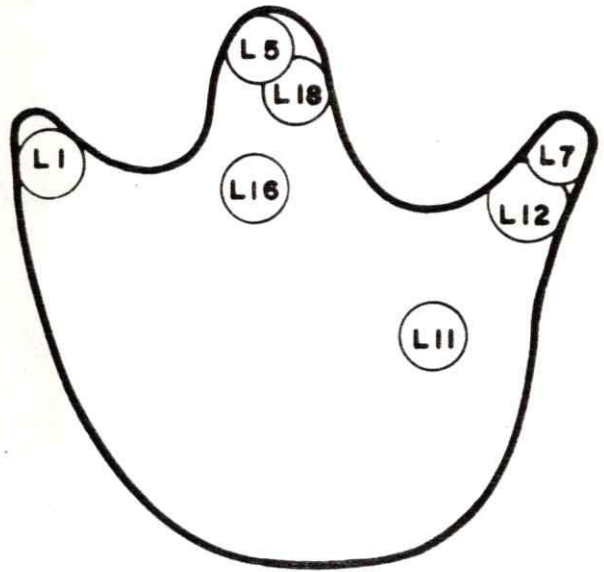
Figura 2. Topografía de algunas de las proteínas ribosomales 50S de E. coli en el modelo ribosomal de consenso descrito por J. Lake (39).

(A) Ubicación de las proteínas ribosomales en el modelo de consenso descrito por Lake (39). (B). En el modelo de consenso, indicamos las proteínas ribosomales descritas como metiladas en E. coli (14). La ubicación topográfica de las proteínas en el ribosoma, se determinó por inmunomicroscopía electrónica y difracción de neutrones (39). La ubicación de las proteínas L5, L6, L10, L11 en este modelo esta de acuerdo a la ubicación descrita por Brimacombe y colaboradores (9).

A



B





estructural en el ribosoma a expensas de la hidrólisis de GTP (50); además, la proteína L11 junto con la L16 forman parte del centro peptidil transferasa del ribosoma (57,59).

Los estudios realizados por Alix y Nierhaus (2,56) con proteínas submetiladas de E. coli indican que la metilación de ciertos componentes ribosomales es importante para un correcto ensamblaje y para la actividad normal de la subunidad 50S. La falta de metilación conduce a la formación de partículas que carecen de L16 y poseen una estructura en la cual el RNA 23S es muy accesible a la degradación nucleolítica. Es interesante destacar que las proteínas L1, L7, L11 y L12 (todas metiladas) y L10 son proteínas que se unen directamente al RNA 23S y que las proteínas L5 y L18 (metiladas) y L25 se unen directamente al RNA 5S (9).

Todos estos antecedentes sugieren que si estas modificaciones estuvieran relacionadas con la función que cumplen las proteínas dentro del ribosoma tanto a nivel estructural como funcional deberíamos encontrar estas metilaciones en componentes ribosomales que ejercen funciones homólogas en otros procariontes.

Aún cuando en la síntesis proteica participan sobre 200 componentes, la mayoría de estos pueden ser intercambiados entre por ejemplo, los de E. coli y los del género Bacillus (69). Así Higo y colaboradores (30) han logrado obtener ribosomas híbridos en los cuales cada una de las proteínas de la subunidad 30S de E. coli ha sido reemplazada por su homóloga de la subunidad 30S

de B. stearothermophilus. Los RNA 5S y 23S de E. coli han sido utilizados para reconstituir ribosomas 50S de B. stearothermophilus (59). Los factores de iniciación de B. stearothermophilus funcionan con ribosomas de E. coli y vice versa (43), los factores EF-G y EF-Tu de B. subtilis y B. stearothermophilus también funcionan con ribosomas de E. coli (67,77). Por otra parte, ha sido posible identificar alrededor de 20 pares de proteínas funcional e inmunológicamente equivalentes entre E. coli y B. stearothermophilus (6,22,31).

Todos estos antecedentes llevan a pensar que a pesar de las distancias evolutivas, existiría dentro de los procariontes una correspondencia directa entre las proteínas ribosomales como entre los RNA, por lo cual podría esperarse que las metilaciones se hayan conservado dentro de ellos.

Estudios realizados tanto en nuestro laboratorio (45), como en otro (11) han demostrado que al igual que en E. coli la metilación de las proteínas ribosomales de B. subtilis y de B. megaterium ocurre principalmente en la subunidad 50S. Cuando se comparan la proteínas metiladas de E. coli y de B. subtilis mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, se encuentra que su movilidad electroforética es muy similar; además ha sido posible observar que algunas proteínas descritas como funcional e inmunológicamente equivalentes (L11 de E. coli vs L11 de B. subtilis, L7L12 de E. coli vs L9 de B. subtilis) son metiladas (45). Esto apoya la idea de una posible conservación de la metilación de las proteínas ribosomales.

## PROPOSITOS DE ESTE TRABAJO.

1.- Los primeros estudios estuvieron destinados a establecer la existencia de un patrón de metilación común para las proteínas ribosomales de diversos procariontes. Para este objetivo se analizó la metilación de las proteínas ribosomales de B. stearothermophilus, un Gram positivo que crece entre 60°C y 80°C y de Alteromonas espejiana (Pseudomonas Bal 31), un Gram negativo que habita en el mar y que es considerado un halofílico moderado.

2.- Con el fin de establecer hasta que nivel podría estar conservada la metilación en procariontes, se analizaron los aminoácidos metilados presentes en algunas proteínas ribosomales de diferentes microorganismos.

3.- La estructura del ribosoma ha sido utilizada para buscar relaciones evolutivas entre los procariontes y eucariontes. Woese y Fox (79) basados en estudios comparativos del RNA ribosomal de diferentes especies propusieron la existencia de una nueva línea de descendencia, las Arqueobacterias, que difiere con la de los procariontes y eucariontes. Con el propósito de analizar si la metilación de las proteínas ribosomales de procariontes difiere de la de las arqueobacterias se analizó la metilación de las proteínas ribosomales de Halobacterium cutirubrum una arqueobacteria clasificada como halofílico extremo y que crece a concentración de NaCl 4,3 M (47,68).

4.- Hasta ahora ha sido difícil encontrar un papel fisiológico para la metilación de las proteínas ribosomales. Los estudios

realizados por Chang (16) han demostrado que las proteínas acídicas L7L12 aisladas de E. coli crecida a distintas temperaturas presentan distinto grado de metilación. Como estas proteínas son esenciales para la función ribosomal y con el propósito de establecer si existe alguna relación entre la metilación y la función de estas proteínas, se analizó la capacidad para sintetizar polifenilalanina de ribosomas provenientes de E. coli crecida a diferentes temperaturas.



## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS.

(1-<sup>14</sup>C)metionina (60 Ci/mol), (metil-<sup>3</sup>H)metionina (15 Ci/mmol) y L-(U-<sup>14</sup>C)fenilalanina (513 Ci/mol), se adquirieron en Amersham International. Glucosa, sacarosa, tiamina, ácido nicotínico, ácido uridílico, glicerol, EDTA, biotina, 2-mercaptoetanol, PMSF, alúmina, acrilamida, bisacrilamida, urea, TEMED, riboflavina, Tris, bistris, negro amido, MES, azul de bromofenol, azul de Coomassie, SDS, ninhidrina, ATP, GTP, fosfoenolpiruvato, poli U, PPO, POPOP, tRNA total de E. coli, DNAasa DN-100, piruvato kinasa, lisozima, aminoácidos,  $\epsilon$ -N-monometilisina, metionina sulfona, metionina sulfóxido, se adquirieron en Sigma Chemical Co. N-trimetilisina se obtuvo en Calbiochem-Behring. N-trimetilalanina fué generosamente donada por D. Hayes y F. Lederer. Casaminoácidos, bactotripton, extracto de levaduras y "nutrient broth" se adquirieron en Difco. Acidos, solventes orgánicos y sales minerales se adquirieron en Merck. Piridina fué obtenida de Riedel de Haen. Papel filtro 3 MM, papel filtro N<sup>0</sup>1 y discos de fibra de vidrio (2,5 cm de diámetro) GF/C, se adquirieron en Whatman. Las proteínas ribosomales EL12 y EL10 purificadas fueron gentilmente donadas por N. Brot del instituto Roche de Biología Molecular de New Jersey, E.E.U.U..

## CEPAS BACTERIANAS.

Escherichia coli D-10 (met, rel), fue gentilmente cedida por D. Hayes; Bacillus subtilis 168 (Marburg), se ha mantenido en nuestro laboratorio por varios años; Bacillus stearothermophilus ATCC 7953, fué donada por S. Fanestock; Alteromonas espejiana fue gentilmente donada por E. Canelo; y Halobacterium cutirubrum fué gentilmente donada por A.T. Matheson.

Los medios de cultivo y condiciones de crecimiento para las diferentes cepas bacterianas se resumen en la Tabla I. Los medios mínimos y los medios sintéticos fueron utilizados para obtener células marcadas radiactivamente. Los llamados "medios ricos" fueron utilizados para obtener células no-marcadas o células "carrier".

## MEDIOS DE CULTIVO

Medio mínimo de Chang. Contenia: Tris-HCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; FeCl<sub>3</sub> 0,01 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,32 mM. El medio se ajustó a pH 7,4 con KOH y después de esterilizarlo se agregó en forma estéril, glucosa (hasta una concentración final de 0,3 %), tiamina 2 µg/ml y de 15 µg por litro de cada uno de los siguientes L-aminoácidos: alanina, arginina, cistina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina, histidina, triptofano, ácido aspártico, asparagina y glutamina.

TABLA I

Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Microorganismo y cepas	Medios de cultivo	Temperatura de crecimiento (°C)	Referencia
<u>Escherichia coli</u> D-10 (met, rel)	a) Mfimo de Chang b) Medio rico	27 y 37 27 y 37	(14)
<u>Bacillus subtilis</u> 168 T <sup>+</sup>	a) Mfimo de Spizizen b) Medio G	37 37	(71) (27)
<u>Bacillus stearothermophilus</u> ATCC 7953	a) Mfimo TMLM b) Medio rico	62 62	(66) (21)
<u>Alteromonas espejiana</u>	a) Sintético de Bal b) Bal broth	30 30	(23) (23)
<u>Halobacterium cutirubrum</u>	a) Sintético de Onishi b) Sehgal y Gibbons	37 37	(60) (68)

Medio rico para E. coli. Contenia por litro: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levaduras, 10 g de NaCl y 2 g de casaminoácidos.

Medio mínimo de Spizizen. Contenia,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2 % ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,4 % ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6 % , citrato trisódico x 2  $\text{H}_2\text{O}$  0,1 % ,  $\text{MgSO}_4$  x 7  $\text{H}_2\text{O}$  0,5 % . Después de esterilizarlo el medio fue suplementado con glucosa hasta alcanzar una concentración de 0.5 % .

Medio G. Este medio contenia por litro: 8 g de nutrient broth y 20 mg de L-triptofano. El pH se ajustó a 6,8 y después de esterilizar el medio, éste se suplementó con,  $\text{CaCl}_2$   $10^{-3}$  M,  $\text{FeSO}_4$   $10^{-6}$  M,  $\text{MnCl}_2$   $10^{-5}$  M, KCl 0,1 % ,  $\text{MgSO}_4$  0,025 % y glucosa 0,1 %

La glucosa y el  $\text{Fe}^{+2}$  se esterilizaron en una solución separada del resto de las sales.

Medio mínimo TMLM. Se componía de los siguientes volúmenes de soluciones de L-aminoácidos al 1 % : histidina-HCl, 0,42 ml; isoleucina, 1 ml; metionina, 0,52 ml; valina, 1,26 ml; glutamato-HCl, 4 ml. Además contenia 1 ml de biotina (10 mg/100 ml); 1 ml de ácido nicotínico (10 mg/100 ml); 1 ml de tiamina x HCl (10 mg/100 ml); 0,01 ml de  $\text{CaCl}_2$  x 2  $\text{H}_2\text{O}$  al 5 % ; 0,01 ml de  $\text{FeCl}_3$  x 6  $\text{H}_2\text{O}$  al 0,05 % ; 0,01 ml de  $\text{MnCl}_2$  10 mM; 1 ml de glucosa al 20 % y 10 ml de solución de sales minerales (10 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g/l de NaCl, 4 g/l de  $\text{MgSO}_4$  y 5 ml de tampón fosfato 1,8 M pH 7,7). El volumen final se ajustó a 100 ml con agua desionizada y la solución se esterilizó por filtración. El pH final de este medio fue 7,3.



**Medio rico para B. stearothermophilus.** Contenfa por litro: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levaduras, 5 g de NaCl, 10 g de glucosa y 0,0001 g de  $MnCl_2$ . El pH final se ajustó a 7 con KOH 1 N.

**Medio Bal broth.** Contenfa por litro: 8 g de nutrient broth, 0,7 g de KCl, 1,5 g de  $CaCl_2 \times 2 H_2O$ , 12 g de  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  y 26 g de NaCl.

**Medio sintético de Bal.** Este medio contenfa por litro: 0,7 g de KCl, 1,1 g de  $NH_4Cl$ , 1,5 g de  $CaCl_2 \times 2 H_2O$ , 12 g de  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 26 g de NaCl, 12,1 g de Tris base, 20 mg de L-arginina y 20 mg de L-prolina. Se ajustó a pH 7,3 y después de ser esterilizado, se adicionó de 12,5 ml de glucosa al 20 % y de 1,7 ml de  $KH_2PO_4$  al 1,5 %.

**Medio de Sehgal y Gibbons.** Este medio contenfa por litro: 7,5 g de casaaminoácidos, 10 g de extracto de levaduras, 3 g de citrato trisódico, 2 g de KCl y 250 g de NaCl. El pH se ajustó a 7,5 con KOH y después de esterilizar el medio se suplementó con 20 g de  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ .

**Medio sintético de Onishi.** Contenfa por 100 ml las siguientes cantidades de L- aminoácidos: 21,5 mg de alanina, 40 mg de arginina, 5 mg de cistina, 130 mg de ácido glutámico, 6 mg de glicina, 22 mg de isoleucina, 80 mg de leucina, 85 mg de lisina, 13 mg de fenilalanina, 5 mg de prolina, 30,5 mg de serina, 25 mg de treonina, 20 mg de tirosina, 50 mg de valina y 15 mg de histidina. Contenfa además 10 mg de ácido adenilico, 10 mg de ácido uridilico, 100 mg de glicerol, 500 mg de  $NH_4Cl$ , 25 g de

NaCl, 2 g de  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 10 mg de  $KNO_3$ , 5 mg de  $K_2HPO_4$ , 5 mg de  $KH_2PO_4$ , 5 mg de citrato de sodio, 0,03 mg de  $MnSO_4 \times H_2O$ , 0,7 mg de  $CaCl_2 \times 7 H_2O$ , 0,044 mg de  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ , 0,23 mg de  $FeCl_2$  y 5  $\mu g$  de  $CuSO_4 \times 7 H_2O$ . El pH final se ajustó a pH 6,2 con KOH.

#### TAMPONES UTILIZADOS EN LA PREPARACION DE RIBOSOMAS Y EXTRACTOS CELULARES.

Tampón A. (Lavado de células en general): KCl 1 M, Tris-HCl pH 7,8 0,01 M,  $MgCl_2$  0,01 M, EDTA 0,005 M, 2-mercaptoetanol 0,01 M, glicerol 10 %.

Tampón B. (Lavado de células de bacterias halofílicas): NaCl 4,5 M, KCl 0,03 M,  $MgCl_2$  0,1 M.

Tampón C. (Lavado de células de E. coli): fosfato de potasio pH 7,5 0,01 M,  $MgCl_2$  0,001 M, 2-mercaptoetanol 0,006 M.

Tampón D. (Ruptura de células en general): Tris-HCl pH 7,5 0,05 M,  $MgCl_2$  0,02 M, KCl 0,2 M, EDTA 0,001 M, 2-mercaptoetanol 0,006 M, PMSF 0,0035 M, glicerol 5 %.

Tampón E. (Ruptura de bacterias halofílicas): Tris-HCl pH 7,6 0,01 M,  $MgCl_2$  0,1 M, KCl 3,4 M.

Tampón F. (Lavado de ribosomas en general): Tris-HCl pH 7,5 0,01 M, acetato de magnesio 0,01 M,  $NH_4Cl$  0,5 M, 2-mercaptoetanol 0,006 M.

