

**ESTUDIOS SOBRE ESTRUCTURA Y FUNCION
DEL ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA**



MANUEL KRAUSKOPF ROGER

1981

UCH-FC
DOC-B
K91
C.1

ESTUDIOS SOBRE ESTRUCTURA Y FUNCION
DEL ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA

Tesis

Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias
Básicas y Farmacéuticas



MANUEL KRAUSKOPF ROGER

Junio, 1981

Profesor Patrocinante: Dr. Jorge E. Allende R.

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Manuel Krauskopf Roger

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el 10 de Junio de 1981.

Patrocinante de Tesis:
Dr. Jorge E. Allende R.



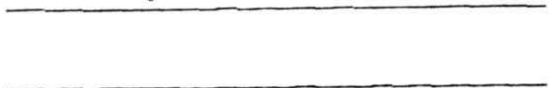
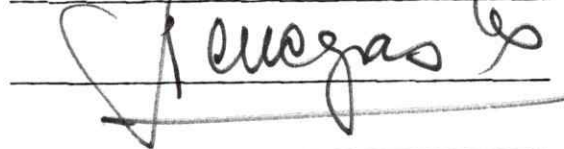
Comisión Informante de Tesis:
Dra. Catherine Connelly M.



Dr. Carlos Jerez G.



Dr. Alejandro Venegas E.



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todos los integrantes del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile, como asimismo a quienes han colaborado en este grupo de investigación. Agradezco especialmente a Alejandro Araya, Gloria León, Luis Meza, Eduardo Rosenmann, Julieta Villanueva y Tatiana Zuvic, por su contribución en parte de los experimentos del presente trabajo.

La estrecha colaboración que he mantenido con el Dr. M.A.Q. Siddiqui, del Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, Estados Unidos, se refleja claramente en el capítulo tercero de esta tesis. Por su ayuda y amistad, mi profundo agradecimiento.

Deseo también expresar mi gratitud al Dr. Jorge Allende, cuya confianza en mi trabajo ha sido un constante estímulo.

Mis agradecimientos al Sr. Risnel Bustos por la confección de los dibujos y a la Sra. María Angélica Espinoza por transcribir el texto de esta tesis.

Gracias, a todos los miembros del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, por su amistad, colaboración y crítica discusión.

Manuel Krauskopf R.

Junio, 1981

*A Eliana por su comprensión,
y a Erwin y Vania que también
han sufrido la ausencia que
mi trabajo impone.*

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
UNA MIRADA RETROSPECTIVA	xxi
INTRODUCCION	1
ESTRUCTURA DEL tRNA	1
Purificación	1
Fraccionamiento	2
Multiplicidad de especies de tRNA para un mismo aminoácido	4
Estructura primaria y secundaria	5
Estructura terciaria	12
ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL tRNA	18
- Síntesis de Proteínas	18
Formación del aminoacil-tRNA	18
Formilación de Met-tRNA	19
Reconocimiento de los factores solubles de iniciación y elongación	20
Interacciones tRNA-ribosoma	21
El complejo codón-anticodón	24
El tRNA como regulador	26

	Pág.
- Metabolismo del RNA	29
Reconocimiento de moléculas precursoras de tRNA durante su procesamiento	30
tRNA-nucleotidiltransferasa	31
Modificación de bases del tRNA	32
Peptidil-tRNA hidrolasa	33
El tRNA en la biogénesis de los virus	34
Estructuras tipo tRNA en RNA virales	35
- El tRNA en otros procesos bioquímicos	36
ESTUDIOS REALIZADOS EN LA PRESENTE TESIS	37
- Purificación de tRNA específicos mediante heteroaminoacilación heteróloga	37
- N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa. Sitio de reconocimiento del sustrato	38
- Modulación de la población de tRNA	39
MATERIALES Y METODOS	42
METODOS	42
Cultivo de microorganismos	42
Fraccionamiento de tRNA en columnas de BD-celulosa	42
Preparación de aminoacil-tRNA sintetetas	42
Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de <u>E.coli</u> con aminoacil-tRNA sintetasa de <u>E.coli</u>	43
Ensayo de aminoacilación de tRNA de <u>E.coli</u> con Fen-tRNA sintetasa de <u>N.crassa</u>	43
Aislamiento de tRNA de <u>B.mori</u>	44
Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de glándula de <u>B.mori</u> con sintetasa de <u>B.mori</u>	44

Ensayo de aminoacilación de tRNA ^{Met} de <u>B.mori</u> con enzima de <u>E.coli</u>	45
Procedimiento general para cuantificar la radioactividad incorporada a tRNA en los ensayos de aminoacilación	45
Aminoacilación de tRNA de levadura con aminoacil-tRNA sintetasas de levadura y aislamiento del aminoacil-tRNA	46
Aislamiento de [³² P] tRNA de la región posterior de la glándula de <u>B.mori</u>	47
Electroforesis en geles de poliacrilamida	47
Purificación parcial de N-Acetilfenil-alanil-tRNA hidrolasa	48
Preparación de N-Acetil- [³ H] o [¹⁴ C] aminoacil-tRNA	50
Ensayo para determinar la actividad de peptidil y N-AcFen-tRNA hidrolasa	51
Preparación de tRNA de hígado de <u>C.carpio</u>	51
Determinación de los niveles de aminoacilación <u>in vivo</u>	52
Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de <u>C.carpio</u> con enzima homóloga	54
Líquido de centelleo para cuantificar radioactividad	54
MATERIALES	54
Material biológico	54
Reactivos y otros materiales	55
RESULTADOS	57
CAPITULO PRIMERO	57

PURIFICACION DE tRNA ESPECIFICOS MEDIANTE HETEROAMINOACILACION HETEROLOGA	57
Comportamiento cromatográfico de tRNA ^{Val} , tRNA ^{Ala} y tRNA ^{Fen} de <u>E.coli</u> en columnas de BD-celulosa	57
Efecto de la heteroaminoacilación heteróloga y de la configuración que adopta el tRNA sobre la conducta cromatográfica	60
Fraccionamiento de tRNA específicos	65
Purificación de tRNA ₁ ^{Val} y tRNA ₁ ^{Ala} de <u>E.coli</u>	68
CAPITULO SEGUNDO	76
N-ACETILFENILALANIL-tRNA HIDROLASA. SITIO DE RECONOCIMIENTO DEL SUSTRATO	76
Aislamiento de una fracción parcialmente purificada de N-AcFen-tRNA hidrolasa de levadura	76
Actividad de la N-AcFen-tRNA hidrolasa (fracción 60-80% sulfato de amonio) sobre distintos sustratos	80
Purificación de N-AcFen-tRNA hidrolasa	83
Purificación de N-Ac [¹⁴ C]Fen-tRNA ₁ ^{Val} de <u>E.coli</u>	83
Cinética de la hidrólisis de N-AcFen-tRNA de varios orígenes por la N-AcFen-tRNA hidrolasa	86
CAPITULO TERCERO	90
MODULACION DE LA POBLACION DE tRNA	90

Cambios selectivos en la población de tRNA durante el desarrollo de la región posterior de la glándula del gusano de seda <u>Bombyx mori</u>	90
Fraccionamiento de isoformas de tRNA ^{Met} por cromatografía en BD-celulosa	92
Identificación de las isoformas de tRNA ^{Met} de la región posterior de la glándula de <u>B.mori</u>	96
Compartimentalización y especialización de la población de tRNA ^{Ala} de <u>B.mori</u>	100
Modulación de los niveles intracelulares de aminoacil-tRNA asociados a la aclimatación del pez <u>Cyprinus carpio</u>	114
DISCUSION	118
BIBLIOGRAFIA	132

LISTA DE TABLAS

		Pág.
TABLA I	Concentración de NaCl requerida para eluir tRNA ₁ ^{Val} de <u>E.coli</u> bajo distintas condiciones cromatográficas	62
TABLA II	Análisis cuantitativo de las etapas de purificación de tRNA ₁ ^{Val} y tRNA ₁ ^{Ala} de <u>E.coli</u>	74
TABLA III	Separación de hidrolasas del híbrido <u>Saccharomyces fragilis</u> x <u>Saccharomyces dobzhanskii</u> por precipitación con sulfato de amonio	77
TABLA IV	Cantidad relativa de isoespecies tRNA ^{Met} en la región posterior de la glándula de <u>B.mori</u>	95
TABLA V	Aminoacilación y formilación de tRNA ^{Met} de la parte posterior de la glándula del gusano de seda	104
TABLA VI	Contenido de tRNA en el hígado de la carpa	115
TABLA VII	Niveles de aminoacil-tRNA <u>in vivo</u> en hígado de <u>C.carpio</u>	117

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estructura primaria y secundaria del tRNA y sistema de numeración de acuerdo al número de nucleótidos de tRNA fenilalanina de levadura	7
Figura 2.	Estructura terciaria del tRNA	15
Figura 3.	Cromatografía de tRNA total de <u>E.coli</u> ...	58
Figura 4.	Perfil de elución de Fen-tRNA ^{Val} en tampón formiato de sodio pH 4,0 y ausencia de Mg ²⁺	63
Figura 5.	Perfil de elución de Fen-tRNA ₁ ^{Val} en tampón formiato de sodio pH 4,0 y Mg ²⁺	66
Figura 6.	Fraccionamiento de tRNA ₁ ^{Val}	67
Figura 7.	Cromatografía de una fracción enriquecida en tRNA ₁ ^{Val} y tRNA ₁ ^{Ala} sobre Plaskon	70
Figura 8.	Purificación de tRNA ₁ ^{Val}	72
Figura 9.	Purificación de tRNA ₁ ^{Ala}	73
Figura 10.	Fraccionamiento de peptidil y N-AcFen-tRNA hidrolasa por cromatografía en DEAE-Sephadex A-50	78

	Pág.
Figura 11. Hidrólisis de distintos N-Acetil-aminoacil-tRNA	81
Figura 12. Cromatografía de N-AcFen-tRNA hidrolasa en Sephadex G-100	84
Figura 13. Cromatografía de N-AcFen-tRNA hidrolasa en hidroxilapatita	85
Figura 14. Purificación de N-Ac [¹⁴ C] Fen-tRNA ^{Val} ₁ de <u>E.coli</u>	87
Figura 15. Cinética de la hidrólisis enzimática de distintos N-Acetilfenilalanil-tRNA...	88
Figura 16. Electroforesis en dos dimensiones de [³² P]-tRNA de la región posterior de la glándula del gusano de seda	91
Figura 17. Cromatografía de Metionil-tRNA de <u>B.mori</u> en BD-celulosa	93
Figura 18. Composición gráfica: Concentración de la iso especie de tRNA ^{Met} en la región posterior de la glándula de <u>B.mori</u> durante su desarrollo	97
Figura 19. Identificación de la naturaleza del Metiónil-tRNA por cromatografía en BD-celulosa	98
Figura 20. Fraccionamiento de tRNA ^{Met} de <u>B.mori</u> en BD-celulosa	101

	Pág.
Figura 21. Cinética de la aminoacilación y formilación de tRNA ^{Met}	102
Figura 22. Cromatografía de [¹⁴ C]Ala-tRNA ^{Ala} de la región media de la glándula de <u>B.mori</u>	106
Figura 23. Cromatografía de [³ H]Ala-tRNA ^{Ala} de la parte posterior de la glándula de <u>B.mori</u>	108
Figura 24. Electroforesis en gel de acrilamida de tRNA ^{Ala} de la región media y posterior de la glándula del gusano de seda	109
Figura 25. Cromatografía de tRNA ^{Ala} y [¹⁴ C]Ala-tRNA de la región media de la glándula de <u>B.mori</u>	111
Figura 26. Cromatografía de tRNA ^{Ala} deacilado y [³ H]Ala-tRNA ^{Ala} de la región posterior de la glándula de <u>B.mori</u>	113
Figura 27. Estructura primaria y secundaria de tRNA ^{Fen} de levadura y <u>E.coli</u> y de tRNA ^{Val} de <u>E.coli</u>	125

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₂₆₀	: Absorbancia a 260 nm.
aa-tRNA	: Aminoacil tRNA.
BD-celulosa	: DEAE celulosa benzoilada.
Cm	: 0-2' Metilcitosina.
D	: Dihidrouridina.
DEAE	: Dietilaminoetil.
DBAE	: Dihidroxiboril-diaminoetil.
DTT	: Ditiotreitól.
EtOH	: Etanol.
Gm	: 0-2' Metilguanosina.
hU	: Dihidrouridina.
Hepes	: Acido N-2-Hidroxi-etilpiperacina- N'-2-etanosulfónico.
NaOAc	: Acetato de sodio.
m ¹ A	: N ¹ -Metiladenosina.
m ⁶ A	: N ⁶ -Metiladenosina.
ms ^{2,6} A	: 2-Metiltio-N ⁶ -isopenteniladenosina.
m ⁵ C	: N ⁵ -Metilcitosina.
m ² G	: N ² -Metilguanosina.
m ⁷ G	: N ⁷ -Metilguanosina.
mttRNA	: tRNA mitocondrial.
5-0-AcU	: Uridin-5-ácido oxiacético.

Pi	:	Pirimidina.
POPOP	:	(1,4-bis 2(5-feniloxazolil) benceno.
PPO	:	2,5-difeniloxazol.
Pu	:	Purina.
⁴ _{SU}	:	4-tiouridina.
Su	:	supresor.
T	:	Timidina ribósido.
Tm	:	0-2'Metiltimidina ribósido.
TCA	:	Acido tricloroacético.
U*	:	Uridina modificada.
UA ₂₆₀	:	Unidades de absorbanca a 260 nm.
V ₀	:	Volumen de vacío.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento cromatográfico de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$, de $\text{Val-tRNA}_1^{\text{Val}}$ y de $\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ de E.coli, usando columnas de BD-celulosa. El $\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ se obtuvo aminoacilando erróneamente $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ de E.coli con Fen-tRNA sintetasa de N.crassa. La posición de elución de $\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ de la cromatografía a pH 4,0 no varió en presencia o ausencia de Mg^{2+} , en cambio la elución de $\text{Val-tRNA}_1^{\text{Val}}$ se retardó al omitir el catión bivalente. Se observó además, que cuando se cromatografía $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ aminoacilado y deacilado, proveniente tanto de la región posterior como de la región media de la glándula de B.mori, las especies aminoaciladas se resuelven de manera distinta. La cromatografía de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ deacilado, obtenido de la región media de la glándula, permitió separar dos isoformas de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$, lo que contrasta con la escasa resolución que se obtuvo con el $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ aminoacilado previamente. La conducta cromatográfica de estas especies de tRNA proveniente de E.coli y B.mori indica que ambos, el aminoácido y su naturaleza influyen en la estructura que asume el aminoacil-tRNA, y que esta última es distinta a la del tRNA deacilado.

Puesto que $\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ se retardó selectivamente en BD-celulosa, se estudiaron procedimientos que pudieran ser útiles para purificar tRNA específicos. Basados en las propiedades cromatográficas de los tRNA heteroaminoacilados se aislaron $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ altamente purificados.

En la presente tesis se estudiaron además los aspectos moleculares del reconocimiento del sustrato de la enzima N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa de levadura. Debido a que los sustratos N-AcFen-tRNA^{Fen} de levadura y E.coli, y N-AcFen-

tRNA^{Val}₁ de E.coli fueron hidrolizados eficientemente por la enzima, no así un cuarto sustrato, N-AcVal-tRNA^{Val}, se concluye que la enzima no presenta requerimientos estrictos por una molécula de tRNA específica y que el residuo N-Acetilfenilalanil es un sitio de reconocimiento para esta hidrolasa.

Finalmente en este trabajo se estudió la población de tRNA, sus características y los cambios que sufre, durante desarrollo y aclimatación, eligiendo dos organismos cuyas características fisiológicas permiten asociar la participación del tRNA en procesos específicos.

Se examinó la población de tRNA^{Met} proveniente de dos distintos estados fisiológicos de la región posterior de la glándula del gusano de seda durante su desarrollo. Los tRNA^{Met} aislados de ambos estados fueron separados en columnas de BD-celulosa, resolviéndose en cada caso dos isoformas, tRNA^{Met}₁ y tRNA^{Met}₂. La cantidad de tRNA^{Met}₁ por glándula, especie que se formiló con la enzima de E.coli, aumentó doce veces concomitantemente con el período de síntesis masiva de una sola proteína, la fibroína de la seda. Puesto que la fibroína no contiene metionina, el aumento selectivo del contenido de tRNA^{Met}₁ podría corresponder al requerimiento específico de tRNA iniciador que impone la activa síntesis proteica durante la diferenciación terminal de la glándula. Las características de tRNA^{Met}₁, que lo asemejan a los tRNA^{Met}_i de eucariontes, apoyan esta interpretación.

Se observó además en este trabajo, que los isoaceptores de tRNA^{Ala} de B.mori se ubican en distintos compartimientos morfo-funcionales. La glándula de B.mori contiene varios isoaceptores de tRNA^{Ala}. La región posterior contiene la isoforma tRNA^{Ala}_{2a}, la que está esencialmente ausente en la región media, donde específicamente aparece una

isoespecie tRNA^{Ala}_{1b}. Las evidencias indican que la presencia selectiva de tRNA^{Ala}_{2a} en la región posterior es necesaria para la óptima síntesis de la fibroína en el período de producción masiva de esta proteína.