Tampón G. (Lavado de ribosomas de bacterias halofílicas): Tris-HCl pH 7,5 0,01 M, acetato de magnesio 0,01 M,  $NH_4Cl$  0,5 M, KCl 3,4 M, 2-mercaptoetanol 0,006 M.

**Tampón H.** (Disociación de ribosomas en general): Tris-HCl pH 7,4 0,01 M, acetato de magnesio 0,0001 M,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,05 M.

**Tampón I.** (Disociación de ribosomas de bacterias halofílicas): Tris-HCl pH 8,05 0,02M, acetato de magnesio 0,001 M,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 M, KCl 3 M.

**Tampón J.** (Resuspensión de ribosomas en general): Tris-HCl pH 7,4 0,01 M, acetato de magnesio 0,01 M, 2-mercaptoetanol 0,007 M, PMSF 0,001 M,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,06 M.

**Tampón K.** (Diálisis de S-150): Tris-HCl pH 7,8 0,01 M, acetato de magnesio 0,01 M, 2-mercaptoetanol 0,006 M.

#### CRECIMIENTO Y MARCACION DE LAS CELULAS.

Para los experimentos de doble marca se creció cada tipo de célula en 50 ml de medio sintético adecuado (ver Tabla I) el cual fue suplementado con 75  $\mu\text{Ci}$  de (1- $^{14}\text{C}$ )metionina, 500  $\mu\text{Ci}$  de (metil- $^3\text{H}$ )metionina y metionina fría en cantidades suficientes para tener una concentración final de 6  $\mu\text{g/ml}$ .

Los cultivos se incubaron a la temperatura apropiada (Tabla I) y se efectuaron con agitación en matraces con tubo lateral para seguir el crecimiento midiendo la absorbancia a 660 nm en un fotocolorímetro de Klett-Summerson (filtro rojo).

Todas las cepas bacterianas se cosecharon en fase semilogarítmica de crecimiento para impedir la esporulación del B. stearothermophilus y B. subtilis. Las células se lavaron dos veces con tampón A para reducir proteasas (41) y una vez con

tampón A que contenía 50 mM KCl. Las células de H. cutinubrum se lavaron cuidadosamente con tampón B.

Para los experimentos de síntesis de polifenilalanina, las células de E. coli D-10 se cosecharon en la fase final del crecimiento exponencial y se lavaron una vez con tampón C en presencia de 1 µg/ml de DNAasa.

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 metionina concentración final).

#### PREPARACION DE RIBOSOMAS Y PROTEINAS RIBOSOMALES DE CELULAS MARCADAS IN VIVO.

Ruptura de células de B. subtilis, B. stearothermophilus y A. espejiana. Después de agregar entre 0,5 g y 1,5 g de células no marcadas a cada tipo de células marcadas radiactivamente, estas fueron resuspendidas en 2,5 volúmenes de tampón D en presencia de macaloid (8 mg por gramo de células). La suspensión se incubó por 30 minutos a 37<sup>0</sup>C en presencia de lisozima (1 mg/ml), seguido de una incubación con DNAasa (10 µg/ml) por 10 minutos a 37<sup>0</sup>C. Posteriormente las células se sometieron a sonicación por 5 minutos con intervalos de 30 segundos cada un minuto en un sonicador marca Raytheon.



Los restos celulares se separaron por centrifugación a 20.000 x g por 10 minutos. El líquido sobrenadante obtenido en cada caso se sometió a continuación 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 4 horas. La fracción sobrenadante obtenida en esta etapa se denominó S-150. El centrifugado ribosomal ("pellet") se lavó dos veces resuspendiéndolo en tampón F y centrifugándolo posteriormente a 20.000 x g por 20 minutos con el objeto de eliminar material agregado. El líquido sobrenadante así obtenido se sometió a una ultracentrifugación a 150.000 x g por 4 horas para recuperar los ribosomas lavados, los que se resuspendieron finalmente en 100  $\mu$ l de tampón J.

Para disociar las subunidades ribosomales de las diferentes bacterias, se siguió básicamente el método descrito por Guha y colaboradores para B. subtilis (25). Los ribosomas 70S se dializaron contra un litro de tampón H durante 9 horas con 2 cambios del mismo tampón. Las subunidades ribosomales se separaron en una gradiente continua de sacarosa (15 a 30 %) en tampón H con una concentración de acetato de magnesio de 0,5 mM. Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución patrón de sacarosa 2M la cual fue esterilizada a 120<sup>0</sup>C por 20 minutos para destruir la ribonucleasa contaminante que pudiera contener. Las gradientes se centrifugaron a 23.000 rpm por 16 horas en un rotor Beckman SW 25.1 a 4<sup>0</sup>C.



Se recibieron fracciones de 1 ml (en un colector Gilson) y se midió la absorbancia de cada una a 260 nm, diluyendo 10  $\mu$ l de cada fracción en 1 ml de tampón H. Las fracciones correspondientes a las subunidades 30S y 50S se colectaron, se llevaron a una concentración de 10 mM en  $Mg^{++}$  con acetato de magnesio 1 M y se recuperaron por centrifugación a 50.000 rpm durante 16 horas en un rotor Beckman 65 a 4<sup>0</sup>C. Para eliminar cualquier contaminación de las subunidades 50S por las subunidades 30S, el sedimento considerado como subunidades 50S se volvió a purificar a través de una segunda gradiente similar a la descrita anteriormente.

Las subunidades purificadas se recuperaron por centrifugación de las fracciones pertinentes a 150.000 x g durante 16 horas y se guardaron a -20<sup>0</sup>C en 100  $\mu$ l de tampón J.

**Ruptura de las células de H. cutirubrum.** Para obtener ribosomas de H. cutirubrum, las células se trataron en forma diferente por pertenecer a un grupo de bacterias consideradas como halofílicas extremas. La concentración intracelular de iones en estos organismos es extremadamente alta ( $\sim$ 4 M KCl). Las enzimas y organelos celulares tales como ribosomas y proteínas en general han mantenido su actividad biológica a estas altas concentraciones salinas internas por lo cual se requiere de una concentración iónica similar in vitro. Para obtener subunidades ribosomales estables se siguió básicamente el método descrito por Visentin y col. (76).

Las células de H. cutirubrum se rompieron por mezcla y molienda con alúmina (2 g por gramo de células) durante 30 minutos en un mortero sobre hielo. Enseguida se agregaron 2 volúmenes de tampón E por gramo de células en presencia de 3,5 mM PMSF y 6 mM 2-mercaptoetanol. La pasta se homogeneizó durante 10 minutos. Los restos celulares y la alúmina se removieron por centrifugación a 20.000 x g durante 10 minutos. El líquido sobrenadante así obtenido se incubó a 37<sup>0</sup>C durante 10 minutos en presencia de DNAasa (10 µg/ml) libre de RNAasa. El S-30, S-150 y ribosomas 70S se obtuvieron por diferentes centrifugaciones en la forma descrita anteriormente. Para lavar los ribosomas se utilizó el tampón G. Las subunidades ribosomales se disociaron sometiénolas a diálisis contra un litro de tampón I durante 9 horas a 10<sup>0</sup>C y se separaron en una gradiente lineal que contenía entre 15 y 30 % de sacarosa en amortiguador I. La gradiente se centrifugó durante 16 horas a 23.000 rpm y a 10<sup>0</sup>C en un rotor Beckman SW 25.1. Para recuperar las subunidades de la gradiente se siguió el mismo procedimiento descrito más arriba. Finalmente, las subunidades 30S y 50S se resuspendieron en 100 µl de tampón E.

**Preparación de las proteínas ribosomales:** El total de las proteínas ribosomales de todas las especies estudiadas se extrajeron de las respectivas subunidades 50S por tratamiento con ácido acético al 66 % (28) en presencia de PMSF 3 mM y Mg<sup>+2</sup> 0,05 M. Las proteínas obtenidas por este método fueron

liofilizadas y utilizadas para electroforesis en geles de poliacrilamida.

#### ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES METILADAS IN VIVO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El análisis de las proteínas ribosomales metiladas in vivo se realizó por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida por el método estándar descrito por Kaltschmidt y Wittmann (34) (ver figura 1 y 3). Para un mejor análisis se utilizó un equipo especial que permite la electroforesis bidimensional simultánea de 5 muestras, correspondientes a las proteínas ribosomales de diferentes especies, bajo condiciones idénticas.

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 3 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 (600 µg de proteínas 50S) se suspendieron en 0,2 ml de gel de muestra (4 % acrilamida) y se transfirieron con pipeta Pasteur en la

superficie del gel de fondo. El gel de muestra se cubrió con 0,1 ml de urea 4 M y se polimerizó en presencia de luz ultravioleta de onda larga y corta (1 a 2 horas a temperatura ambiente). Después de remover la urea con papel filtro, el tubo se llenó hasta el extremo con solución de gel superior (10 % de acrilamida) y se cubrió con 0,1 ml de urea 4 M. Para separar las proteínas ribosomales de H. cutinubrum la zona de migración de las proteínas acídicas (10 % acrilamida) se alargó de 40 mm a 55 mm y la zona correspondiente al gel de fondo (5 % acrilamida) se disminuyó de 55 mm a 40 mm ya que la mayor parte de las proteínas ribosomales de este microorganismo son acídicas (73).

Después de polimerizar la poli(acrilamida), los tubos se colocaron en un aparato de electroforesis Hoeffer Scientific Instruments modelo DE 101 y se llenaron los compartimentos del ánodo y cátodo con solución tampón de electrodos pH 8,6 (ver más abajo). El compartimento superior se conectó al ánodo y el compartimento inferior al cátodo. La electroforesis se realizó durante 17 horas a 75 volts y a 40°C. Después de este período los geles se extrajeron cuidadosamente de los tubos de vidrio para ser utilizados en la segunda dimensión.

Las soluciones utilizadas en la primera dimensión fueron las siguientes:

**Gel de fondo (5 % acrilamida).** Esta solución contenía: 18 g de urea, 2,5 g de acrilamida, 0,09 g de bis acrilamida, 1,6 g de ácido bórico, 2,3 g de Tris y agua destilada en cantidad suficiente para 49,5 ml. Después de remover el aire de la



solución en frío por 10 minutos con una bomba de vacío, se agregó 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 que contenía 5 mg de riboflavina en 10 ml de agua.

Mezcla III: Se combinaron 10 ml de la mezcla I con 0,1 ml de la 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 % 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 en cantidad suficiente para 49,5 ml. Después de remover el aire por 10 minutos en frío con una bomba de vacío, se agregó 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, 19,2 g de ácido bórico, 29,1 g de Tris, y agua destilada en cantidad suficiente para 2 litros. El pH final de la solución fue de 8,6.



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 de gel, se selló con parafilm y tela adhesiva en el extremo inferior. A cada uno de los 5 compartimientos así sellados se agregó 3 ml de gel de sellado (20 % acrilamida). Después de polimerizar el gel de sellado (15 minutos a temperatura ambiente) se llenó cada compartimiento vertiendo sobre el gel de sellado, el gel de separación 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 cilíndrico de primera dimensión quedó soldado a la placa de segunda dimensión. Se retiró el parafilm y la tela adhesiva de los extremos inferiores de las placas de gel y se llenaron los compartimientos 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 V y a 40°C. El ánodo se conectó al compartimiento superior del equipo de electroforesis.

Las soluciones utilizadas en la segunda dimensión fueron las siguientes:

**Gel de separación.** Esta solución de gel contenía: 93,1 g de urea, 46,54 g de acrilamida, 1,29 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. A los 200 ml restantes se les removió el aire 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 % recién preparado; las soluciones se mantuvieron siempre en hielo.

**Gel de sellado.** Esta solución contenía: 50 ml de gel de separación, 3,5 g de acrilamida y 0,085 g de bis acrilamida. Después de remover el aire de la solución por 10 minutos en frío se agregaron 0,49 ml de TEMED y 2,5 ml de persulfato de amonio al 10 % 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.

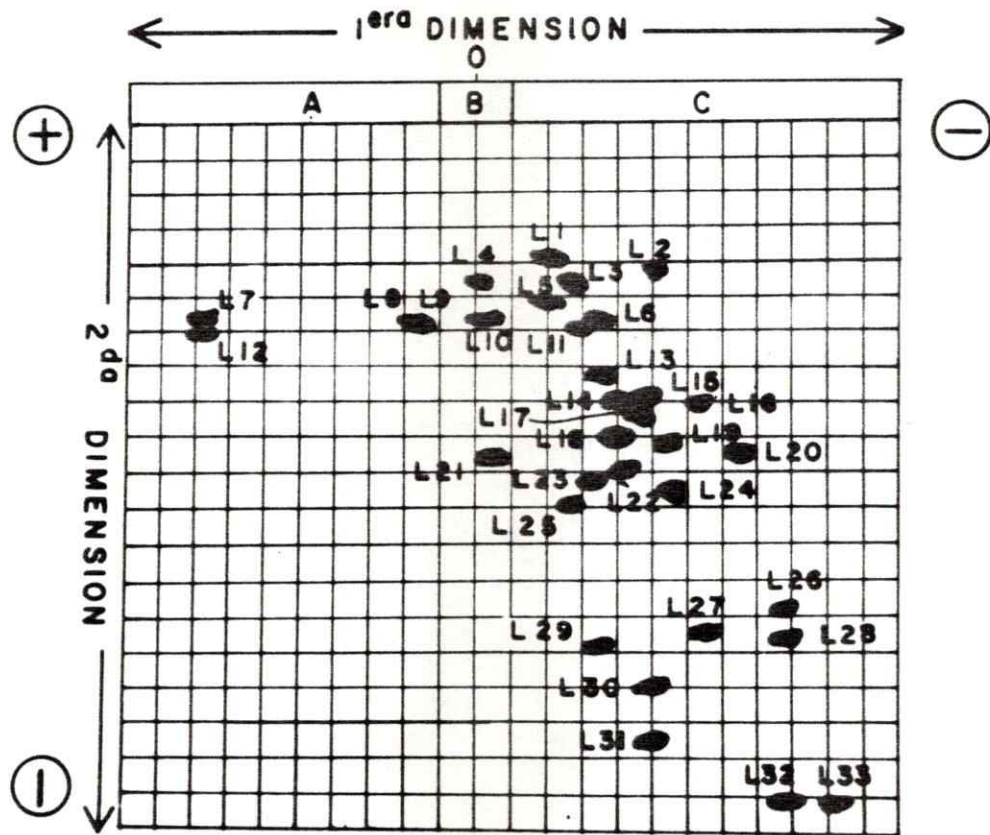
**Tinción de los geles.** Después de sacar cuidadosamente las placas de geles del equipo de electroforesis, estas se tineron durante 15 minutos con solución de amido black al 0,55 % en ácido acético al 5 %. Enseguida, las placas se lavaron con agua corriente durante una hora para sacar el exceso de colorante y se destineron en ácido acético al 1 % por 48 horas. El ácido acético se cambio 4 a 6 veces durante el destenido.

#### IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES.

Para identificar y comparar las mezclas de proteínas extraídas de las diferentes preparaciones ribosomales se numeraron aquellas manchas que aparecieron en forma reproducible

Figura 3. Electroforetograma de las proteínas ribosomales 50S de E. coli (33).

La 1ª dimensión consta de 3 segmentos de diferente concentración de acrilamida. El segmento A de 40 mm de longitud posee 10 % de acrilamida y corresponde a la zona donde migran las proteínas acídicas. El segmento B de una longitud de 5 mm posee 4 % de acrilamida y corresponde al espacio donde se aplica la muestra de proteínas a separar. El segmento C de 55 mm de longitud posee 5 % de acrilamida y corresponde a la zona donde migra la mayoría de las proteínas que son de carácter básico. La 2ª dimensión, contiene 18 % de acrilamida y las proteínas migran hacia el cátodo. La numeración de las proteínas se efectuó desde el extremo superior izquierdo hasta el extremo inferior derecho de acuerdo a Kaltschmidt y Wittmann (33).





en la misma posición del gel bidimensional. La numeración se hizo siguiendo líneas horizontales imaginarias comenzando en el extremo superior izquierdo como se muestra en la figura 3.