También se estudió el comportamiento de la población de tRNA durante el proceso de aclimatación, examinando los niveles intracelulares de los aminoacil-tRNA en hígados de carpas (C. carpio) adaptadas a verano e invierno. El contenido de Val-tRNA, Ala-tRNA y Met-tRNA in vivo disminuyó notablemente durante el verano, estación donde Val fue 80%, Ala 47% y Met 54% respecto de los niveles de invierno.

El comportamiento de la población de tRNA durante procesos como diferenciación, desarrollo y aclimatación, que exhiben cambios definidos en la síntesis macromolecular, además de la notable compartimentalización asociada a profundas diferencias morfo-funcionales, involucra a esta macromolécula en la modulación de la síntesis de proteínas.

ABSTRACT

The chromatographic behaviour of E.coli tRNA₁^{Val}, Val-tRNA₁^{Val} and Phe-tRNA₁^{Val} was studied on BD-cellulose columns. Phe-tRNA₁^{Val} was obtained by heterologous mischarging with N.crassa Phe-tRNA synthetase. At pH 4.0 the elution position of Phe-tRNA₁^{Val} was not affected by the presence or absence of Mg²⁺, whereas Val-tRNA₁^{Val} was slightly retarded when Mg²⁺ was omitted. In addition, a marked difference in the elution pattern was observed when the aminoacylated and deacylated forms of tRNA^{Ala} from the posterior and middle silk gland were fractionated on BD-cellulose columns. Chromatography of deacylated tRNA^{Ala} from the middle silk gland resolved two tRNA^{Ala} isoacceptor species which were not detected when the aminoacylated-tRNA was fractionated. The chromatographic behaviour of these E.coli and B.mori tRNA species indicates that both the amino acid and its nature influence the structure that the aminoacyl-tRNA assumes and that the latter exhibits a different conformation when compared to its deacylated state.

Based on the properties of heteroaminoacylated tRNAs and their behaviour on BD-cellulose chromatography, highly purified E.coli tRNA₁^{Val} and tRNA₁^{Ala} were isolated.

In the present work, the molecular basis of the N-Acetyl-Phe-tRNA hydrolase substrate recognition was also studied. Since yeast and E.coli N-AcPhe-tRNA^{Phe} and E.coli N-AcPhe-tRNA₁^{Val} were hydrolyzed by the enzyme, whereas a fourth substrate, yeast N-AcVal-tRNA^{Val} was not, it is concluded that the enzyme does not have a stringent requirement for a specific tRNA molecule and that the N-Acetylphenylalanyl residue is a recogni-

tion site for this hydrolase.

Finally, the changes in the tRNA population during development and acclimatization were studied, selecting two different organisms where the participation of tRNA could be associated to well defined physiological states.

Transfer RNA with methionine acceptor activity isolated from two distinct physiological stages of the developing posterior silk gland of B.mori was examined. The tRNA from both stages could be fractionated on BD-cellulose columns into two isoaccepting species, tRNA₁^{Met} and tRNA₂^{Met}. The molar quantity per gland of tRNA₁^{Met} species, which was also formylatable with the E.coli enzyme, increased twelve-fold as the gland differentiates to produce a large amount of a single protein, silk-fibroin. Since methionine is not part of silk-fibroin, the preferential increase in tRNA₁^{Met} content may reflect the necessity for initiator tRNA during the terminal differentiation of posterior silk gland, where a rapid rate of protein synthesis is observed.

In this work we also observed major differences in the compartmentalization of the isoaccepting tRNA^{Ala} species in the two portions of the silk gland, the posterior and middle part. In the posterior silk gland tRNA_{2a}^{Ala} was found. This isoacceptor tRNA is essentially absent in the middle region, where tRNA_{1b}^{Ala}, a different isoacceptor is also present. The selective localization of tRNA_{2a}^{Ala} in the posterior silk gland seems to be required for the efficiency of the massive fibroin synthesis which occurs during the terminal developmental stage of the gland.

The behaviour of the tRNA population during the acclimatization process was studied, examining the intracellular levels of aminoacylated-tRNAs in livers from summer and winter

adapted carps (Cyprinus carpio). The in vivo content of Val-tRNA, Ala-tRNA and Met-tRNA decreased significantly during the summer season, in which Val was 80%, Ala 47% and Met 54% with respect to the values observed in winter.

The behaviour of the tRNA population during differentiation, development and acclimatization, processes which involve changes in the gene expression activity, suggest that the tRNA molecules participate in the modulation of protein synthesis.

UNA MIRADA RETROSPECTIVA.

El RNA de transferencia (tRNA) fue descubierto hace poco más de 20 años. Es posible, que por la predicción teórica que se hiciera acerca de su posible existencia, inserta en una época de efervescencia creadora, su descubrimiento coronara con características especiales, otra de las fascinantes etapas emprendidas en la carrera por desentrañar los íntimos mecanismos a través de los cuales las células sintetizan proteínas.

" Cada aminoácido se uniría químicamente mediante una enzima especial, con una pequeña molécula que teniendo una superficie específica capaz de formar uniones hidrógeno, se combinaría con el ácido nucleico molde. Esta unión otorgaría también la energía necesaria para la polimerización. En su forma más simple, deberían existir 20 tipos distintos de moléculas adaptadoras, una para cada aminoácido, y 20 enzimas para unir los aminoácidos a sus adaptadores." Así escribió F.H.C. Crick a comienzos del año 1955 en una de las tantas notas que se enviaban entre los 20 miembros regulares y 4 honorarios del "Club de la corbata del RNA" (RNA tie Club) fundado por G. Gamov al comienzo de esa década (1). Aun cuando la histórica nota escrita por Crick no ha sido publicada en extenso, fue difundida (2) y gran parte de ella ha sido considerada en una magnífica revisión sobre la materia efectuada por Hoagland (3), codescubridor material del tRNA.

Las enzimas activantes de aminoácidos, fueron descritas por primera vez en 1955. Mahlon Hoagland conoció de cerca y participó en el laboratorio de Fritz Lipmann del entonces reciente hallazgo: la unión peptídica entre β -alanina y ácido pantoténico se formaba con participación de ATP, existiendo

liberación de pirofosfato (4, 5). Al unirse al grupo de Paul Zamecknik, comprobó que la activación de aminoácidos podría estudiarse midiendo el intercambio entre $[^{32}\text{P}]$ pirofosfato y ATP en presencia de aminoácidos y una fracción de enzima pH 5 (6). Esta última resultaba al precipitar con ácido un sobrenadante 105.000 x g, obtenido de un homogenizado de tejidos. Las hoy conocidas aminoacil-tRNA sintetetas habían sido descubiertas. Pronto se supo que eran específicas para cada aminoácido y que generaban complejos aminoacil adenilato unidos a la enzima (7, 8). Sin embargo, sólo hasta 1957, año en que Hoagland trabajando con Zamecknik (9), en U.S.A., e independientemente Ogata y Nohara en Japón (10) descubrieran la existencia del aceptor natural, el tRNA, fue posible demostrar que la misma enzima que participaba en la activación del aminoácido, catalizaba la transferencia de este último al tRNA (11, 12).

El descubrimiento del tRNA aunque en parte "casual", respondió a una sistemática búsqueda fundamentada en una sólida línea de trabajo para dilucidar el mecanismo molecular de la síntesis proteica. Zamecknik estudiaba la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ aminoácidos a proteínas en un sistema libre de células (13). Examinó junto a Hoagland y otros colaboradores, la posibilidad de utilizar el sistema libre de células usado para investigar la síntesis proteica, en el estudio de la síntesis de ácidos nucleicos. Al agregar $[^{14}\text{C}]$ ATP a un sistema libre de células de hígado, pudieron aislar una fracción de RNA, en la que evidenciaron la presencia de $[^{14}\text{C}]$ proveniente del ATP (14). Como experimento control, para descartar un posible artefacto resultante de un lavado inadecuado de la fracción de RNA, agregaron $[^{14}\text{C}]$ leucina en vez de $[^{14}\text{C}]$ ATP en uno de los tubos y aislaron como de costumbre al RNA. Inesperadamente,

la fracción de RNA contenía marca proveniente de $[^{14}\text{C}]$ leu. Después de múltiples intentos de "despegar" la marca con diferentes lavados, concluyeron que el aminoácido estaría unido covalentemente al RNA. Jesse Scott permitió afinar el descubrimiento. En discusiones de los resultados, mencionó la existencia de una pequeña fracción de RNA celular, entre el 10 y 15% del total, que no sedimentaba con los ribosomas. En vez de analizar RNA total, se repitieron los experimentos, utilizando el sobrenadante $105.000 \times g$ de un homogenizado libre de células de hígado. Cuando este fue incubado en presencia de ATP y $[^{14}\text{C}]$ leu, omitiendo la fracción ribosomal, se aisló una fracción de RNA, con $[^{14}\text{C}]$ leu unida a ella. Aunque más grande que el que vislumbró Crick en su hipótesis del adaptador, el tRNA y su correspondiente aminoacil-tRNA sintetasa, respondieron a los requisitos de la hipótesis. La evidencia final, inequívoca, para demostrar que el molde sólo reconocía la naturaleza del aminoácido a través de su adaptador, fue aportada en 1962, en el laboratorio de Lipmann. Francois Chapeville obtuvo alanil-tRNA a partir de cisteniil-tRNA, reduciendo a este último con níquel de Raney. Así un aminoácido que no correspondía a su tRNA, estaba esterificado a él (15). Con este tRNA erróneamente aminoacilado se demostró que la incorporación de un aminoácido a una secuencia polipeptídica, dependía de la naturaleza del tRNA y no del aminoácido.