Siguiendo esta convención descrita por Kaltschmidt y Wittmann (33) resultó que proteínas ribosomales de diferentes cepas bacterianas, no necesariamente son equivalentes, aún cuando se les asignó el mismo número. A la inversa, proteínas equivalentes resultaron con una numeración diferente de una especie a otra, como por ejemplo, EL7L12 de E. coli con BSL9 de B. subtilis y BTL13 de B. stearothermophilus (18,33,).

El análisis de las proteínas ribosomales de A. espejiana se realizó por primera vez en este trabajo. Las proteínas ribosomales de H. cutirubrum se habían analizado previamente por otro sistema electroforético (73). Sin embargo, se numeraron por primera vez en las condiciones electroforéticas empleadas en el presente trabajo.

Las proteínas ribosomales 50S de Escherichia coli se denominaron en este trabajo como: EL1, EL2, EL3,...etc.; las de Alteromonas espejiana AL1, AL2, AL3,... etc.; las de Bacillus subtilis BSL1, BSL2, BSL3,...etc.; las de Bacillus stearothermophilus BTL1, BTL2, BTL3,..etc. y las de Halobacterium cutirubrum HL1, HL2, HL3,...etc.

#### DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD.

Para determinar la radiactividad de cada proteína, las manchas teñidas y numeradas se cortaron del gel con la ayuda de



un bisturf; cada trozo de gel se trató con 0,4 ml de  $H_2O_2$  al 30 % por 12 horas a  $55^{\circ}C$  en frascos de centelleo. 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  $^3H$  y  $^{14}C$  y con una eficiencia de 60 % para  $^{14}C$  y 25 % para  $^3H$ .

Se analizó la razón  $^3H/^{14}C$  para cada una de las proteínas separadas en el gel y se consideraron metiladas aquellas proteínas que presentaron una razón  $^3H/^{14}C$  considerablemente mayor que la razón  $^3H/^{14}C$  del total de las proteínas antes de su separación de acuerdo al método descrito por Chang y Chang (13,45) (ver figura 1).

Para la determinación de la radiactividad de muestras secas en papel y en filtros de fibra de vidrio GF/C, se utilizó 5 ml de líquido de centelleo que contenía: 5 g de PPO, 0,10 g de POPOP y tolueno en cantidad suficiente para 1 litro de solución. Se utilizó el mismo contador de centelleo descrito más arriba.

#### ELECTROFORESIS EN GELES A PH 5.

En esta metódica desarrollada por Li y Subramanian (42), las proteínas más ácidas del ribosoma (equivalentes a EL7L12 de E. coli) migran en el gel como aniones, mientras que el resto de las proteínas ribosomales, en su mayoría de carácter

básico, permanecen en la primera parte del gel o se salen de él hacia el compartimiento del cátodo. Este procedimiento permitió analizar la metilación de las proteínas ácidas de *A. espejiana*, las que no se visualizaron en la electroforesis bidimensional estándar ya que presentaron un carácter más ácido que las proteínas EL7L12 de *E. coli* y se salen del gel en la electroforesis en la primera dimensión.

La electroforesis se efectuó en geles de 100 x 50 mm que contenían acrilamida al 4 % y bis acrilamida al 0,1 % en urea 8 M a temperatura ambiente en un aparato de electroforesis Hoefer Instrument. El tampón del electrodo superior (cátodo) fue Bistris 0,02 M ajustado a pH 6 con MES; el tampón de la solución de gel fue Bistris 0,057 M ajustado a pH 5 con ácido acético; el tampón del electrodo inferior (ánodo) fue Bistris 0,029 M ajustado a pH 5 con ácido acético. La solución de gel se polimerizó con 1  $\mu$ l/ml de TEMED y 5  $\mu$ l/ml de persulfato de amonio al 10 % recién preparado.

Las muestras de proteínas ribosomales liofilizadas (alrededor de 100  $\mu$ g de proteínas) se disolvieron en 100  $\mu$ l de tampón Bistris-MES 10 mM pH 6 en presencia de urea 4 M y 10 mM DTT. Como marcador del frente de la electroforesis se agregó 5  $\mu$ l de azul de bromofenol al 0,1 %. La electroforesis se efectuó a 2 mA por tubo hasta que el marcador llegó al extremo del gel (3 a 4 horas).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0,1 % (en 50 % metanol-7,5 % ácido acético) durante una hora y se destiñeron

durante 30 minutos en metanol al 50 % - ácido acético al 7,5 % y durante la noche en metanol al 5 % - ácido acético al 7,5 % .

Para determinar la radiactividad y la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de las proteínas ácidas se cortó el gel en tajadas de 1 mm y cada trozo se trató como se describió anteriormente.

#### ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO PENTAMÉRICO DEL BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS.

La proteína ácida del B. stearothermophilus, equivalente a las L7L12 de E. coli, migró en dos posiciones diferentes en la electroforesis bidimensional: la correspondiente a BTL13 y la de BTL13c (ver figura 5 en la sección Resultados). Para comprobar que en nuestras condiciones la proteína BTL13c (que en la primera dimensión migró como un complejo con la proteína BTL8) correspondía a la proteína BTL13 libre, ambas manchas se cortaron del gel y se eluyeron durante 17 horas a temperatura ambiente con 6 ml de tampón fosfato de sodio 0,01 M pH 6,8 que contenía 0,1 % SDS (14). Posteriormente las muestras extraídas se dializaron contra 3 litros de agua destilada durante 24 horas con 2 cambios de agua para remover el exceso de colorante y SDS. Los dializados se filtraron a través de filtros de microfibras de vidrio GF/C para remover el gel. Finalmente los filtrados se liofilizaron a sequedad.

Las muestras liofilizadas se disolvieron en 30  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía 2-mercaptoetanol 0,1M -2% SDS y se

analizaron por electroforesis en placa de poliacrilamida al 15 % y 0,1 % SDS (38).

#### ANALISIS DE LOS AMINOACIDOS METILADOS.

Para determinar los aminoácidos metilados en BSL11 y BTL11, se obtuvieron proteínas ribosomales marcadas con (<sup>3</sup>H-metil)metionina y se separaron en geles bidimensionales de poliacrilamida; cada proteína se extrajo de 5 placas de gel y se eluyeron en la forma descrita más arriba para BTL13 y BTL13c. De cada muestra se obtuvieron alrededor de 100 µg de proteína determinada por el método de Lowry (44). Las proteínas liofilizadas se hidrolizaron con 1 ml de HCl 6 N por 24 horas a 110°C en tubos sellados al vacío (52). El hidrolizado se evaporó a sequedad a 40°C en un evaporador rotatorio marca BUCHI. Para analizar los aminoácidos metilados las muestras se disolvieron en etanol al 50 % .

El análisis de los aminoácidos metilados se hizo por cromatografía descendente en papel y por electroforesis de alto voltaje (14).

**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 fue piridina-acetona-NH<sub>4</sub>OH 3 M (50:30:25 v/v/v). Como marcadores se utilizaron 10 µg de ε-DNP-lisina la cual junto con 100 µl de la muestra y 10 µg de cada uno de los estándares (señalados en la figura 7) se



aplicaron a 9 centímetros de un extremo del papel. Para localizar los aminoácidos después de la electroforesis, el papel se expuso a ninhidrina al 0.4 % en acetona y se calentó a 70°C por 5 minutos. Para determinar la radiactividad, el papel se cortó en tiras de 0,5 x 2,5 centímetros y se contó cada una como se indicó más arriba.

**Electroforesis de alto voltaje.** Se realizó en un papel Whatman 3 MM de 53 x 20 centímetros durante dos horas a 2000 volts en tampón borato de sodio 0,05 M pH 9,3. Como marcador se utilizó también 6 µg de azul de bromofenol. Las muestras y estándares se aplicaron en las mismas cantidades que para la cromatografía descendente y a 22 centímetros de uno de los extremos del papel.

Una vez aplicadas las muestras, el papel se empapó con tampón borato y se colocó entre dos polietilenos gruesos (41 x 50 centímetros) los que se ubicaron entre dos placas de vidrio del mismo tamaño para mantener estirado el papel durante la electroforesis. Todo este sistema se colocó sobre una placa de cobre refrigerada con agua circulante quedando los extremos del papel conectados a los electrodos y cubetas que contenían el tampón borato, mediante un trozo adicional de papel Whatman 3 MM de 20 centímetros de ancho y 13 centímetros de largo. La localización de los aminoácidos y determinación de la radiactividad se hizo de la misma forma descrita para la cromatografía descendente en papel.



## METILACION IN VITRO DEL COMPLEJO (EL7L12)<sub>4</sub>.EL10 DE E. COLI.

La metilación in vitro de EL7L12 y L10 se determinó utilizando ribosomas submetilados (ribosomas etionina) obtenidos de E. coli crecida en presencia de etionina (1). El ensayo se realizó esencialmente como lo describe Chang y Chang (12). Cada ensayo se realizó en un volumen final de 150  $\mu$ l y la mezcla de incubación contenía: Tris-HCl (pH 7.8) 50 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, 8,5 unidades de A<sub>260</sub> de ribosomas etionina 70S, 135 pmol de S-adenosil-L-(metil-<sup>3</sup>H)metionina (74Ci/mmol) y 50  $\mu$ g de proteínas del S-150 obtenido como se describe en (4). Después de incubar 60 minutos a 37°C, la reacción se inmunoprecipitó con anti L12 como se describe más abajo y de acuerdo a Jerez y Weissbach (32). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % con SDS (38).

## PREPARACION DE RIBOSOMAS Y EXTRACTOS DE E. COLI PARA MEDIR SINTESIS DE POLIFENILALANINA.

La preparación de ribosomas y extractos de E. coli se hizo fundamentalmente como lo describe Nierhaus y Dohme (57).

Para obtener ribosomas 70S, las células de E. coli D-10 se mezclaron con alúmina (2 g / g de células) y se rompieron por molienda durante 30 minutos en un mortero sobre hielo. Posteriormente se agregó 1 ml de tampón C por gramo de células

y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNAasa y se homogeneizó la pasta durante 10 minutos. La alúmina y los restos celulares se separaron mediante dos centrifugaciones consecutivas de 20 minutos a  $30.000 \times g$  cada una. El sobrenadante (S-30) se centrifugó por 5 horas a  $150.000 \times g$ . El centrifugado que contenía los ribosomas 70S se lavó una vez en tampón F, que contenía  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M, de la forma descrita anteriormente. Finalmente los ribosomas se suspendieron en un pequeño volumen de tampón C que contenía  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Después de una centrifugación a baja velocidad para remover los agregados (5 minutos a  $10.000 \times g$ ) se midió la concentración de ribosomas por absorbancia a 260 nm (1 mg de ribosomas = 14 U Abs. 260 nm). Los ribosomas se guardaron en fracciones que contenían alrededor de 100 mg de ribosomas a  $-70^\circ\text{C}$ .

El sobrenadante de la centrifugación a alta velocidad ( $150.000 \times g$ ) se dializó durante 9 horas contra un litro de tampón K, con 2 cambios de tampón durante la diálisis. El sobrenadante dializado se recentrifugó durante 5 horas a  $150.000 \times g$  para asegurarse que no contenía partículas ribosomales. Las 3/4 partes superiores del sobrenadante se guardaron en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  a  $-70^\circ\text{C}$  y se denominaron "enzimas S-150"

#### SINTESIS DE POLIFENILALANINA DEPENDIENTE DE POLI U.

Básicamente el método utilizado para medir la síntesis de polifenilalanina in vitro se hizo según lo descrito por Nierhaus y Dohme (57).

Cada ensayo se realizó en un volumen final de 95  $\mu$ l y la mezcla de incubación contenía: Tris-HCl pH 7,8, 15 mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  194 mM; acetato de magnesio 15 mM; 2-mercaptoetanol 3,3 mM; ATP pH 7, 1 mM; GTP pH 7, 0,032 mM; fosfoenolpiruvato 5 mM; poliU 20  $\mu$ g; piruvato kinasa 1,5  $\mu$ g; tRNA total de E. coli 20  $\mu$ g; L-(U- $^{14}\text{C}$ )fenilalanina (513 Ci/mol) 0,062  $\mu$ Ci, a una concentración final de 80  $\mu$ M; enzimas S-150 entre 25 y 300  $\mu$ g.

La reacción se inició con la adición de 140  $\mu$ g de ribosomas (2 U Abs a 260 nm) y se incubó la mezcla a 30°C por 45 minutos. La reacción se detuvo enfriando la mezcla de incubación en un baño con hielo y se le agregó 2,5 ml de TCA frío al 10 %. Después de calentar cada ensayo por 20 minutos a 95°C se enfriaron y se filtraron a través de discos de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron 3 veces con 2,5 ml de TCA al 10 % y 2 veces con etanol absoluto y se secaron bajo una lámpara de luz infraroja. La radiactividad incorporada se midió como se describió anteriormente.

#### ANALISIS DE EL7L12 EN RIBOSOMAS DE E. COLI MARCADOS IN VIVO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Los ribosomas de E. coli marcados in vivo se obtuvieron como se describió anteriormente. Alícuotas que contenían alrededor de 2  $\mu$ g de EL7L12 marcadas fueron inmunoprecipitadas con suero anti L12 como lo describe Jerez y Weissbach (32). La inmunoprecipitación se realizó en un volumen final de 300  $\mu$ l en tampón de inmunoprecipitación que contenía: Tris-HCl 50 mM pH

7,4; NaCl 0,5 M y tritón X-100 al 1 % (concentración final). La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 4 horas y luego a 4°C durante la noche. Después de centrifugar, los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con 0,2 ml de tampón de inmunoprecipitación y finalmente se solubilizó el inmunoprecipitado calentándolo durante 5 minutos a 100°C en 30 µl de un tampón que contenía: Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; SDS 2 %, glicerol al 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol al 0,001 %. Las proteínas así solubilizadas se sometieron a electroforesis en geles con SDS al 15 % acrilamida como lo describe K. Laemmli (38). Como control, se sometió a la electroforesis 2 µg de [<sup>3</sup>H] L12 (85.000 cpm) inmunoprecipitada con anti L12 en las mismas condiciones de las muestras.

Los geles se cortaron en secciones de 1 mm y la radiactividad en cada una de ellas se determinó como se describió anteriormente para los geles de electroforesis bidimensional.



## RESULTADOS

### SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES RIBOSOMALES 30S Y 50S DE DIFERENTES MICROORGANISMOS.

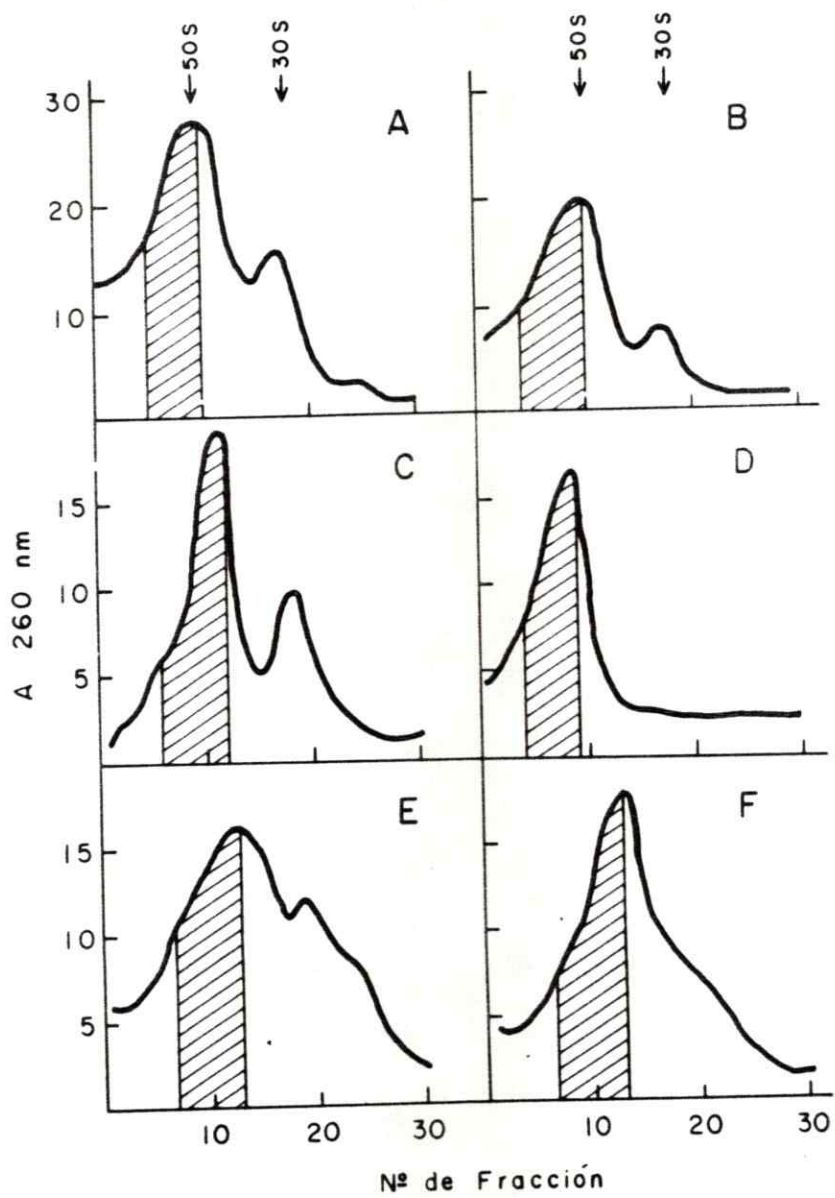
Para estudiar la metilación de las proteínas ribosomales se emplearon los siguientes microorganismos: Bacillus stearothermophilus, bacteria Gram (+) termofílica; Alteromonas espejiana, bacteria Gram (-) de habitat marino y Halobacterium cutirubrum, bacteria halofílica extrema.

Los ribosomas 70S de los diferentes microorganismos se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos y se disociaron en sus respectivas subunidades mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. La figura 4 muestra los perfiles de absorción a 260 nm de las subunidades ribosomales 30S y 50S de B. stearothermophilus(A), Alteromonas espejiana(C) y Halobacterium cutirubrum(E). Después de recolectar las subunidades 50S (zonas achuradas), estas se purificaron mediante una segunda gradiente de sacarosa como se muestra en la figura 4 B, D y F respectivamente. Esta segunda centrifugación permite eliminar por completo la posible contaminación de las subunidades 50S con subunidades 30S, ya que se colectaron solamente las fracciones correspondiente a las zonas achuradas de la partícula mayor (figura 4 B, D y F).

Sólo H. cutirubrum, mostró una leve diferencia en la sedimentación de las subunidades 30S y 50S, probablemente debido

Figura 4. Separación de subunidades ribosomales mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

Los ribosomas 70S (250 unidades de Absorbancia a 260 nm) se aplicaron en la superficie de cada gradiente. Las subunidades se disociaron como se indica en Materiales y Métodos. Las fracciones indicadas por las regiones achuradas (A, C, E) fueron mezcladas y las partículas ribosomales se recuperaron por centrifugación a  $23.000 \times g$  durante 16 horas. Estas partículas fueron sometidas nuevamente a condiciones disociantes y se aplicaron a una segunda gradiente lineal entre 15 y 30 % de sacarosa (B, D, F). Finalmente estas zonas achuradas fueron colectadas, concentradas por centrifugación y utilizadas para la extracción de proteínas ribosomales. Los ribosomas analizados fueron de B. stearothermophilus (A y B) ; de A. espejiana (C, D) y de H. cutirubrum (E , F) .



a que en este caso la gradiente contenfa 3 M KCl para impedir la degradación de estos ribosomas (76).

#### SEPARACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES 50S MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

En la figura 5 se muestra la migración electroforética de las proteínas ribosomales de las diferentes cepas bacterianas. En A, C y E podemos ver la separación electroforética de las proteínas y en B, D y F la representación diagramática de esta separación en la que se indica el sistema de numeración utilizado para individualizar cada una de las proteínas ribosomales estudiadas.

Las proteínas ribosomales del B. stearothermophilus 799 habfan sido caracterizadas previamente por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (18). En este estudio se utilizó B. stearothermophilus ATCC 7953 cuyas proteínas ribosomales dieron una separación electroforética idéntica a la del B. stearothermophilus 799, por lo cual en este caso se utilizó la misma nomenclatura.

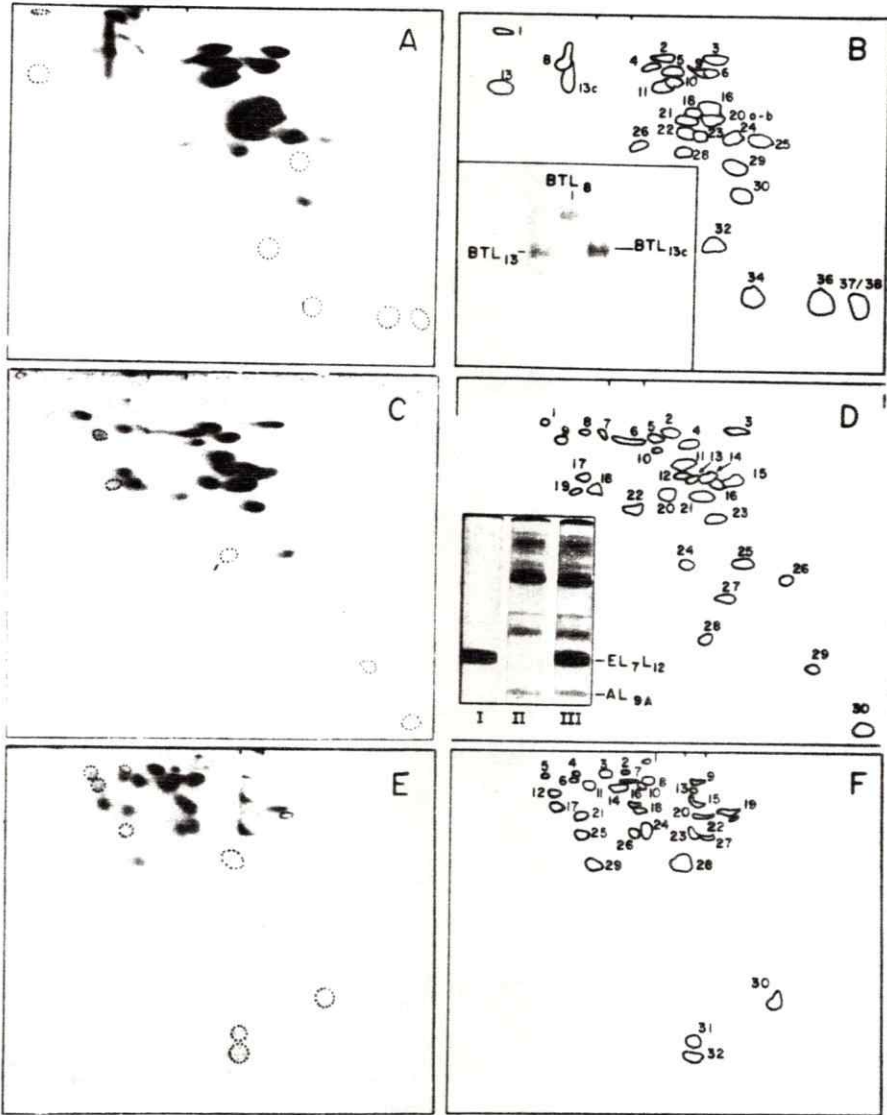
Cohlberg y Nomura (18) han demostrado que la proteína ribosomal L13 del B. stearothermophilus (BTL13) migra en dos posiciones después de una electroforesis bidimensional (BTL13 y BTL13c en figura 5 B). Ambas presentan la misma movilidad en la segunda dimensión y solo difieren en la migración electroforética de la primera dimensión.



Figura 5. Separación de las proteínas ribosomales 50S de diferentes microorganismos por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

En A, C y E, se muestra la separación electroforética de las proteínas. En B, D y F, se tiene la representación diagramática del sistema de numeración utilizado para individualizar las proteínas ribosomales.

En el recuadro del panel B se muestra la migración electroforética en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS (38), de las manchas correspondientes a las proteínas BTL13, BTL13c y BTL8 las que fueron cortadas y eluidas del gel que se muestra en el panel A. En el recuadro del panel D se muestra la migración electroforética en geles a pH 5 (41) de: (I) 9 µg de EL7L12, (II) 200 µg de proteínas ribosomales 70 S de A. espejiana y (III) una mezcla de I y II. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Proteínas de B. stearothermophilus (A, B). Proteínas de A. espejiana (C, D). Proteínas de H. cutirubrum (E, F).



Marquis y Fahnestock (46) demostraron que BTL13 forma un complejo con la proteína BTL8 el cual presenta una movilidad electroforética, en la primera dimensión de geles bidimensionales, que difiere de la de BTL13 libre. Sin embargo, en la segunda dimensión el complejo (BTL13/BTL8) se disocia dando lugar a BTL13c y BTL8 (ver figura 5 B, recuadro). Esto explica las dos posiciones posibles para la migración electroforética de BTL13 en geles bidimensionales.

En el recuadro de la figura 5 B se muestra que, al igual que en E. coli, cuando se extraen las manchas correspondientes a las proteínas BTL13 y BTL13c del gel bidimensional y se hacen migrar nuevamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % con SDS, ambas proteínas comigran indicando que poseen el mismo peso molecular. Estos resultados confirman que el complejo BTL13.BTL8 de B. stearothermophilus es equivalente al complejo EL7L12/L10 descrito previamente para E. coli (63).

Los ribosomas de A. espejiana no se habían caracterizado previamente por lo cual las proteínas ribosomales se separaron por electroforesis bidimensional y se numeraron como se muestra en la figura 5 C y D. El número de proteínas de la subunidad grande fue similar al encontrado para otros ribosomas bacterianos (24,58). Las proteínas ribosomales acídicas de A. espejiana equivalentes a EL7L12 de E. coli migraron fuera del gel en estas condiciones. Por lo tanto, ellas fueron específicamente analizadas separando el total de las proteínas ribosomales 70 S

mediante electroforesis en geles a pH 5 (42). En este tipo de geles, las proteínas más ácidas del ribosoma migran como aniones, mientras que el resto de las proteínas ribosomales se retrasan en la primera parte del gel o se salen de éste, migrando hacia el compartimiento del cátodo ( ver Materiales y Métodos). En el recuadro de la figura 5 D se muestra que la proteína ribosomal ácida de A. espejiana, AL9A, es levemente más ácida que la EL7L12 de E. coli.

Las proteínas ribosomales de H. cutirubrum habían sido caracterizadas anteriormente utilizando un sistema electroforético diferente (73). Para comparar los resultados de este trabajo con aquellos publicados previamente para otras especies (13,45), hemos utilizado el método estándar de Kaltschmidt y Wittman, excepto que en este caso se modificó alargando la zona donde migran las proteínas ácidas en el gel de primera dimensión (10 % acrilamida). La numeración utilizada para las proteínas ribosomales 50S de H. cutirubrum que se separaron en estas condiciones se muestra en la figura 5 F.

Es interesante destacar que la mayoría de las proteínas ribosomales del halofílico moderado A. espejiana son básicas como ocurre en la generalidad de los ribosomas. Sin embargo, el halofílico extremo H. cutirubrum presenta la mayoría de sus proteínas ribosomales extremadamente ácidas como ya se ha descrito (73).



## METILACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES 50S.

La metilación de las diferentes proteínas ribosomales se determinó por el método de Chang y colaboradores (13). Las células se crecieron en presencia de (1-<sup>14</sup>C)metionina y (metil-<sup>3</sup>H)metionina, incorporándose ambos isótopos a las proteínas. Se consideraron metiladas aquellas proteínas que presentaron una razón <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C mayor que la razón <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C del total de las proteínas sin fraccionar (4). Este método es muy sensible para proteínas con bajo contenido de metionina, como lo son las proteínas ribosomales, y como lo han demostrado Chang y Chang y otros autores (13,45).

En la Tabla II se muestra que en todas las especies estudiadas, la subunidad 50S presenta entre 5 y 7 proteínas metiladas. Estos resultados concuerdan con aquellos descritos previamente para otros microorganismos como, E. coli (13), B. subtilis (45) y B. megaterium (11).

Es importante hacer notar que en las condiciones de separación empleadas las proteínas metiladas del B. stearothermophilus, BTL20a y BTL20b migraron juntas como en (18). La proteína ribosomal BTL11 es la más metilada de todas y migra junto a BTL10, por lo cual es probable que posea una contaminación con BTL10. Las proteínas BTL13 (BTL13c) y BTL8 también son metiladas (ver figura 5).

En la figura 6 se muestra una comparación general de la metilación relativa y la movilidad electroforética de las proteínas ribosomales que se encontraron metiladas en las

TABLA II

Proteínas metiladas en la subunidad 50S de varios microorganismos

Organismo	Proteína	<sup>3</sup> H (cpm)	<sup>14</sup> C (cpm)	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C
<u>B. stearothermophilus.</u>	Total sin fraccionar	5.128	2.490	2,05
	BTL5	439	177	2,47
	BTL6	274	104	2,63
	BTL8	171	68	2,50
	BTL11	699	112	6,21
	BTL13 (BTL13c)	208	84	2,46
	BTL16	242	103	2,36
	BTL20ab	304	99	3,06
<u>A. espejiana</u>	Total sin fraccionar	45.611	5.432	8,40
	AL2	4.643	473	9,80
	AL5	2.299	195	11,78
	AL10	1.725	92	18,75
	AL12	2.577	250	10,30
	AL13	2.040	190	10,73
	AL14	2.041	191	10,60
	AL15	3.236	319	10,10
<u>H. cutirubrum</u>	Total sin fraccionar	4.167	1.654	2,51
	HL3	1.194	307	3,89
	HL8	170	46	3,69
	HL10	189	42	4,50
	HL11	362	98	3,76
	HL14	385	90	4,27

Los métodos utilizados para el crecimiento y marcación de las células, la purificación y separación de las proteínas ribosomales 50 S fueron descritos en Materiales y Métodos.

## TABLA II (Continuación)

Las manchas correspondientes a las proteínas individuales 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. En cada caso se indica la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  para el total de las proteínas sin fraccionar.

Para facilitar la comparación en esta Tabla sólo se incluyen las proteínas que se consideraron con un exceso de grupos metilo basado en la diferencia entre su cociente  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  y el valor respectivo para el total de las proteínas sin fraccionar (11,14,45). El resto de las proteínas de cada subunidad ribosomal indicada en la figura 5, presentaron un valor para la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  igual o menor que el valor respectivo para el total de proteínas sin fraccionar.

En cada caso se realizaron tres determinaciones en forma separada y los resultados fueron similares.