Hace muy poco el tRNA cumplió mayoría de edad. Muchas de las interrogantes han sido contestadas a través de sus cortos 23 años de vida. Pero aún presenta interesantes desafíos.

INTRODUCCION

El tRNA constituye una clase de moléculas de RNA de bajo peso molecular cuya función más conocida se encuentra en la síntesis de proteínas. En esta última, el tRNA es la molécula adaptadora a través de la cual se selecciona a un determinado aminoácido para ubicarlo en una posición acorde a la información codificada en el mensaje genético. La participación del tRNA en otros procesos celulares implica que esta macromolécula posee múltiples funciones. Para conocer y comprender tal diversidad de funciones, ha sido necesario aislar y fraccionar moléculas de tRNA específicas para un aminoácido, estudiar su estructura e identificar los sitios de reconocimiento comprometidos en cada uno de los procesos en que esta macromolécula participa.

ESTRUCTURA DEL tRNA

Purificación.

Muchas de las propiedades físicoquímicas del tRNA difieren de aquellas de otros componentes celulares como proteínas, DNA, rRNA y polisacáridos. Estas diferencias proveen las bases metodológicas utilizadas para la extracción y purificación del tRNA. Los procedimientos generales han hecho uso también de la compartimentalización citoplasmática de estas macromoléculas. Así, a través del fraccionamiento celular, se ha podido separar por simples métodos físicos gran parte del DNA contenido en el núcleo de las células y, especialmente durante

los últimos años, el tRNA contenido en las mitocondrias y cloroplastos. Tan pronto Kirby (16) introdujo un sistema de extracción de RNA de células animales utilizando mezclas fenol-agua, se describieron una amplia variedad de procedimientos y modificaciones, todos los cuales permiten obtener un producto libre de contaminantes (17-21).

Fraccionamiento.

El primer método para separar en gran escala tRNA específicos para un aminoácido, fue el fraccionamiento por distribución en contracorriente. Fueron Holley y Merrill (22) quienes observaron que este procedimiento permitía separar parcialmente tRNA^{Ala} de hígado de rata, de otras especies de tRNA. Posteriormente, se desarrollaron una serie de métodos principalmente cromatográficos.

Kelmers y col. (23-26) introdujeron la cromatografía en fase inversa (RPC), en que la separación se obtiene tanto por intercambio iónico como por interacciones hidrofóbicas entre los tRNA y el extractante activo que cubre al soporte inerte, generalmente una sal de amonio cuaternario insoluble en agua. El tipo RPC-5 ha sido el más ventajoso (26). Casi simultáneamente, el grupo de Tener diseñó un nuevo intercambiador iónico sustituyendo los grupos hidroxilo de DEAE-celulosa por ácidos aromáticos (27). Benzoilando DEAE-celulosa se obtuvo un producto para cromatografía con excelentes propiedades físicas, donde el incremento de atracciones lipofílicas permite una considerable purificación de numerosas especies de tRNA (27). La modificación química del grupo amino correspondiente al aminoácido de un tRNA esterificado enzimáticamente y su posterior cromatografía en BD-celulosa constituye uno de los

procedimientos más generales para la purificación de tRNA específicos. La fenoxiacetilación de este residuo le otorga al aa-tRNA una elevada hidrofobicidad, facilitando así su separación de otras especies (28-32).

Varios otros métodos hacen uso de la formación del aa-tRNA como primera etapa en su purificación. Así, aa-tRNA a los que se le ha adicionado un grupo p-cloromercurifenilo han sido separados de tRNA deacilados por cromatografía usando Sepharose-4 B modificada con grupos tiol reactivos (33). Una característica que distingue al tRNA deacilado del aa-tRNA es que el primero contiene un grupo libre 2,3-diol en la ribosa de su adenosina 3' terminal. Esta diferencia ha sido explotada para separar aa-tRNA usando columnas de DBAE-celulosa, intercambiador que contiene grupos dihidroxiborilo unidos a aminoetil celulosa (34). Los tRNA que poseen grupos cis-diol forman complejos específicos con los grupos dihidroxiborilos y se retardan en la columna. Sin embargo, el método ha resultado desventajoso por la falta de reproducibilidad del intercambiador DBAE-celulosa obtenido en el laboratorio y comercialmente.

Aun cuando las cromatografías en RPC-5, BD-celulosa y DEAE-Sephadex (35) han sido muy versátiles, presentan algunas limitaciones inherentes a su naturaleza. Usando análogos de RPC-5 con resinas intercambiadoras de poliestireno, Singhall (36) desarrollo un sistema de mayor resolución. Sin embargo, al igual que RPC, requiere el uso de altas presiones. Esta complicación parece haberse superado muy recientemente con la introducción de un sistema denominado RPC-LH el que utiliza Sephadex LH-20 recubierto con Adogen 464 (37). Con este último se pueden usar flujos elevados y obtener gran resolución.

Fradin y col. (38) demostraron que la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida permitía resolver esen-

cialmente todas las especies de tRNA. Esta técnica ha permitido aislar pequeñas cantidades de especies de tRNA puras, previamente marcadas con $[^{32}\text{P}]$, lo que ha facilitado el estudio de secuencias de tRNA específicos de organelos celulares (39).

Multiplicidad de especies de tRNA para un mismo aminoácido.

En casi todos los organismos se encuentra más de un tRNA específico para cada uno de los 20 aminoácidos. La presencia de estos tRNA isoaceptores pudiera responder a la degeneración del código genético. Sin considerar los tRNA específicos de los organelos, si cada codón con sentido (84) correspondiera a una isoespecie de tRNA, deberían existir 61 especies de tRNA en el citoplasma. Ello no siempre es así, ya que el apareamiento codón-anticodón no sólo está mediado por la complementariedad de las bases A•U y G•C. De acuerdo a la hipótesis de la base "oscilante" de Crick (85), la base 5' del anticodón puede formar en algunos casos uniones hidrógeno con más de una base localizada en el extremo 3' de un codón. Aun más, pareciera ser que no se utilizan todos los codones en todos los organismos de manera que se requieren menos que 61 especies de tRNA (49).

El tRNA_i^{Met} constituye una isoespecie de particular interés. El mecanismo de iniciación de la síntesis de la cadena polipeptídica requiere de un tRNA específico para metionina, distinto a aquel que introduce al mismo aminoácido en las posiciones internas de la proteína.

En mitocondrias se han identificado 23 secuencias de los 24 genes de tRNA que se estiman que existen en estos organelos (86-88). No obstante, analizando aminoacil-tRNA de mitocondria

de levaduras, se han ubicado por cromatografía en un sistema RPC-5, entre 31 a 35 especies distintas de tRNA (39). Este número incluye especies que resultan de modificaciones post-transcripcionales (86). Berlani y col. (89) demostraron recientemente que una mutación puntual del DNA mitocondrial impide la aminoacilación de 4 isoespecies de tRNA^{His}, lo que sugiere que éstas se originan en un solo gen.

Dado que la multiplicidad de especies de tRNA está determinada tanto por la transcripción de genes específicos como por alteraciones postranscripcionales de sus productos, parece improbable que su función primordial sea la de utilizar la degeneración del código genético. Algunas isoespecies de tRNA leen el mismo codón como también existen casos en que varios codones son leídos por el mismo aminoacil tRNA. Otras isoespecies exhiben actividades ajenas al proceso de síntesis proteica.

Estructura primaria y secundaria.

Desde que Holley y col. (40) determinaron la primera secuencia de un tRNA, tRNA^{Ala} de levadura, las técnicas desarrolladas por Sanger y su grupo (41, 42) apropiadas para trabajos con pequeñas cantidades de tRNA marcado con [³²P], simplificaron mucho los análisis de secuencia. Junto a otros métodos (ver rev. ref. 43) permitieron que se alcance en un período de tiempo relativamente corto, la gran cantidad de conocimientos existentes acerca de la estructura primaria del tRNA. Los tRNAs se distinguen por contener una proporción significativa de nucleósidos modificados, de los cuales se han aislado y caracterizado más de 50. Muchos de estos nucleósidos resultan de la.

metilación, ya sea de la base o del 2'-OH de la ribosa. Sin embargo, existen también un gran número de nucleósidos hipermodificados, producto de procesos biomoleculares bastante más complejos (48, 49).

Se conocen sobre 180 secuencias de tRNA, las que han sido comparadas para determinar las características estructurales que han conservado las distintas especies. Todas las secuencias descritas permiten acomodar las bases tal como originalmente lo propusiera Holley (40) en una estructura secundaria en forma de hoja de trébol, lo que origina regiones helicoidales bicatenarias y asas de regiones monocatenarias. Los tallos se configuran por pares de bases Watson y Crick, exceptuando algunos apareamientos de bases G•U muy ocasionales o sitios con pares de bases no complementarias. Como se indica en la Fig. 1, se distinguen 4 asas, la de la dihidrouridina (D) o asa I, la del anticodón (II), la variable (III) y la TΨC (IV). Los tallos son el de la dihidrouridina, del anticodón, TΨC y el aceptor. Algunas especies de tRNA presentan un tallo variable precediendo al asa del mismo nombre. Se conoce como brazo del tRNA al tallo y su asa correspondiente. La última recopilación de las secuencias de tRNA conocidas corresponde a Gauss y Sprinzl (44). El sistema adoptado para la numeración de las bases (45) utilizó el tRNA^{Fen} de levadura como patrón, debido a que la información acerca de esta especie es la más avanzada (46). El tRNA^{Fen} está constituido por 76 bases, número base que permite encuadrar la casi totalidad de las secuencias descritas, a excepción entre otros de tRNA^{Gli} de levadura (44), constituido por 73 bases. Un ejemplo extremo es el hallazgo reciente de un tRNA^{Ser} en mitocondria de mamíferos, formado por sólo 62 bases (47).

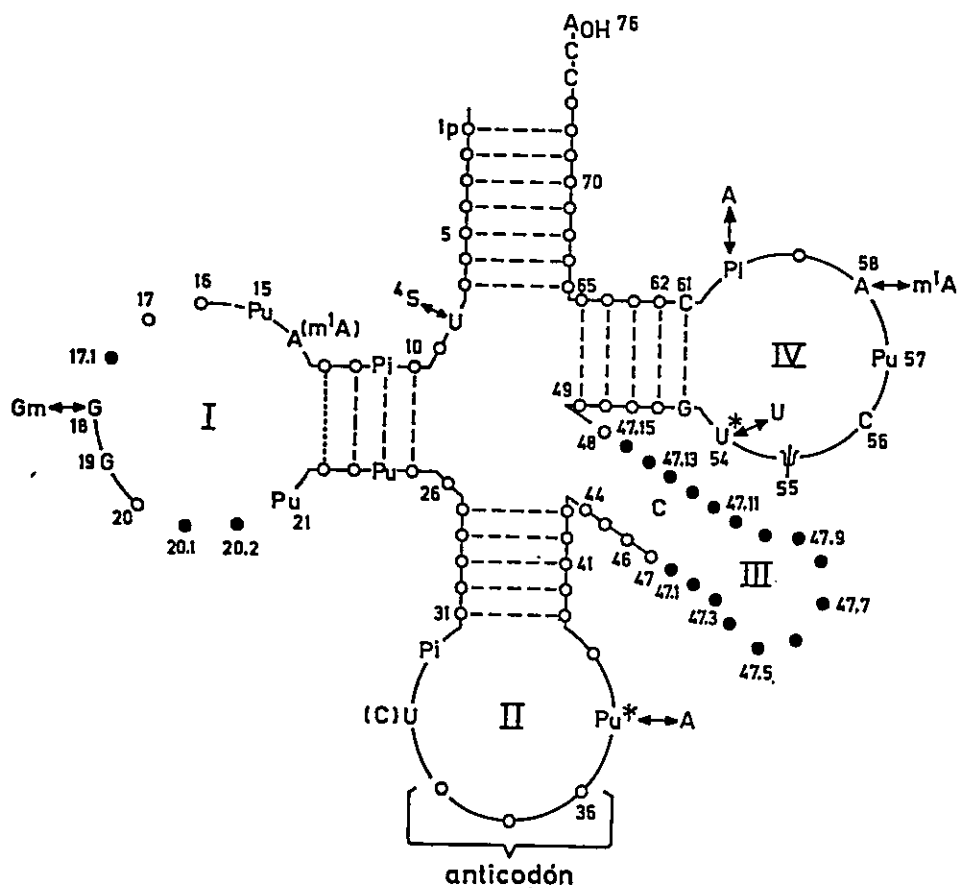


Figura 1. Estructura primaria y secundaria del tRNA y sistema de numeración de acuerdo al número de nucleótidos de tRNA fenilalanina de levadura.

El modelo en hoja de trébol contiene las características comunes a la mayoría de los tRNA, exceptuando a aquellos comprometidos en la iniciación. La posición de los nucleósidos se señala por círculos o letras; los círculos abiertos representan los residuos que están siempre presente; Pu o Pi señalan la posición de nucleósidos semi-invariables y las letras que sim-

bolizan a un residuo determinado (ver abreviaturas), indican la ubicación de los nucleósidos invariables. Los círculos llenos representan a los nucleósidos que no se encuentran en todas las secuencias de tRNA (residuos variables).

La adición de un nucleósido en un lugar determinado se indica por el número del residuo que le precede seguido de un punto y el número correlativo. Así, 47.1 y 47.2 representan al primer y segundo nucleósido que sigue a la posición 47. La posición 47 es eliminada cuando el asa variable está constituida por 4 nucleósidos (44).

La flecha entre dos nucleósidos denota que ambos nucleósidos se encuentran con frecuencia en esa posición mientras que el paréntesis refleja una situación de excepción.

A_{OH} es el extremo 3' de la molécula y el extremo 5' se considera como la posición N° 1.

Al comparar los nucleótidos de las especies de tRNA secuenciados, se encuentra que algunos ocupan siempre los mismos sitios. Aproximadamente 14 de estos residuos "invariables" están presentes en casi todos los tRNA que participan en la síntesis de proteínas (39, 43). Otros sitios están exclusivamente ocupados por purinas (Pu) o pirimidinas (Pi). Los nucleótidos allí presentes se conocen como "semiinvariables" y su número por tRNA es 8 ó 9 (39, 43).

En posición 8 a partir del extremo 5' se ubica siempre una U o s^4U . En todos los tRNA existe un apareamiento $Pi_{11} \cdot Pu$, menos en los tRNA^{Met} de procariontes involucrados en la iniciación de la síntesis proteica. Estos últimos poseen un par $Pu_{11} \cdot Pi$ ($A_{11} \cdot U$) en dicho sitio (39, 44, 50, 51). En cambio tRNA^{Met}_i de mitocondria de Neurospora crassa, presenta en esta localización un apareamiento $U \cdot A$ (52). Todos los tRNA^{Met}_i citoplasmáticos de eucariontes secuenciados, contienen en esta posición el par $C_{11} \cdot G$ (44).

Iniciando el asa de la dihidrouridina, se encuentra siempre la secuencia $A_{14} - Pu_{15}$. Le siguen las secuencias $G_{18} - G_{19}$ o $Gm_{18} - G_{19}$. Estas últimas están ausentes en una especie de S.aureus y S.epidermidis inactiva en síntesis proteica, cuya función está relacionada a la biosíntesis de la pared celular (53, 54). Esta notable clase de tRNA^{Gli} presenta además otras diferencias en sus residuos invariables y semiinvariables (39, 43). Al comienzo del asa del anticodón generalmente se ubica una Pi. Inmediatamente después del triplete que conforma el anticodón hay siempre una Pu, la que está ausente en la clase de tRNA^{Gli} involucrada en la síntesis de peptidoglican (53, 54). Es probable que esta Pu sea requerida para una adecuada interacción codón-anticodón, innecesaria en los mecanismos que se requieren para la síntesis de la pared celular. Precediendo

al anticodón, en general los tRNA tienen una U_{33} . Ello no es así en los $tRNA_i^{Met}$ de vegetales, anfibios, peces y mamíferos (39, 44).