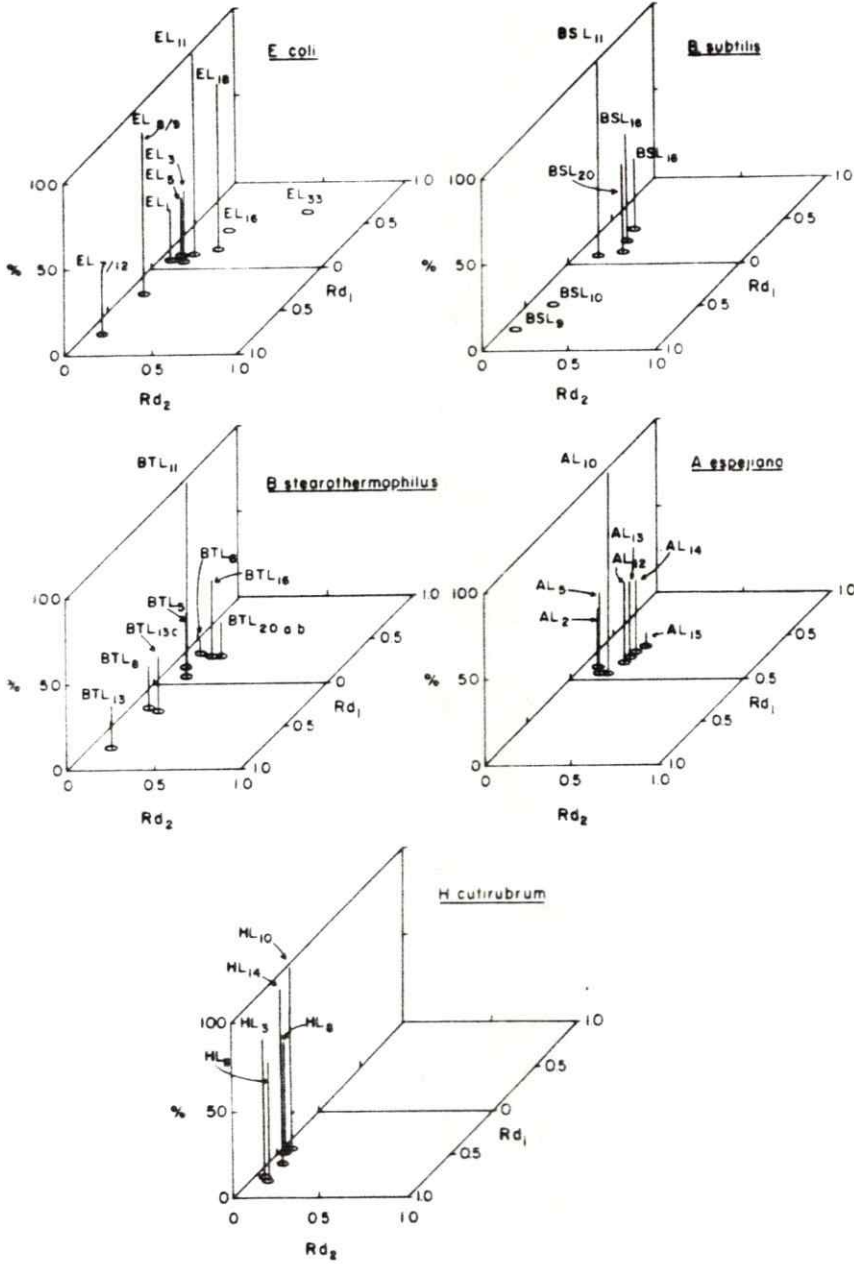
**Figura 6. Metilación relativa de las proteínas ribosomales 50S de diferentes especies bacterianas.**

Las proteínas ribosomales de cada especie indicada se separaron y se tiñeron como se describe en Materiales y Métodos. Para cada especie se obtuvo un patrón electroforético bidimensional como se observa en la figura 5. Sobre cada patrón electroforético así obtenido, se dibujaron mediante círculos solamente las manchas correspondientes a las proteínas metiladas de la tabla II y aquellas indicadas por Chang y Chang para E. coli (14) y por nuestro laboratorio para B. subtilis (45) como se observa en la base de cada proyección. Las líneas centrales en estas bases representan el origen donde fueron aplicadas las proteínas en la primera dimensión e indican las separaciones entre las proteínas ribosomales acídicas y básicas en cada placa. 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. Las líneas verticales que emergen de cada mancha representan la metilación relativa y se obtuvieron dando un valor de 100 % a la proteína que presentó un delta ( $\Delta$ )  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  más alto (delta ( $\Delta$ ) es la diferencia entre la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de la proteína y la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  del total de proteínas sin fraccionar). El resto de los valores se calcularon en forma proporcional. Para la proteína EL33 de E. coli no se calculó la metilación relativa debido a que esta proteína no contiene



Figura 6 ( continuación ) .

metionina por lo cual daría una razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  desproporcionadamente alta (14). Una situación similar se observó para las proteínas BSL9 y BSL10 de B. subtilis (45). El valor de EL16 no se calculó debido a que su metilación se determinó por un método diferente (17).



diferentes especies bacterianas estudiadas en este trabajo y otras descritas anteriormente (14,45).

Se puede apreciar que excepto para el H. cutirubrum, la mayoría de las proteínas ribosomales metiladas en las diferentes especies bacterianas son de carácter básico. Además el patrón de movilidad electroforética de las proteínas modificadas en cada especie estudiada, exceptuando el H. cutirubrum, muestra cierta similitud, sugiriendo algún grado de relación estructural entre las proteínas metiladas de diferentes especies.

En todas las partículas ribosomales 50S estudiadas se encontró una proteína que tenía una movilidad electroforética similar en todas las especies (excepto para H. cutirubrum) y que correspondía a la proteína más altamente metilada en cada caso. Esta proteína corresponde a la EL11 de E. coli (14), BSL11 de B. subtilis (45), BTL11 de B. stearothermophilus y AL10 de A. espejiana.

Las proteínas ribosomales ácidas EL7L12 de E. coli son metiladas (14) y altamente conservadas en la naturaleza (47,48,78). Estas proteínas tienen sus equivalentes que también son metiladas en algunas de las especies estudiadas. Así BSL9 de B. subtilis y BTL13 del B. stearothermophilus migran en una posición similar a EL7L12 y son metiladas (figura 6). Es importante destacar que todas estas proteínas ácidas son estructural y funcionalmente homólogas (4). Por otra parte, A.

espejiana aparentemente no contiene las proteínas acídicas metiladas, pero otros halofílicos moderados si las poseen (48).

Estos resultados sugieren que en general, en las eubacterias existe un buen grado de conservación del patrón de metilación de las proteínas ribosomales.

#### ANÁLISIS DE LOS AMINOÁCIDOS METILADOS EN ALGUNAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES.

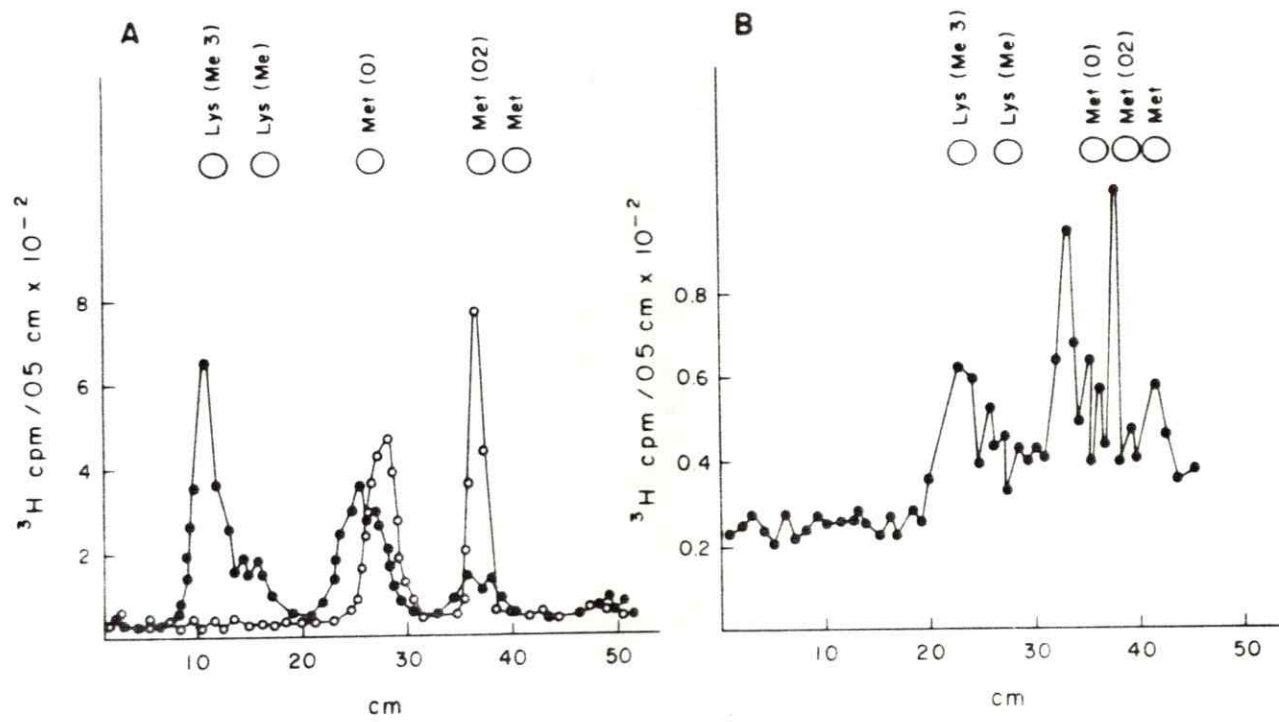
Para determinar si las proteínas metiladas homólogas contienen el mismo tipo de aminoácidos metilados se analizaron los aminoácidos de las proteínas BSL11 y BTL11 que corresponden a las proteínas más altamente metiladas de B. subtilis y B. stearothermophilus respectivamente. Ambas proteínas son estructural y funcionalmente homólogas a EL11, la cual contiene N- $\epsilon$ -trimetilisina y un aminoácido neutro metilado que corresponde al amino terminal y que ha sido identificado como trimetilalanina (40).

Los aminoácidos metilados presentes en BSL11 y BTL11 se analizaron a partir de células crecidas en presencia de (metil- $^3\text{H}$ )metionina. Luego de obtener los ribosomas y separar sus proteínas por electroforesis bidimensional, tanto BSL11 como BTL11 se hidrolizaron como se describe en Materiales y Métodos y los productos se separaron por cromatografía descendente en papel. Como se muestra en la figura 7A, en el caso de BSL11 más del 60 % de la radiactividad comigró con trimetilisina. El resto de la radiactividad correspondió a productos de



Figura 7. Análisis de los aminoácidos metilados presentes en la proteína L11 de bacterias Gram positivas por cromatografía descendente en papel

100  $\mu$ l de cada hidrolizado de proteína (descrito en Materiales y Métodos) se aplicó a un papel filtro Whatman N<sup>o</sup>1 junto con 10  $\mu$ g de cada uno de los siguientes aminoácidos estándares: Lis, Lis(Me), Lis(Me<sub>3</sub>), Met, Met(O), Met(O<sub>2</sub>). El solvente utilizado fué piridina-acetona-NH<sub>4</sub>OH [50:30:25 (v/v/v)]. Las condiciones para la cromatografía, detección de las manchas y determinación de la radiactividad se describió en Materiales y Métodos. (A), hidrolizado de BSL11 de B. subtilis ( -●-●- ) ; hidrolizado de BSL15 de B. subtilis, una proteína no metilada ( -O-O- ). (B) hidrolizado de BTL11 de B. stearothermophilus ( -●-●- ).



degradación de la metionina generados durante la hidrólisis. Como control se utilizó una proteína no metilada, de acuerdo a su razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  (45), como la BSL15. Esta proteína mostró radiactividad solamente en la metionina y sus productos de degradación (Fig. 7 A).

Por otra parte, la figura 7 B muestra el análisis de los aminoácidos metilados en BTL11. En general hubo una menor incorporación de radiactividad en las células del E. steanothermophilus probablemente debido a una mayor degradación de la metionina a  $62^\circ\text{C}$ , temperatura de crecimiento de esta bacteria. Aunque en este caso el material radiactivo era escaso, fue posible determinar que el principal aminoácido modificado correspondía a trimetilisina.

Para determinar la presencia de aminoácidos neutros tales como la trimetilalanina [ $\text{Ala}(\text{Me}_3)$ ] que esta presente en la E111, se empleó electroforesis en papel. En la figura 8 se observa que la hidrólisis de BSL11 origina un producto que comigra con  $(^{14}\text{C})\text{-Ala}(\text{Me}_3)$  el cual no se encuentra en una proteína no metilada como BSL15 (figura 8).

Estos resultados indican que en proteínas ribosomales descritas como estructural y funcionalmente homólogas se encuentra el mismo tipo de aminoácidos metilados.

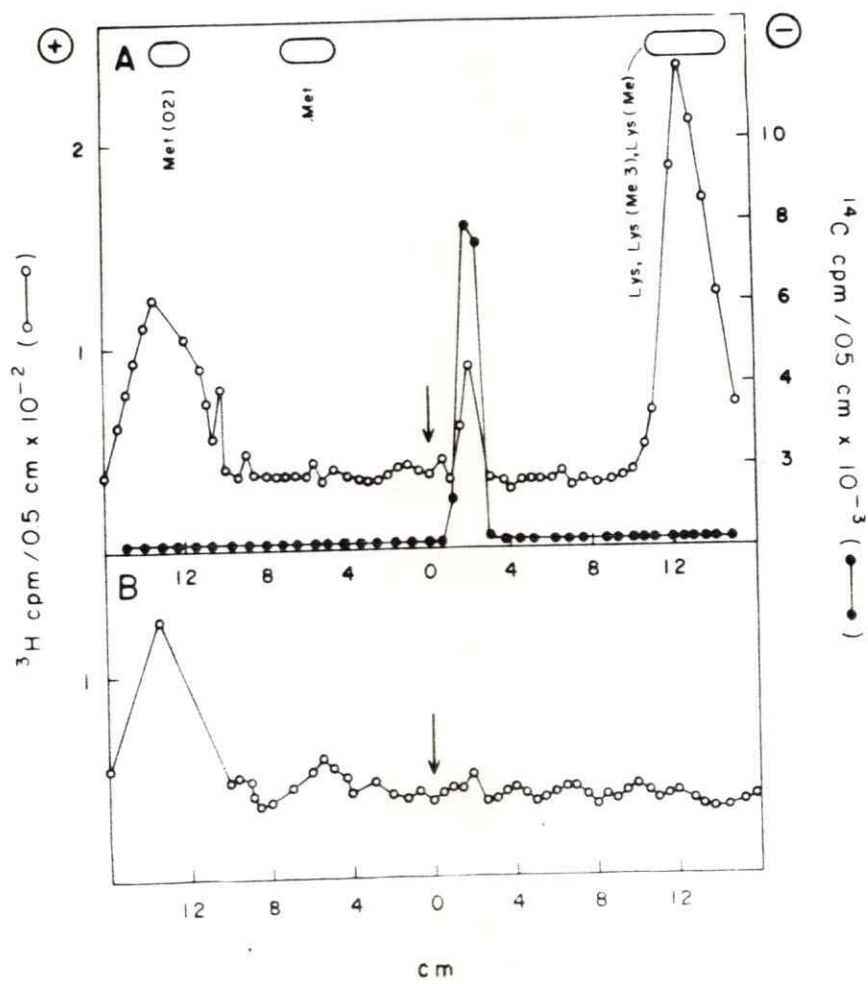
#### METILACION IN VITRO DEL COMPLEJO $(\text{EL7L12})_4$ .L10 de E. coli

La proteína L10 de E. coli no habfa sido descrita como una proteína metilada. Sin embargo, fue susceptible de metilarse en

Figura 8. Análisis de los aminoácidos neutros metilados presentes en BSL11 de B. subtilis por electroforesis en papel.

El análisis se hizo por electroforesis en papel bajo condiciones en las cuales todos los aminoácidos básicos migran juntos y los aminoácidos neutros migran separados del resto. 100  $\mu$ l del hidrolizado de proteínas utilizado en la figura 7 A se aplicó a un papel filtro Whatman 3 MM junto con 10  $\mu$ g de cada uno de los siguientes aminoácidos estándares: Met, Met(O<sub>2</sub>), Lis, Lis(Me), Lis(Me<sub>3</sub>). Además se aplicaron 10.000 cpm de (<sup>14</sup>C) Ala(Me<sub>3</sub>) en el mismo papel, pero separadamente. La electroforesis se realizó en tampón borato de sodio 0,05 M pH 9,3 durante 120 minutos a 2000 V. La flecha indica el punto donde se aplicó la muestra a separar. Otras condiciones están descritas en Materiales y Métodos. (A) Hidrolizado de BSL11 (O-O-O); (<sup>14</sup>C)Ala(Me<sub>3</sub>) (●-●). (B) Hidrolizado de BSL15 (O-O).





un sistema in vitro utilizando ribosomas submetilados obtenidos de células de E. coli crecidas en etionina. Estos ribosomas se incubaron en presencia de S-adenosil-(metil- $^3\text{H}$ )metionina y un extracto de células de E. coli (S-150) como se describe en Materiales y Métodos.

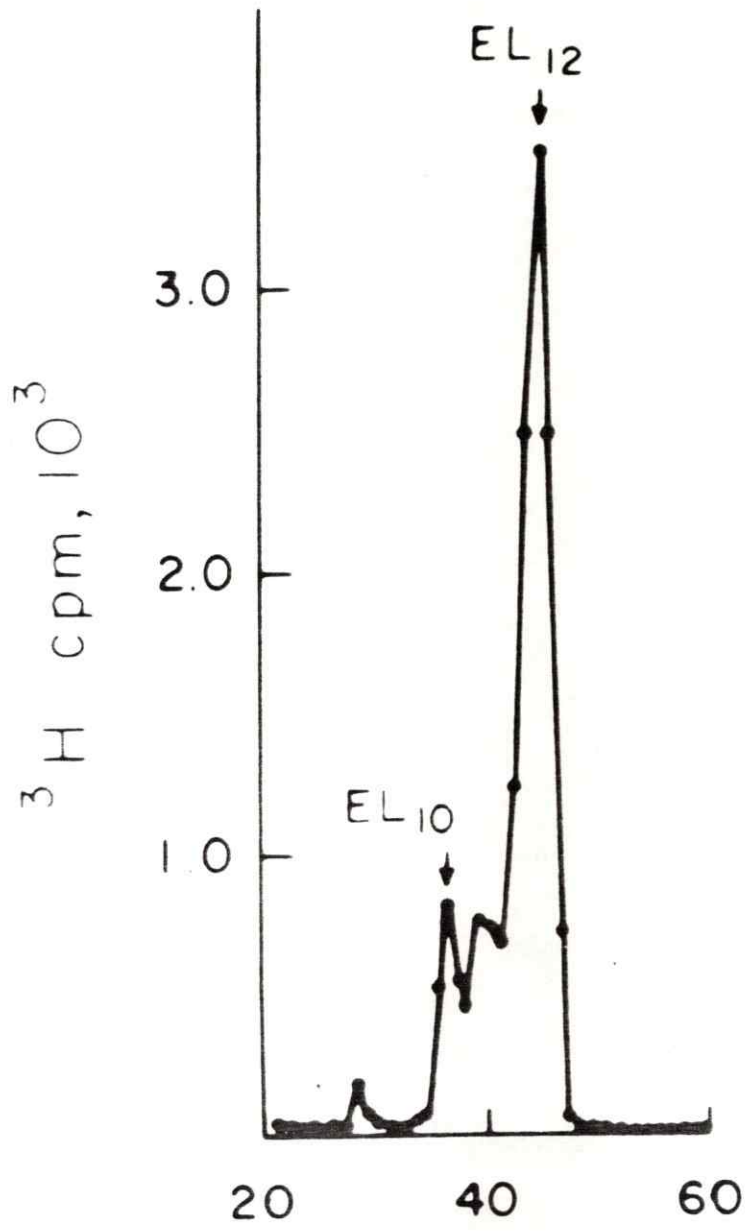
Después de inmunoprecipitar las proteínas del complejo con anti L12, los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % con SDS (ver Materiales y Métodos).

En la figura 9 se muestra que con el sistema empleado aparentemente L10 y L12 son susceptibles de metilarse. Estos resultados fueron confirmados utilizando un sistema dependiente de DNA para medir la síntesis y metilación de estas proteínas in vitro (4). Cuando se compara el grado de metilación en ambos sistemas (4), L10 presenta un menor grado de metilación en el sistema in vitro de ribosomas etionina. Este menor grado de incorporación de grupos metilo en L10 se podría explicar por su ubicación dentro del ribosoma ya que en partículas 70S esta proteína está menos expuesta que la proteína L12 (51). En cambio, en el sistema dependiente de DNA, las proteínas se sintetizan y metilan estando fuera del ribosoma (32).

Estos resultados muestran que al igual que en el B. stearothermophilus, las proteínas que forman parte del complejo pentamérico de E. coli son metiladas. Esto es interesante ya que este complejo forma una unidad estructural y funcional

Figura 9. Electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos metilados in vitro, inmunoprecipitados con suero anti EL12.

La mezcla de reacción que contenía 8,5 unidades de  $A_{260}$  nm de ribosomas etionina, 135 pmoles de S-adenosil-L-(metil- $^3H$ ) metionina (74 Ci/mmol) y 50 ug de proteínas del S-150, fue incubada e inmunoprecipitada con anti EL12 como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas solubilizadas se analizaron por electroforesis en geles SDS con 15 % de acrilamida (38). Las flechas indican la posición de EL10 y EL12 en estos geles. La migración electroforética fue hacia la derecha de la figura.



semi-autónoma en el ribosoma y a la vez es esencial para la síntesis proteica.

Este complejo por lo tanto, aparece como un buen sistema para estudiar la posible relación entre la metilación y función, ya que una variación en el grado de metilación de los componentes del complejo podría afectar al ribosoma modificando su actividad.

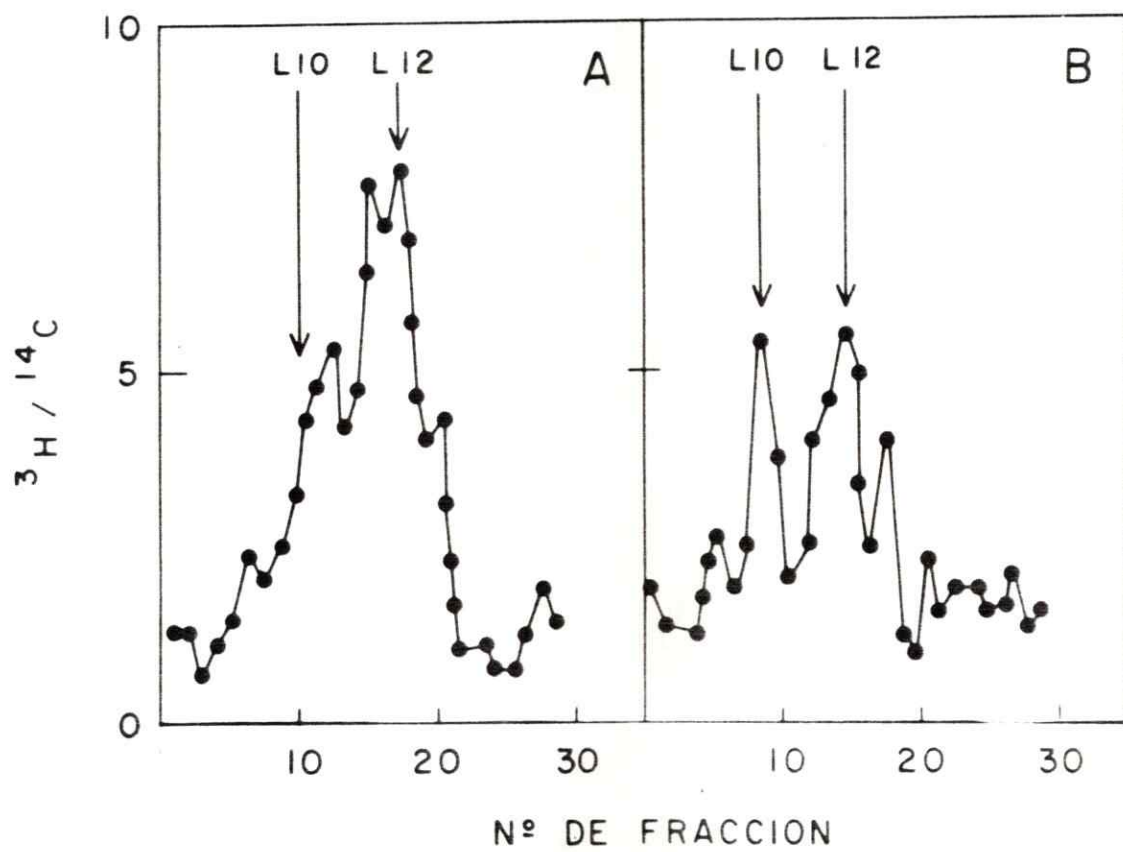
#### SINTESIS DE POLIFENILALANINA CON RIBOSOMAS DE E. COLI CRECIDA A 37°C y 27°C.

Los estudios realizados por Chang (16) han demostrado que las proteínas ribosomales acídicas L7L12 provenientes de E. coli crecidas a 27°C presentan un aumento en el grado de metilación con respecto a las proteínas acídicas obtenidas de ribosomas de E. coli crecidas a 37°C. Para confirmar estos estudios se marcaron células de E. coli a 37°C y a 27°C como se describe en Materiales y Métodos y se analizó en ambos tipos de células la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de las proteínas L7L12 unidas a ribosomas. La figura 10 muestra que el grado de metilación de L7L12 es aparentemente mayor a 27°C (A) que a 37°C (B) medido por sus valores de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ , y por lo tanto nuestros resultados confirman los de Chang que fueron obtenidos por otro método (41). Como estas proteínas son esenciales para la función ribosomal y con el objeto de establecer si existe una relación entre la variación del grado de metilación y la función que cumplen estas proteínas en la



Figura 10. Análisis del grado de metilación de L7L12 provenientes de ribosomas obtenidos de células de E. coli crecidas a diferentes temperaturas, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se marcaron células de E. coli en presencia de ( $^3\text{H}$ -metil)metionina y ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )metionina y se crecieron estas células a  $27^\circ\text{C}$  y a  $37^\circ\text{C}$ . Luego de aislar los ribosomas 70S, las proteínas ácidas del complejo pentamérico se inmunoprecipitaron con anti L12 como se describe en Materiales y Métodos. Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % con SDS. Se determinaron las razones  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de cada tajada como se describe en Materiales y Métodos. (A) L7L12 inmunoprecipitada de ribosomas de E. coli crecida a  $27^\circ\text{C}$ . (B) L7L12 inmunoprecipitada de ribosomas de E. coli crecida a  $37^\circ\text{C}$  (mayores detalles se describen en Materiales y Métodos).



actividad ribosomal, se analizó la capacidad que tienen estos ribosomas para sintetizar polifenilalanina.

Como se observa en la figura 11 los ribosomas provenientes de células crecidas a 27°C presentan una actividad menor que la de los ribosomas provenientes de células crecidas a 37°C cuando se miden sus capacidades para sintetizar polifenilalanina utilizando como fuente de enzimas extractos (S-150) provenientes de las respectivas células. Esta menor actividad se hace mucho más obvia a partir de una concentración de 150 µg de proteínas del S-150 agregados.

Para investigar si la menor actividad ribosomal que presentan los ribosomas de células crecidas a 27°C se debe a los ribosomas o al extracto utilizado como fuente de enzimas, se midió la capacidad de los ribosomas de células crecidas a 27°C para sintetizar polifenilalanina pero en presencia de extracto de células crecidas a 37°C y vice-versa.

La figura 12 muestra que la actividad de los ribosomas provenientes de células de E. coli crecidas a 27°C es similar a la actividad que presentan los ribosomas de células crecidas a 37°C cuando se utiliza como fuente de enzimas un S-150 proveniente de células crecidas a 37°C (figura 12 A). Sin embargo, cuando se utiliza como fuente de enzimas un S-150 de células crecidas a 27°C, a determinadas concentraciones de proteínas (150 µg), la actividad de ambos tipos de ribosomas disminuye considerablemente con respecto a la actividad que

Figura 11. Síntesis de polifenilalanina con ribosomas de E. coli crecida a 37°C y 27°C.

La mezcla de reacción de 95 ul contenía 140 ug de ribosomas y cantidades crecientes de los respectivos extractos celulares (S-150). Otros componentes de la mezcla están indicados en Materiales y Métodos. -●-●-, Ribosomas y extractos de células de E. coli crecida a 37°C. -O-O-, Ribosomas y extractos de células de E. coli crecida a 27°C.

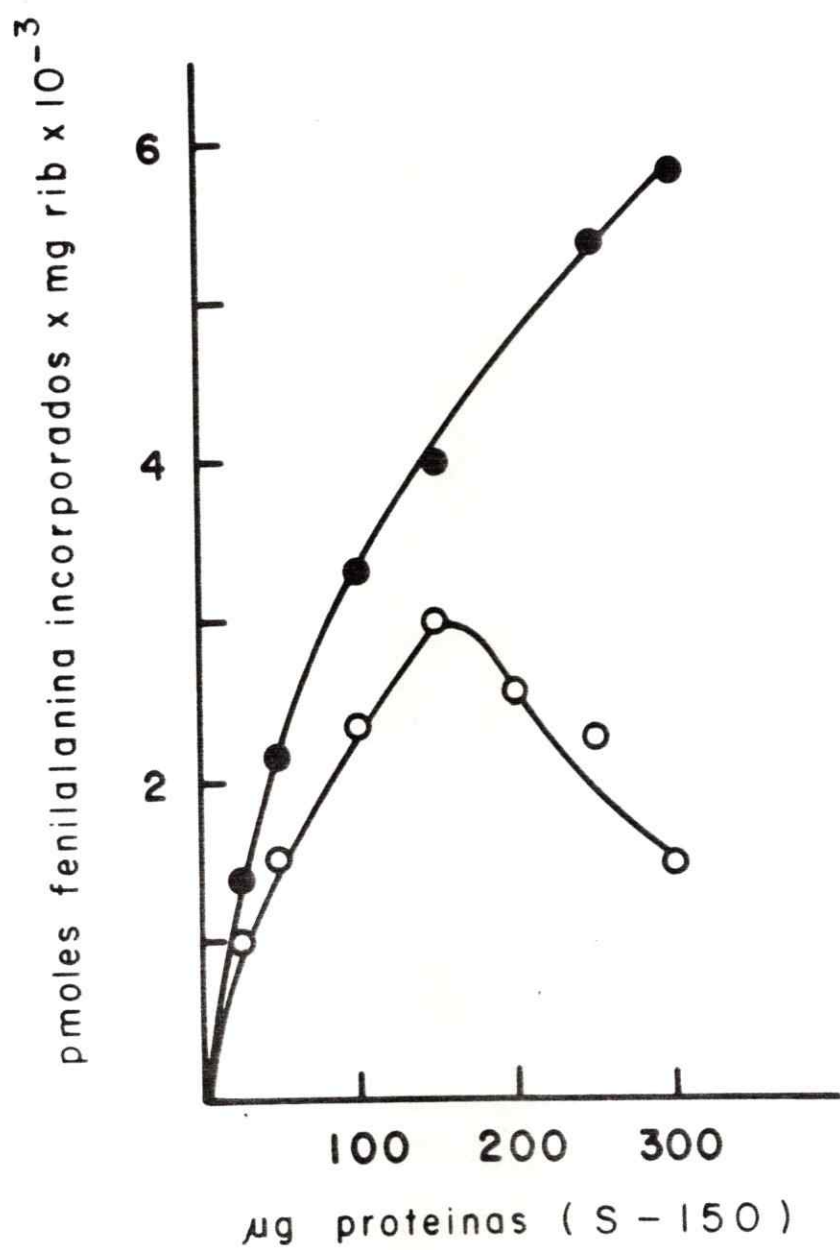
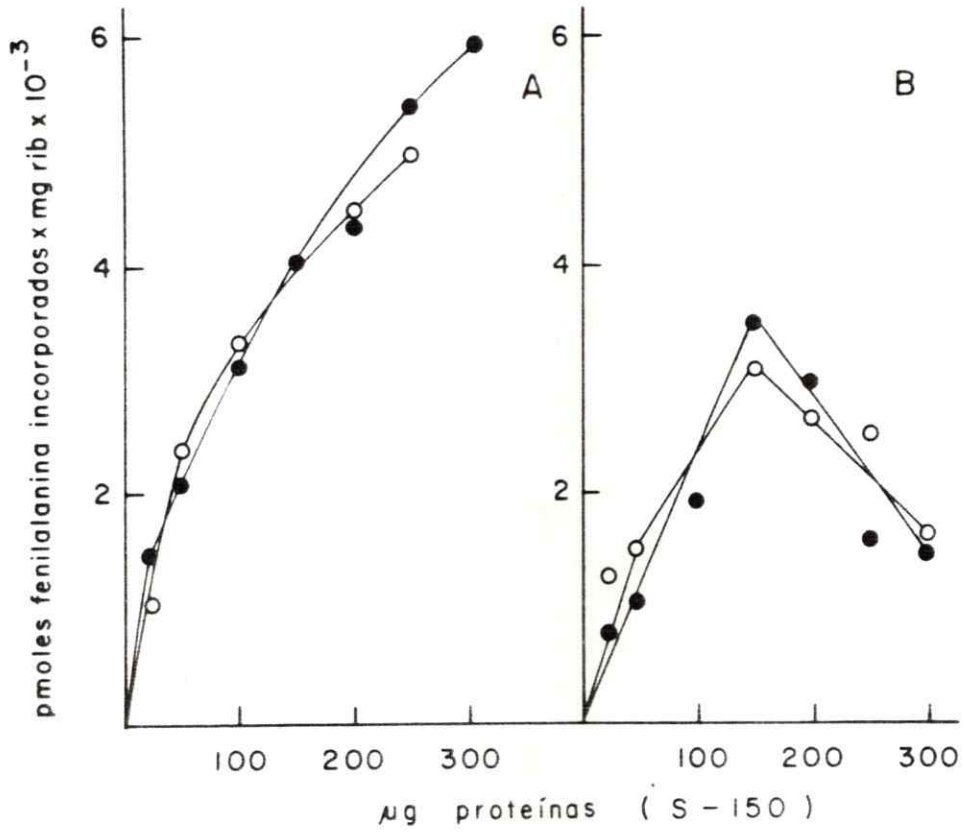




Figura 12. Efecto del sobrenadante post-ribosomal (S-150) obtenido a partir de células de E. coli crecidas a diferentes temperaturas sobre la capacidad de sus respectivos ribosomas para la síntesis de polifenilalanina.