El asa T ψ C es el que presenta la mayor diversidad de cambios en sus residuos invariables. Aun cuando la mayoría de los tRNA contienen una U_{54} modificada, seguida de $U_{55}-C_{56}$ (Fig. 1), en estas posiciones se encuentra con frecuencia las secuencias U ψ C, Tm ψ C y $s^2T\psi$ (39). Se ha detectado la presencia de $\psi\psi$ C en $tRNA^{Trp}$ de hígado de bovino y de células de pollo infectado con el virus de la mieloblastosis aviar y también en $tRNA^{Pro}$ de células de ratón infectadas con virus de leucemia murina (194). Estas especies de tRNA son partidoras de la DNA polimerasa-RNA dependiente (55, 56, 194).

Una característica excepcional de los $tRNA_i^{Met}$ provenientes de citoplasma de eucariontes, es el reemplazo de los residuos $U_{54}^* \psi$ (44) por AU o AU^* . Una diferencia adicional de estas especies respecto a la estructura común a la mayoría de los tRNA (Fig. 1), se encuentra al final de la secuencia del asa T ψ C donde un residuo A reemplaza al nucleótido seminvariante Pi_{60} (44). Sin embargo, ello ocurre también en $tRNA^{Val}$ de mamíferos (60) y $tRNA^{Ala}$ de B.mori (58). La constitución del asa de la ψ completo - $AU(U^*)CGm^1AAA$ - se ha conservado en los $tRNA_i^{Met}$ citoplasmáticos provenientes de germen de trigo, levaduras, insectos, anfibios, peces y mamíferos (44). Se ha sugerido que esta secuencia en particular, no sólo sería el elemento estructural que distingue a los $tRNA_i^{Met}$ citoplasmáticos de aquellos que participan en el alargamiento de la cadena (57), sino que además estaría implicado en el mecanismo de la reacción de iniciación de la síntesis proteica (39). Sin embargo, Sprague y col. (58) encontraron la secuencia $A_{54}\psi$ C en

tRNA^{Ala}₁ y 2 de Bombyx mori. No se sabe si este tRNA posee las propiedades funcionales de un tRNA iniciador natural. El tRNA^{Gli}₁ de S.aureus tiene en este mismo sitio la secuencia UGC (53, 54), pero ello, no llama la atención ya que su función es independiente de interacciones con mRNA y ribosomas. En cambio, sorprende el reciente hallazgo de esta secuencia UGC en mttRNA de N.crassa (52).

Al final del tallo aceptor se encuentra en todos los tRNA la secuencia CCA, también presente en posición 3' terminal en RNA virales capaces de ser aminoacilados.

En el ordenamiento de los tRNA en hoja de trébol (Fig.1), el tallo aceptor y los brazos del anticodón y T ψ C son constantes en todas las especies estudiadas. El tallo aceptor consiste de siete pares de bases y cuatro nucleótidos, incluyendo la secuencia CCA terminal con las siguientes excepciones: la presencia de 8 pares de bases en tRNA^{His} de E.coli y S.tiphimurium, especie involucrada también en la regulación de la biosíntesis de histidina y, ausencia de un par Watson y Crick entre la base 5' terminal y el residuo ubicado frente a ella. Esta última constituye una particularidad común a todos los tRNA^{Met}_i de procariontes cuya formilación es requerida para su actividad iniciadora de la síntesis proteica (39, 43, 44).

Los tallos del anticodón y T ψ C están formados por 5 pares de bases complementarias cada uno, y el asa de la ψ por 7 residuos. Las fluctuaciones en el número de nucleótidos que componen a la molécula, en el rango de 62 a 93 (44, 47) se deben a diferencias en la constitución del asa de la dihidrouridina y brazo variable.

Estructura terciaria.

Fresco y col. (61, 62), utilizando hipocromicidad como medida de estructura secundaria y los parámetros hidrodinámicos de viscosidad y sedimentación como indicadores de conformación general, estudiaron la denaturación de tRNA bajo distintas condiciones de temperatura y fuerza iónica. Observaron que el incremento de viscosidad i.e. desplegamiento, precedía significativamente a la desorganización de la estructura secundaria. Los valores de viscosidad intrínseca y coeficiente de sedimentación medidos a las más altas temperaturas eran esencialmente los mismos que aquellos obtenidos como una preparación de Poli(U) del mismo peso molecular, sugiriendo de esta manera que la molécula de tRNA se encontraba completamente desplegada. En cambio, a 20°C los valores obtenidos eran muy distintos. La viscosidad bajó a un tercio y el coeficiente de sedimentación fue de casi el doble.

El descubrimiento que los tRNA podían ser interconvertidos reversiblemente entre conformaciones funcionalmente activas e inactivas, permitió concluir que las características conformacionales requeridas por el tRNA para su función biológica dependían de la existencia de una estructura terciaria bien definida (61). Las llamadas formas nativas y denaturadas fueron extensamente estudiadas en el caso de tRNA₃^{Leu} de levadura y tRNA^{Trp} de E.coli, debido a que estas especies se estabilizan fácilmente en sus dos formas (49). La forma denaturada de tRNA podía renaturarse completamente incubando la solución a 60° por algunos minutos en presencia de Mg²⁺ y enfriándola a 25°C, temperatura del ensayo de aminoacilación (63).

Posteriormente a estos hallazgos, se utilizaron una enor-

me variedad de métodos para obtener información sobre la conformación del tRNA en solución. Entre las aproximaciones experimentales usadas para discriminar entre residuos o regiones expuestas o escondidas, se incluyen modificaciones químicas (43, 49, 64), intercambio de protones (65) como el intercambio entre C₈-H purínico y ³H₂O (66); espectroscopía de resonancia nuclear magnética que distingue protones-H unidos, no intercambiables (67); estudio de susceptibilidad de tRNA a nucleasas específicas (43, 49, 68), y unión de oligonucleótidos conocidos a tRNA para sondear regiones monocatenarias (69).

Favre y col. (70) encontraron que irradiando a 335 nm determinadas especies de tRNA de E.coli, se forma un entrecruzamiento entre los residuos ⁴sU₈ y C₁₃. La reacción no ocurre con tRNA denaturado (71) y tampoco con fragmentos de tRNA incompletos o disociados (72), lo que indica que en la conformación nativa estas bases pirimídicas deben estar a una distancia que permita la unión covalente entre ellas (70-73). Los estudios funcionales demostraron que el entrecruzamiento inducido fotoquímicamente no afecta la actividad del tRNA en síntesis proteica (74, 75). Estos hallazgos contribuyeron significativamente a perfeccionar los primeros modelos acerca de la posible estructura terciaria del tRNA (49, 64, 77).

Sin embargo, sólo a través de los estudios de difracción de rayos X de cristales de tRNA se logró un conocimiento relativamente inequívoco, acerca de la configuración espacial que el tRNA adopta y de la cual depende su actividad.

La primera estructura molecular de un tRNA, tRNA^{Fen} de levadura, que se obtuvo de mapas de densidad electrónica a nivel de resolución atómica (78, 79), hizo posible dilucidar el plegamiento de la cadena polinucleotídica acomodando las



regiones de la hoja de trébol en una estructura estable en forma de L. Con ello se logró comprender la existencia de los nucleótidos invariables y semivariables, la mayoría de los cuales están involucrados en interacciones terciarias necesarias para la estabilidad de la estructura (43, 46). La concordancia obtenida independientemente a partir de dos formas cristalinas de tRNA^{Fen}, la ortorómbica (78) y la monoclinica (79) otorgan especial validez a los resultados.

El plegamiento de la cadena polinucleotídica de tRNA^{Fen} de levadura se muestra en la Fig. 2. Los segmentos helicoidales de la hoja de trébol se preservan en su totalidad. Los tallos aceptor y TΨC están dispuestos de tal manera que forman una hélice casi continua. El tallo D y el del anticodón conforman otra región helicoidal casi continua enfrentados en ángulo recto a la primera, de manera que el asa del anticodón y el extremo 3'-CCA constituyen los polos más alejados de la molécula. Las asas TΨC y D configuran el ángulo recto de la molécula uniéndose parcialmente a través de interacciones de bases complementarias. La L tiene una extensión de aproximadamente 60 Å con un diámetro de 20 Å; siendo la distancia entre ambos extremos de más o menos 80 Å. En la molécula se distingue un orificio de 10 Å de diámetro cerca del ángulo de la L, rodeado por el asa y tallo TΨC.

Existen dos sitios de unión de magnesio hidratado en el asa D, uno en el anticodón y otro en la curvatura originada por los residuos 8-12 (46, 80). El ión Mg²⁺ estabiliza las asas y recodos de la estructura molecular para mantener su configuración funcional. De la misma manera, poliaminas como espermina contribuyen a la estabilidad de la molécula (46). Se han localizado tres posibles sitios de unión para espermina.