Las condiciones del ensayo fueron iguales a las descritas en la leyenda de la figura 10 . (A) Efecto del sobrenadante post-ribosomal obtenido de células crecidas a 37°C. (B) Efecto del sobrenadante post-ribosomal obtenido de células crecidas a 27°C. -●-●-, Ribosomas de E. coli crecida a 37°C. -O-O-, Ribosomas de E. coli crecida a 27°C.



presentan con un S-150 obtenido de células crecidas a 37°C (figura 12 B).

Estos resultados indican que aparentemente no existen diferencias en la actividad de ribosomas de células crecidas a 37°C y a 27°C cuando se mide la capacidad de ellos para sintetizar polifenilalanina utilizando una misma fuente de enzimas. Esto nos indica que en estas condiciones, el aumento del grado de metilación de las proteínas L7L12 no afectaría la actividad de los ribosomas para medir la síntesis de polifenilalanina.

Sin embargo, es evidente que el sobrenadante post-ribosomal de células de E. coli crecidas a 27°C, a concentraciones de proteínas superiores a 150 µg, produce una inhibición en la capacidad de síntesis de polifenilalanina de ambos tipos de ribosomas (figura 12 B).

Será de interés investigar en futuros trabajos si el efecto inhibitorio del extracto post-ribosomal de células de E. coli crecidas a 27°C sobre la síntesis de polifenilalanina, se debe a la presencia de proteasas o a la existencia de algún factor que pudiera inhibir la síntesis proteica.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo indican claramente que la metilación de las proteínas ribosomales es un fenómeno general y conservado en las eubacterias. Esto nos indica un papel importante para estas modificaciones, ya que estas metilaciones podrían favorecer un funcionamiento óptimo del ribosoma en la biosíntesis de proteínas, o bien podrían jugar un papel importante para el ensamblaje de la partícula ribosomal como se ha sugerido anteriormente (2).

En la Tabla III, se resumen los resultados obtenidos en este y otros trabajos. Se observa que proteínas que son estructural y funcionalmente homólogas en organismos Gram (+) y/o Gram (-), son metiladas. Por mucho tiempo se postuló que deberían existir diferencias estructurales entre la maquinaria traduccional del género Bacillus y de E. coli lo que se manifestaba por la incapacidad de los mRNA de E. coli para expresarse en Bacillus subtilis tanto in vivo como in vitro (55,71,72,). Sin embargo esta barrera era menos estricta en el sentido contrario, ya que los ribosomas de E. coli podían traducir mRNA de Gram (+) y Gram (-).

Los resultados obtenidos en este trabajo y los publicados con anterioridad por nuestro laboratorio y otro (45,49) indican que las diferencias en la maquinaria traduccional de ambos tipos de bacterias no están a nivel de la metilación de sus proteínas ribosomales ya que en general para las eubacterias

TABLA III

Proteínas ribosomales 50S metiladas, descritas como estructural y funcionalmente homólogas en bacterias.

<u>E. coli</u> <sup>a</sup>	<u>B. stearo- thermophilus</u> <sup>b</sup>	<u>B. subtilis</u> <sup>c</sup>	<u>B. mega- terium</u> <sup>d</sup>	<u>NRCC</u> <sup>e</sup>
EL3	BTL6			
EL5	BTL5/9 <sup>f</sup>			
EL7L12	BTL13	BSL9		HXA
EL10	BTL8			
EL11	BTL11	BSL11	BML11	
EL16	BTL20 <sup>g</sup>			

<sup>a</sup> Proteínas metiladas descritas por Chang y Chang (14) excepto para EL10. Se muestran solamente aquellas proteínas metiladas que han sido consideradas homólogas a las proteínas que se indican del B. stearothermophilus, por varios criterios (6,22).

<sup>b</sup> Datos tomados de Amaro y Jerez (4).

<sup>c</sup> Resultados de Mardones y col (45).

<sup>d</sup> Resultados de Cannon y Cundliffe (11)

<sup>e</sup> HXA es la proteína equivalente a EL7L12 de un halofílico moderado (NRCC 11227) descrito por Matheson y col. (48).

<sup>f</sup> Se cree que BTL5 y BTL9 son dos formas de la misma proteína (6,22).

<sup>g</sup> Esta proteína fué tomada junto con BTL20a de los geles bidimensionales y por lo tanto se consideró metilada en forma tentativa basado en su homología a EL16 (6,22).



sean éstas Gram (+) o Gram (-), la metilación es altamente conservada.

Auron y Fahnestock (6) han establecido varias homologías estructurales y funcionales entre las proteínas ribosomales de E. coli y B. stearothermophilus. Empleando la técnica de la reconstitución de ribosomas activos con la omisión de una sola proteína ribosomal, han agrupado a las proteínas ribosomales del B. stearothermophilus en 4 categorías funcionales: I, aquellas necesarias para la actividad peptidil transferasa; II, aquellas necesarias tanto para la síntesis de polifenilalanina como para la actividad peptidil transferasa; III, aquellas proteínas que son importantes sólo para la síntesis de polifenilalanina pero no para la actividad peptidil transferasa y IV, aquellas que no son esenciales para la síntesis de proteínas.

De las 7 proteínas de B. stearothermophilus esenciales para la actividad peptidil transferasa, tres de ellas son metiladas y corresponden a BTL5, BTL6 y BTL20b. Como se muestra en la Tabla III, sus homólogas metiladas en E. coli corresponden a EL5, EL3 y EL16 respectivamente. De 4 proteínas que se requieren para la síntesis de polifenilalanina tres son metiladas y corresponden a BTL8, BTL11 y BTL13 y sus homólogas en E. coli corresponden a EL10, EL11 y EL7L12 respectivamente (ver Tabla III).

Todos estos antecedentes demuestran que la metilación de las proteínas ribosomales ocurre casi exclusivamente en

proteínas con una activa participación en la síntesis proteica.

En E. coli, los genes estructurales de varias de las proteínas metiladas y del factor de elongación EF-Tu, el cual también es metilado (5,75) están organizados en operones que forman paquetes en la región rif a los 88 minutos en el cromosoma de E. coli (58). Las 4 proteínas codificadas por estos operones son: EL1, EL11, EL10 y EL7L12. Curiosamente, las proteínas de B. stearothermophilus homólogas de EL11, EL10 y EL7L12 en B. stearothermophilus, también son metiladas (4).

Las proteínas acídicas equivalentes a EL7L12 de E. coli son altamente conservadas en las eubacterias. Los datos de secuencia aminoacídica muestran una extensa homología en el N-terminal de estas proteínas encontrándose a través de la molécula completa un 65 % de homología entre E. coli y el organismo marino NRCC 11227, un 57 % entre NRCC 11227 y B. subtilis y un 54 % entre E. coli y B. subtilis (48). El grado de homología que presentan estas proteínas favorecen la existencia de una metilación conservada en eubacterias ya que al parecer las enzimas metilantes reconocen la secuencia aminoacídica cercana al sitio de metilación (61). EL7L12 de E. coli y su equivalente en el halófilo moderado NRCC 11227 contienen  $\epsilon$ -N-monometilisina en la posición 81 (48) la cual está localizada dentro de una región de 9 aminoácidos (Treo-Gli-Leu-Gli-Leu-Lis<sub>81</sub>-Glu-Ala-Lis). Esta es una secuencia

de aminoácidos altamente conservada en varias especies bacterianas y en cloroplastos (7).

Las proteínas EL7L12 de E.coli son las únicas que se encuentran en 4 copias por ribosoma y junto con la proteína EL10 forman un complejo pentamérico constituido por dos dímeros de L7L12 y un monómero de L10. Este complejo es estable y constituye un dominio estructural semiautónomo de alguna forma independiente del cuerpo de la subunidad 50S del ribosoma y participa en todas las reacciones de hidrólisis de GTP dependiente de los factores de la síntesis proteica en el proceso de traducción.

Este complejo  $(EL7L12)_4L10$  se une a la región 5' del RNA de 23S por medio de la proteína EL10 y esta unión es estimulada por la proteína EL11 (20).

La proteína EL10 no había sido descrita como una proteína metilada. Los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 9) muestran que aparentemente, todas las proteínas que forman parte del complejo pentamérico en E. coli son proteínas metiladas.

Un tipo similar de estructura existe en el E. stearothermophilus en el cual participan las proteínas BTL13 y BTL8. En este complejo BTL13 se encuentra en 4 copias por ribosoma y forma una protuberancia que se extiende desde el cuerpo de la subunidad 50S y se une a ella mediante la proteína BTL8 (46).

Como se aprecia en las tablas II y III, todas las proteínas que forman parte de este complejo son metiladas tanto en E. coli

como en el B. stearothermophilus. El hecho que la metilación de estas proteínas sea conservada podría ser de importancia, ya que este complejo como se ha dicho, forma una unidad estructural y funcional que es esencial para la actividad ribosomal. Sin embargo ha sido difícil establecer con claridad el papel que cumple la metilación de estas proteínas.

Chang (16), demostró que los ribosomas de células de E. coli crecidas a 27°C presentan un aumento de la metilación de las proteínas L7L12 y sugirió que esta variación en el grado de metilación de las proteínas ribosomales acídicas podría constituir un mecanismo de adaptación de las células para funcionar a bajas temperaturas.

Al respecto, algunos antecedentes indican que al parecer existiría en general, un aumento de la modificación post-traducciona de las proteínas ribosomales cuando las células crecen lentamente. Se ha descrito que existe un aumento en la modificación post-traducciona de proteínas ribosomales cuando las células llegan a la fase estacionaria de crecimiento (64). Ramagopal y Subramanian encontraron que el contenido de EL7 (EL12 acetilada) en el ribosoma se eleva grandemente cerca del crecimiento exponencial, hasta alcanzar un máximo en la fase estacionaria, lo que podría significar un tipo de adaptación de la célula hacia la fase estacionaria. En Tetrahymena pyriformes se ha descrito un incremento notable de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 cuando las células que están en



crecimiento exponencial son transferidas a un medio no nutriente (37).

En este trabajo, hemos confirmado que las proteínas L7L12 de células de E. coli crecidas a 27°C son más metiladas que las proteínas ribosomales L7L12 de células crecidas a 37°C, por el aumento de la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  (figura 10 A,B).

Nuestros resultados muestran además, que la actividad de los ribosomas de células crecidas a 27°C es menor que la de los ribosomas de células de E. coli crecidas a 37°C cuando se mide la capacidad de ellos para sintetizar polifenilalanina con factores provenientes del sobrenadante post-ribosomal de las respectivas células (figura 11). Sin embargo, al parecer el aumento de la metilación de las proteínas acídicas de ribosomas de células crecidas a 27°C no estaría relacionado con la disminución de la actividad ribosomal, ya que estos ribosomas presentan igual actividad que los de células crecidas a 37°C cuando se mide la capacidad de síntesis de polifenilalanina con una misma fuente de enzimas (figura 12).

No obstante, no es posible descartar totalmente una relación entre la metilación y la función que cumplen estas proteínas en la actividad ribosomal. Se sabe que las proteínas acídicas L7L12 participan en la iniciación, elongación y término de la síntesis proteica (50,51). También se ha sugerido que estas proteínas están relacionadas con la fidelidad del proceso de traducción (35). Nuestro sistema artificial de síntesis proteica que utiliza



como mensajero ácido poliuridílico (poliU), impide establecer con seguridad si la variación en el grado de metilación de las proteínas L7L12 tiene algún efecto primario en algunas de las etapas de la síntesis proteica (iniciación, terminación) o en la fidelidad del proceso de traducción en un sistema natural.

Será de interés estudiar, en futuros trabajos, el posible efecto de la variación del grado de metilación de estas proteínas en un proceso natural de traducción, utilizando un sistema dependiente de DNA (32) y ribosomas de E. coli crecida a 27°C y a 37°C.

Los resultados de esta tesis muestran además, que el extracto post-ribosomal de células de E. coli crecidas a 27°C produce una disminución de la capacidad de síntesis de polifenilalanina por ribosomas de células crecidas a 37°C y a 27°C, con respecto a la actividad que presentan estos ribosomas en presencia de un extracto post-ribosomal de células de E. coli crecidas a 37°C (figura 12). Esta disminución en la actividad ribosomal podría deberse simplemente a la presencia de proteasas. Otra explicación más interesante, podría ser la existencia de algún factor presente en el S-150 que inhiba el proceso de traducción.

Al respecto, es interesante considerar que J. Monnissey., H. Weissbach y N. Brot (53) encontraron que en el líquido sobrenadante post-ribosomal de 200.000 x g de células de E. coli crecidas a 27°C, existen cantidades considerables de proteínas muy similares a L7L12, las cuales poseen el mismo peso

molecular, igual composición aminoacídica, e idénticas propiedades inmunológicas. Sin embargo, estas proteínas no poseen actividad biológica ya que son incapaces de restaurar la actividad de ribosomas que están libres de L7L12 por extracción con etanol-amonio (26). Estos autores ha sugerido que estas proteínas podrían acomplejarse con otras proteínas presentes en el sobrenadante post-ribosomal impidiendo así su unión a los ribosomas. Otra alternativa planteada por Morrissey y colaboradores (54) sugiere que una modificación post-traducciona l de las proteínas L7L12 podría explicar la sutil diferencia entre las proteínas acídicas unidas a ribosomas y las que se encuentran en el sobrenadante post-ribosomal.

Considerando que el S-150 de células de E. coli crecidas a 27°C produce una inhibición de la síntesis de polifenilalanina, será interesante aislar las proteínas acídicas tipo L7L12 de este S-150 y analizar el posible efecto que estas proteínas pudieran ejercer cuando se adicionan a un sistema de síntesis de polifenilalanina con ribosomas y extractos de células de E. coli crecidas a 37°C.

Nuestros resultados y aquellos publicados con anterioridad (11,14, 45) muestran que todas las proteínas homólogas a EL11 son las proteínas más altamente metiladas en sus respectivos ribosomas. Así tenemos que en B. subtilis (45), B. stearothermophilus (este trabajo) y B. megaterium (11) existe una

proteína funcional, estructural, e inmunológicamente equivalente a EL11 que es altamente metilada.

En nuestro laboratorio (4), encontramos que ribosomas de A. espejiana y ribosomas de cloroplastos de E. gracilis (Sanhueza y Jerez resultados no publicados) poseen una proteína que migra en una posición similar a la de EL11 después de una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, y corresponde a la proteína más metilada del ribosoma. También es interesante destacar que la metilación no sólo es conservada a nivel de las proteínas que son homólogas sino que también existiría una conservación a nivel de los aminoácidos que son metilados. BSL11 y EL11 presentan trimetilalanina en el extremo N-terminal; BSL11, BTL11 y EL11 presentan residuos de lisina metilados como trimetil y monometil lisina.

En E. coli, la proteína EL11 es una proteína que se une específicamente al RNA 23 S y esta próxima a las proteínas L7L12 y L10, constituyendo un importante centro funcional en el ribosoma(9,51). Mutantes de E. coli con EL11 alterada presentan un control relajado de la síntesis de RNA (62) y sus ribosomas son incapaces de sintetizar ppGpp in vitro. La proteína EL11 posee 9 grupos metilo y es la proteína más metilada en E. coli (14). Sin embargo, al parecer los grupos metilo no son importantes para el mecanismo regulatorio de la síntesis de RNA (65).

Finalmente, el ribosoma es un organelo que se encuentra en todos los seres vivos y cumple en todos la misma función. Es

indudable que su estructura ha experimentado algunos cambios durante la evolución (39), pero estos debieron ser de tal naturaleza, que a pesar de ello la función principal de sintetizar proteínas ha permanecido invariable.

El análisis de los componentes estructurales del ribosoma como son las proteínas y el RNA ribosomal ha sido una prueba filogenética de gran valor. Woese y Fox (79), analizando los datos de secuencia del RNA ribosomal de más de 170 especies diferentes postularon la existencia de tres reinos o líneas de descendencia: "las eubacterias", que contempla las bacterias azules y verdes y los Gram (+) y Gram (-); "los eucariotes", que incluye a animales, plantas y hongos y las "arquebacterias", que agrupa a los halófilos extremos, los metanógenos, *Sulfolobus* y *Termoplasma*. Es interesante considerar que los resultados de la figura 5 y Tabla III, están de acuerdo a esta proposición, ya que podemos pensar que las eubacterias poseen un patrón de metilación típico y conservado.

Por otra parte, el *Halobacterium cutirubrum* pertenece al grupo de arquebacterias conocido como halofílicos extremos y de este grupo es el que más se ha estudiado con respecto a sus ribosomas. Una de las características que más los diferencia de los ribosomas de las eubacterias es el carácter ácido de sus proteínas, las cuales fueron identificadas previamente por Strom y Visentin (73) en un sistema de geles diferente al empleado en este estudio. Bajo nuestras condiciones, las proteínas ribosomales muestran un patrón de metilación



distinto al de las eubacterias propiamente tales lo que apoyaría la idea de Woese de que este tipo de bacterias constituyen una línea diferente de descendencia. Sin embargo, en el caso específico de H. cutirubrum hay que considerar el carácter ácido de las proteínas ribosomales que las hace migrar en forma diferente a las proteínas eubacterianas en geles bidimensionales de poliacrilamida. Por esto mismo, el patrón distintivo de metilación de sus proteínas puede deberse a que en este caso las proteínas ribosomales en general presentan un carácter diferente al de las eubacterias propiamente tales y no a un carácter propio de las arqueobacterias. Será necesario por lo tanto, realizar estudios de la metilación de las proteínas ribosomales en otras arqueobacterias, antes de considerarlas como un grupo que presenta un patrón de metilación diferente.

Finalmente, a pesar que en este trabajo y en muchos otros laboratorios no se ha logrado demostrar aún una relación directa entre la función de los componentes ribosomales y su metilación, los resultados que se presentan establecen la universalidad de estas modificaciones en los ribosomas eubacterianos, destacando su potencial importancia y puntualizando aquellos sistemas factibles de explorar in vitro para un mejor conocimiento de la función de estas modificaciones post-traduccionales.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alix, J. H. y D. Hayes. 1974. Properties of ribosomes and RNA synthesized by Escherichia 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.
- 2.- Alix, J.H., D. Hayes y K. H. Nierhaus. 1979. Properties of ribosomes and RNA synthesized by E. coli grown in the presence of ethionine. V. Methylation dependence of the assembly of E.coli 50 S ribosomal subunits. J. Mol. Biol. 127:375-395.
- 3.- Alix, J. H. y D. Hayes 1982. Why are macromolecules modified post-synthetically? Biol. Cell. 47: 139-159.
- 4.- Amaro, A. M. y 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.
- 5.- Ames, G. F. L. y K. Niakido. 1979. In vivo methylation of prokaryotic elongation factor Tu. J. Biol. Chem. 254: 9947-9950.
- 6.- Auron, P. E. y S. Fahnestock. 1981. Functional organization of the large ribosomal subunit of Bacillus stearothermophilus. J. Biol. Chem. 256: 10105-10110.
- 7.- Bartsch, M., M. Kimura y A. R. Subramanian. 1982. Purification, primary structure, and homology relationships of a chloroplast ribosomal protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6871-6875.
- 8.- Beaud, G. y D. H. Hayes. 1971. Propriétés des ribosomes et du RNA synthétisés par Escherichia coli cultivé en présence d'éthionine. Eur. J. Biochem. 20: 525-534.
- 9.- Brimacombe, R. y W. Stiege. 1985. Structure and function of ribosomal RNA. Biochem. J. 229: 1-17.
- 10.- Brot, N., W. P. Tate, C. T. Caskey y H. Weissbach. 1974. The requirement for ribosomal proteins L7 an L12 in peptide chain termination. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 71: 89-92.
- 11.- Cannon, M. y E. Cundliffe. 1979. Methylation of basic proteins in ribosomes from wild-type and thiostrepton-resistant strains of Bacillus megaterium and their electrophoretic analysis. Eur. J. Biochem. 97: 541-545.

- 12.- Chang, C. N. y F. N. Chang. 1974. Methylation of ribosomal proteins in vitro. *Nature* (London) 251: 731-733.
- 13.- Chang, F.N., C.N. Chang y W.K. Paik. 1974. Methylation of ribosomal proteins in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 120: 651-656.
- 14.- Chang, C.N. y F.N. Chang. 1975. Methylation of ribosomal proteins in Escherichia coli. Nature and stoichiometry of methylated amino acids in 50S ribosomal proteins. *Biochemistry* 14: 468-477.
- 15.- Chang, F.N., I.J. Navickas, C.N. Chang y B.M. Dancis 1976. Methylation of ribosomal proteins in HeLa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 627-633.
- 16.- 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.
- 17.- Chen, R., J. Brosius, B. Wittmann-Liebold y W. Schafer. 1977. Occurrence of methylated amino-acids as N-termini of proteins from Escherichia coli ribosomes. *J. Mol. Biol.* 111: 173-181.
- 18.- Cohlberg, J. A y M. Nomura. 1976. Reconstitution of Bacillus stearothermophilus 50 S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.* 251: 209-221.
- 19.- Comb, D. G., N. Sankar y C.J. Pinzino. 1966. The methylation of lysine residues in protein. *J. Biol. Chem.* 241: 1857-1862.
- 20.- Dijk, J., R. A. Garret y R. Muller. 1979. Studies on the binding of the ribosomal complex L7L12/L10 and protein L11 to the 5'one third of 23 S RNA: a functional centre of 50 S subunit. *Nucleic. Acid. Res.* 6: 2717-2728.
- 21.- Fahnestock, S., V. Erdmann y M. Nomura. 1974. Reconstitution of 50 S ribosomal subunits from Bacillus stearothermophilus. *Methods Enzymol.* 30: 554-562.
- 22.- Fahnestock, S. R., W. A. Strycharz y D. M. Marquis. 1981. Immunochemical evidence of homologies among 50 S ribosomal proteins of Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 256: 10111-10116.
- 23.- Franklin, R. M., M. Salditt y A. Silbert. 1969. Structure and synthesis of a lipid containing bacteriophage. I. Growth of bacteriophage PM2 and alteration in nucleic acid metabolism in the infected cell. *Virology* 38: 627-640.

- 24.- Geisser, M., G. W. Tischendorf y G. Stoffler. 1973. Comparative immunological and electrophoretic studies on ribosomal proteins of Bacillaceae. 1973. Mol. Gen. Genet. 127:129-145.
- 25.- Guha, S. y J. Szulmajster. 1975. Isolation of 30 S and 50 S active ribosomal subunits of Bacillus subtilis, Marburg strain. J. Bacteriol. 124: 1062-1066.
- 26.- Hamel, E., M. Koka y T. Nakamoto. 1972. Requirement of an Escherichia coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 247: 805-814.
- 27.- Hanson, R. S., J. Blicharska y J. Szulmajster. 1964. Relationship between the tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of B. subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17: 1-7.
- 28.- Hardy, S. J. S., C.G. Kurland, P. Voynow y G. Mora. 1969. The ribosomal proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins. Biochemistry 8: 2897-2905.
- 29.- Hernández, F., M. Cannon y J. Davies. 1978. Methylation of proteins in 40S ribosomal subunits from Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 89: 271-275.
- 30.- Higo, K., W. Held, L. Kahan y M. Nomura. 1973. Functional correspondence between 30S ribosomal proteins of Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 944-948.
- 31.- Isono, K., S. Isono, G. Stoffler, L. P. Visentin, M. Yaguchi y A. T. Matheson. 1973. Correlation between 30S ribosomal proteins of Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 127: 191-195.
- 32.- Jerez, C. A. y H. Weissbach. 1980. Methylation of newly synthesized ribosomal protein L11 in a DNA - directed in vitro sistem. J. Biol. Chem. 255: 8706-8710.
- 33.- Kaltschmidt, E. y H. G. Wittman. 1970. Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67: 1276-1282.
- 34.- Kaltschmidt, E. y H. G. Wittman. 1970. Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Anal. Biochem. 36: 401-412.



- 35.- Kiserbom, L.A. y L.A. Isaksson . 1985. Involvement of ribosomal protein L7L12 in control of translational accuracy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:717-721.
- 36.- Krebs, G.E. y J.A. Beavo. 1979. Phosphorylation - Dephosphorylation of enzymes. Ann. Rev. Biochem. 48: 923-959.
- 37.- Kristiansen, K. y A. Kruger. 1979. Phosphorylation and degradation of ribosomes in starved Tetrahymena pyriformis. Exp. Res.118: 159-169.
- 38.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature. 227: 680-685.
- 39.- Lake, J. 1985. Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes, and eucaryotes. Ann. Rev. Biochem. 54: 507-530.
- 40.- Ledener, F., Alix, J.H. y Hayes, D. 1977. N-Trimetilalanine, a novel blocking group, found in E. coli ribosomal protein L11. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 470-480.
- 41.- Legault-Demare, L. y G. H. Chambliss. 1974. Natural messenger ribonucleic acid-directed cell-free protein-synthesizing system of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 120: 1300-1307.
- 42.- Li, K. y A. R. Subramanian. 1975. Selective separation procedure for determination of ribosomal proteins L7 and L12. Anal. Biochem. 64: 121-129.
- 43.- Lodish, H. L. 1969. Species specificity of polipeptide chain initiation. Nature. 224: 867-870.
- 44.- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193: 265-275.
- 45.- Mardones, E., A. M. Amaro, and C. A. Jerez. 1980. Methylation of ribosomal proteins in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 142: 355-358.
- 46.- Marquis, D. y S. R. Fahnstock. 1978. A complex of acidic ribosomal proteins. Evidence of a four-to-one complex of proteins in the Bacillus stearothermophilus ribosome. J. Mol. Biol. 119: 557-567.

- 47.- Matheson, A. T., M. Yaguchi, R. N. Nazar, L. P. Visentin y G. E. Willick. 1978. The structure of ribosomes from moderate and extreme halophilic bacteria. pp. 481-451. In S. R. Caplan and M. Ginzburg (ed). Energetics and structure of halophilic microorganisms. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 48.- Matheson, a. T., W. Moller. R. Amons y M. Yaguchi. 1979. Comparative studies on the structure of ribosomal proteins, with emphasis on the alanine-rich acidic ribosomal "A" proteins. pp. 297-332. In G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, and M. Nomura (ed). Ribosomes: structure, function and genetics. University Park Press Baltimore.
- 49.- Mc Laughlin, J. R., C. R. Murray y J.C. Rabinowitz. 1981. Initiation factor-independent translation of mRNAs from Gram-positive bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 4912-4916.
- 50.- Moller, W. 1974. The ribosomal components involved in EF-G and EF-Tu dependent GTP hydrolisis . pp 711-731. In M. Nomura, A. Tissieres, and P. Lengyel (ed). Ribosomes Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 51.- Moller, W., P. I. Schier, J. A. Maassen, A. Zantema, E. Schop, H. Reinalda, A. F. M. Cremers y J. E. Mellema. 1983. Ribosomal proteins L7/L12 of Escherichia coli. Localization and possible molecular mechanism in translation. J. Mol. Biol. 163: 553-573.
- 52.- Moore, S. y W. Stein. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. 1963. Methods Enzymol. 6: 819-831.
- 53.- Monnissey, J. J., H. Weissbach y N. Brot. 1975. The identification and characterization of proteins similar to L7,L12 in ribosome-free extracts of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 293-302.
- 54.- Monnissey, J.J., L.E. Cup, H. Weissbach y N. Brot. 1976. Synthesis of ribosomal proteins L7L12 in relaxed and stringent strains of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 251: 5516-5521.
- 55.- Murray, C. L. y J. C. Rabinowitz. 1982. Nucleotide sequences of transcription and translation initiation regions in Bacillus phage 29 early genes. J. Biol. Chem. 257: 1053-1062.



- 56.- Nierhaus, K. H. 1979. Analysis of the assembly and function of the 50S subunit from Escherichia coli ribosomes by reconstitution pp. 267-294. In G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kaham, and M. Nomura. (ed), Ribosomes: structure, function and genetics, University Park Press, Baltimore.
- 57.- Nierhaus, K. y F. Dohme. 1979. Total reconstitution of 50S subunits from Escherichia coli ribosomes. Methods Enzymol. 49: 443-449.
- 58.- Nierhaus, K. H. 1982. Structure, assembly, and function of ribosomes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 97: 82-155.
- 59.- Nomura, M. 1973. Assembly of bacterial ribosomes. Science 179: 864-873.
- 60.- Onishi, H., M. E. Mc Cance y N. E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions on the growth of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Microbiol. 6: 165-169.
- 61.- Paik, W. K. y S. Kim. 1980. Protein Methylation. pp. 142-183. In A. Meister (ed) Biochemistry. A series of monographs. John Wiley & Sons. Inc. New York.
- 62.- Parker, J., R. J. Watson, J. D. Friesen y H. P. Fill. 1976. A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11. Mol. Gen. Genet. 144: 111-114.
- 63.- Patterson, I., S. J. S. Hardy y A. Liljas. 1976. The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10. FEBS Lett. 64: 135-138.
- 64.- Ramagopal, S. y A. R. Subramanian. 1974. Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of Escherichia coli. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 6871-6875.
- 65.- Rohl, R. y K. H. Nierhaus. 1979. Methyl groups of ribosomal protein L11 are not related to the synthesis of ppGpp. Molec. Gen. Genet. 170: 187-189.
- 66.- Rowe, J. J., I. D. Goldberg y R. E. Amelunxen. 1975. Development of defined and minimal media for the growth of Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 124: 279-284.
- 67.- Sala, F., M. Bazzigalupo y P. Lengyel. 1970. The S1 factor in peptide elongation. Nature (London). 227: 34- 38.
- 68.- Sehgal, S. N. y N. E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions on the growth of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Microbiol. 6: 165-169.

- 69.- Smith, I. 1982. The translational apparatus of Bacillus subtilis. The molecular biology of the Bacilli. pp. 111-145.
- 70.- Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 44: 1072-1078.
- 71.- Stallcup, M. R. y J. C. Rabinowitz. 1973. Initiation of protein synthesis in vitro by a clostridial system. J. Biol. Chem. 248: 3209- 3215.
- 72.- Stallcup, M. R., W. J. Sharrack y J. C. Rabinowitz. 1976. Specificity of bacterial ribosomes and messenger ribonucleic acids in protein synthesis reactions in vitro. J. Biol. Chem. 251: 2499-2510.
- 73.- Strom, A. R. y L. P. Visentin. 1973. Acidic ribosomal proteins from the extreme halophile Halobacterium cutirubrum. The simultaneous separation, identification and molecular weight determination. FEBS Lett. 37: 274-280.
- 74.- Terhorst, C., B. Wittmann-Liebold y W. Moller. 1972. 50S ribosomal proteins: peptide studies on two acidic proteins, A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> isolated from 50S ribosomes of Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 25:13-19.
- 75.- Toledo, H. y C. Jerez. 1985. In vitro methylation of the elongation factor EF-Tu from Escherichia coli. FEBS. Lett. 193: 17-21.
- 76.- Visentin, L. P., C. Chow, A. T. Matheson, M. Yaguchi y F. Rollin. 1972. Halobacterium cutirubrum ribosomes. Properties of the ribosomal proteins and ribonucleic acid. Biochem. J. 130: 103-110.
- 77.- Waterson, J., G. Beaud y P. Lengyel. 1970. The S<sub>1</sub> factor in peptide elongation. Nature. 224: 867-870.
- 78.- Wittmann, H. G. 1982. Components of bacterial ribosomes. Annu. Rev. Biochem. 51: 155-183.
- 79.- Woese, C. R. y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5088-5090.