FIGURA 2

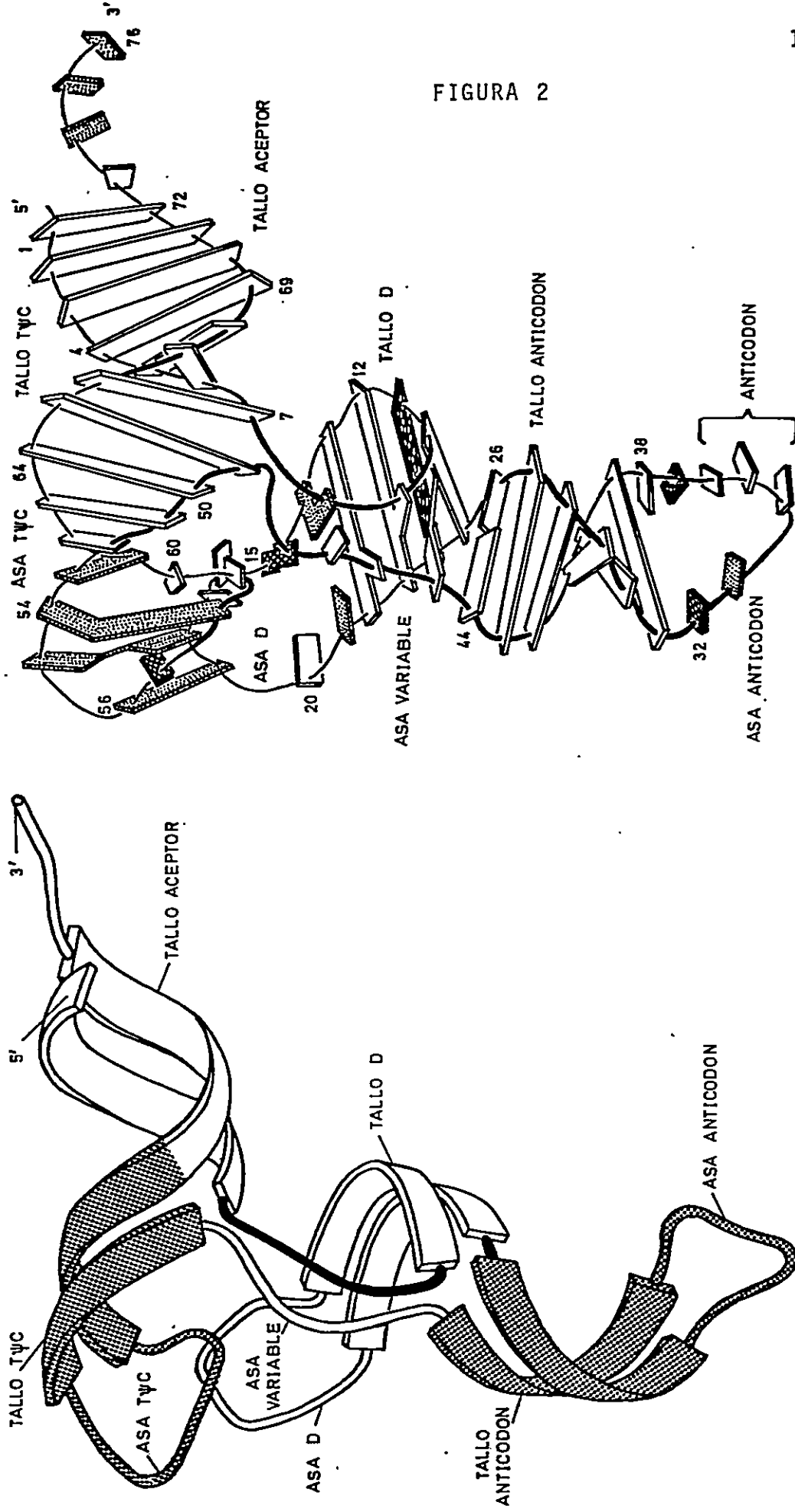


Figura 2. Estructura terciaria del tRNA.

Izquierda: los segmentos helicoidales de la molécula de tRNA que corresponden a los 4 tallos de la estructura en hoja de trébol, están representados por bandas anchas blancas y grises. Las asas están representadas por barras angostas. Las dos regiones helicoidales estructuran un ángulo recto, originando la forma L de la molécula.

Derecha: la orientación de las bases a lo largo de la cadena polinucleotídica está representada por pequeñas tablillas. Las tablillas cortas corresponden a las bases no apareadas en las regiones monocatenarias y las más largas representan los apareamientos de bases. Se observa además la presencia de interacciones terciarias cuando se aparean más de 2 bases, como también el "apilaje" de las bases que conforman las dos "verdaderas columnas" que originan el ángulo de la L. Las interacciones involucradas en el apilaje de las bases proveen una importante fuerza estabilizadora. La estructura del asa del anticodón muestra el apilaje de las bases del triplete hacia el extremo 3' de la molécula. (Adaptado de Kim (46)).

A través de los diferentes mapas de densidad electrónica de tRNA^{Fen} sólo se ha podido confirmar un solo sitio ubicado en el surco profundo de la doble hélice formada por los tallos D y del anticodón (46).

Aunque hay evidencias que apoyan la existencia de una estructura general para todas las especies de tRNA, es posible que pequeños pero a la vez significativos detalles los diferencien ya que de otra manera sería difícil comprender la gran especificidad de las diversas reacciones en que cada especie participa. Recientemente se ha examinado la estructura de $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ de levadura encontrándose una estructura similar a la de tRNA^{Fen} (81). Sin embargo, se detectan a nivel del brazo del anticodón diferencias con la estructura del cristal de tRNA^{Fen} (81, 82) requiriéndose una mayor resolución del mapa de densidad electrónica para interpretar inequívocamente el hallazgo. La estructura de tRNA^{Gly} de levadura (83) a pesar de presentar similitudes con tRNA^{Fen} exhibe una notable diferencia especialmente en el brazo aceptor. Este no forma una doble hélice completa y se encuentra más bien como dos cadenas simples ordenadas divergiendo una respecto a otra. Sin embargo, estas diferencias podrían deberse a que este tRNA fue cristalizado a temperaturas más altas en presencia de una gran concentración de solvente orgánico (83).

La estructura de tRNA^{ASP} de levadura ha revelado también interesantes diferencias (82). Se observa una apertura de la L donde la posición de los tallos y del anticodón varían su posición relativa constituyendo la forma de un boomerang (82). Se han obtenido dos estructuras levemente distintas de esta especie de tRNA a una resolución de 3,5 Å (82).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL tRNA

Síntesis de Proteínas.

La síntesis de proteínas involucra una gran variedad de interacciones entre moléculas de tRNA y de diferentes proteínas y RNA. Aunque no todas ellas pueden considerarse como inherentes al mecanismo propio de este proceso, ellas son requeridas como reacciones indispensables para la síntesis de la cadena polipeptídica y constituyen los aspectos más conocidos de la función biológica del tRNA.

Formación del aminoacil-tRNA. La aminoacilación del tRNA se realiza a través de al menos 20 aminoacil-tRNA sintetetas, de cuya alta especificidad depende la fidelidad de la ubicación del aminoácido en la posición adecuada a la información del mensaje genético. Cada una de estas enzimas reconoce como sustrato sólo a un grupo de isoformas de tRNA. La reacción requiere ATP para la activación del aminoácido y da lugar a la formación de un complejo aminoacil-adenilato-enzima con liberación de pirofosfato. El complejo ha sido aislado por filtración en gel (91). En una segunda etapa el aminoácido se transfiere al tRNA correspondiente, liberándose AMP y regenerándose la enzima libre. Se ha estudiado por métodos cinéticos el orden de entrada de los reactantes (92-95). En algunos casos se incorpora en primer lugar el ATP (92, 94, 96, 97) y en otros el tRNA (98, 99) encontrándose también varios casos en que el orden de entrada de los sustratos es al azar (100, 101). Lotfield (102) ha sostenido que la reacción de aminoacilación se lleva a cabo de manera concertada y que la formación del complejo E·aa-AMP en la ausencia de tRNA constituye

una reacción aberrante que resulta de la ausencia de uno de los sustratos naturales. Sin embargo, aun cuando pareciera que no existe un mecanismo único para la formación de cada aa-tRNA específico, se han presentado últimamente muchas evidencias que avalan el significado cinético y mecanístico del complejo E•aa-AMP (49, 95, 103).

El producto de la reacción completa, el aa-tRNA, ha sido caracterizado como un éster del aminoácido unido a través del grupo hidroxilo 2' o 3' de la ribosa de la adenosina terminal del tRNA (104, 105). En solución ambos isómeros alcanzan un rápido equilibrio. No obstante, la reacción de aminoacilación procede específicamente en la posición 2'-OH, 3'-OH o indistintamente de acuerdo a cada aminoacil tRNA sintetasa en particular (49, 106).

Durante los últimos años se han descrito diversos casos de aminoacilaciones incorrectas, las que involucran a un tRNA de un organismo y a una aminoacil tRNA sintetasa de otro (107). Las primeras heteroaminoacilaciones heterólogas que se observaron fueron las que ocurren entre la Fen-tRNA-sintetasa de Neurospora crassa y tRNA^{Val} y tRNA^{Ala} de E.coli (108, 109), encontrándose posteriormente que la misma enzima proveniente de levadura podía cargar con fenilalanina una serie de tRNA de E.coli (110, 111).

Formilación de Met-tRNA.

Marcker y Sanger (152) descubrieron que en bacterias una iso especie de Met-tRNA^{Met} era formilada por una transformilasa y que el producto N-formil-Met-tRNA_f^{Met} actuaba como iniciador de la síntesis proteica. La reacción es altamente específica. La enzima sólo reconoce a la iso especie iniciadora previamente

aminoacilada y el grupo α -amino de la metionina acepta el residuo formilo de N^{10} -formil-tetrahidrofolato (153). En células de eucariontes también existen dos especies de Met-tRNA citoplasmáticas (154). Una de ellas es la iniciadora pero no es formilada debido a que el citoplasma de células superiores no contiene transformilasa (122). Sin embargo, Met-tRNA_i^{Met} de hígado y levadura es capaz de ser formilado por la enzima de E.coli, no así Met-tRNA_i^{Met} de germen de trigo (155).

Aparentemente existiría transformilasa en mitocondrias ya que fMet-tRNA_f^{Met} actúa como iniciador en estos organelos (122).

Aun cuando se ha investigado la presencia de una secuencia específica que sea reconocida por la transformilasa, los resultados no han sido concluyentes. Si de las secuencias de reconocimiento común a la reacción de formilación se sustraen aquellas bases que se encuentran también en tRNA_m^{Met} de E.coli y tRNA_i^{Met} de germen de trigo que no son reconocidas por la enzima y además se dejan fuera los nucleótidos universales, sólo queda un conjunto de tres pares G-C en el tallo del anticodón (49). Se desconoce si esta homología pueda estar relacionada con el sitio de reconocimiento.

Reconocimiento de los factores solubles de iniciación y elongación.

La iniciación de la cadena polipeptídica comienza con la formación de un gran complejo de iniciación a nivel ribosomal, vía la subunidad 30 S en procariontes y 40 S en eucariontes (112). Para promover el primero, aparte de formil-Met-tRNA_f^{Met} o Met-tRNA_i^{Met}, mRNA (con su codón iniciador AUG) y GTP, se requieren 3 factores de iniciación (112, 114) y para el segundo, al menos 8 de estos factores proteicos (113, 115). Aun cuando

no existe completo acuerdo acerca del mecanismo de las reacciones comprometidas en este proceso, las etapas que involucran interacciones con tRNA están relativamente bien establecidas. En bacterias formil-Met-tRNA_f^{Met} es reconocido por IF-2•GTP resultando un intermediario que reconoce a otro constituido por mRNA•30S•IF-1•IF-3 (116). En células superiores, Met-tRNA_i^{Met} forma un complejo ternario con eIF-2 y GTP, el que se une a la subunidad ribosomal 40S (113).

El alargamiento de la cadena procede a partir del complejo de iniciación. La unión aa-tRNA con el factor de elongación EF-1 (EF-Tu en bacterias) es esencial para constituir el complejo ternario aa-tRNA•EF-1•GTP responsable del transporte del aa-tRNA al sitio aceptor del ribosoma (49, 117). La especificidad de la formación de este intermediario provee el mecanismo necesario para excluir tRNA deacilados o N-acil aa-tRNA (49, 118). Met-tRNA_f^{Met} no forma este complejo (119). Schulman (119, 120) demostró que regenerando el primer par de bases del tallo aceptor, por conversión de C a U, Met-tRNA_f^{Met} pasaba a ser un sustrato activo y se unía a EF-Tu. Con Met-tRNA_i^{Met} ocurre algo distinto, ya que puede interactuar débilmente con EF-1 y GTP (121) pero el complejo formado es incapaz de transferir el tRNA al ribosoma (122). De esta manera, la interacción con los factores de elongación no sólo permite que los aa-tRNA lleguen al ribosoma, sino que proveen un mecanismo adicional que otorga especificidad para que los tRNA iniciadores no sean ocupados en la incorporación de metionina en las posiciones internas, tal como fuera propuesto inicialmente por Ono y col. (123).

Interacciones tRNA-ribosoma. Se acepta generalmente la existencia de dos sitios ribosomales cuyo aporte topológico para la unión de los tRNA es fundamental (117, 124, 125, 126). Sin embargo, ocasionalmente se ha sugerido la existencia de un

tercer sitio. Lake (127) distingue un sitio R al cual se uniría el aa-tRNA como primera etapa del ciclo de la elongación. La primera evidencia acerca del rol de la secuencia común del asa T ψ C de los tRNA en la interacción con los sitios ribosomales, se originó en el laboratorio de Ofengand (59), que observó una inhibición de la unión de Fen-tRNA a los sitios A y P en presencia del pentanucleótido aislado GT ψ C_A^G. Posteriormente, Richter y col. (128) usando ribosomas de *E.coli*, demostraron que el tetranucleótido inhibía fuertemente la unión del tRNA EF-Tu-dependiente al sitio A. Aun más, localizaron el efecto observado en la subunidad 50S puesto que subunidades previamente tratadas con el tetranucleótido eran inactivas. Casi simultáneamente se encontró que T ψ CG se unía al RNA ribosomal 5S (129).

En cepas de *E.coli* restrictivas o rel A⁺, los nucleótidos ppGpp y pppGpp son esenciales para el control de la síntesis de rRNA principalmente (130). Cuando a estas cepas se les priva un aminoácido esencial, estos compuestos se acumulan y decae la producción de RNA estable (130). La síntesis de estos polifosfatos de guanósina está catalizada por un factor restrictivo asociado a los ribosomas, el que sólo se activa por la unión codón-específica de tRNA deacilado al ribosoma (131, 132). En este proceso el factor restrictivo permanece ligado al ribosoma mientras el tRNA cicla entrando y saliendo con cada molécula de ATP que se hidroliza (133). El factor restrictivo reconoce un sitio distinto al de EF-Tu en el ribosoma y su interacción con el tRNA deacilado dirige a este último al sitio A (134). Al estudiar el efecto de una serie de fragmentos de tRNA se observó que sólo el tetranucleótido T ψ CG activaba la síntesis de polifosfatos de guanósina (135), lo que aumentó las evidencias que involucran una interacción más bien directa entre el asa T ψ C y el RNA 5S en el ribosoma.

Los sitios de unión de tRNA contienen ambos, rRNA y proteínas ribosomales. Tanto las proteínas S 3, 13 y 14, y las L 2, 11, 16, 18, 24, 27, 32 y 33 entre otras, como también los RNA 16 S y 23 S, además del RNA 5 S, interactúan directamente con alguna región del aa-tRNA (ver rev. en ref. 125, 139). La existencia de los sitios de contacto y su compleja topología resulta de una malla de interacciones proteína-proteína, proteína-RNA y RNA-RNA en la que participan esencialmente todas las moléculas que conforman al ribosoma. Se ha confirmado que una región próxima al extremo 3' del RNA 16 S, rica en pirimidinas, participa directamente en la iniciación de la síntesis proteica formando varios pares Watson-Crick con una porción 5' del mRNA cercana al codón de iniciación (126, 137, 138). Otra región del RNA 16 S distinta a la descrita por Shine y Dalgarno (137, 138) también estaría participando en la estructuración de sitios ribosomales. En el laboratorio de Ofengand (125) se ha encontrado que un asa del RNA 16 S participa de alguna manera en la interacción codón-anticodón en el sitio P.

Aparentemente el sitio aceptor del centro de la peptidil transferasa en la subunidad 50 S es específico para el isómero 3'-O-aminoacil-tRNA (140-142). Para satisfacer los requerimientos estereo-específicos parece ser que a nivel del sitio A ocurre una transaminoacilación desde la posición 2' a la 3', previa a la reacción de la peptidil transferasa, ya que hay algunas evidencias que sugieren que específicamente sería el isómero 2'-O-aa-tRNA el que participaría en la unión a ribosomas dependiente de EF-Tu•GTP (49, 142), aunque EF-Tu puede aceptar inespecíficamente ambos análogos 2' o 3'-aa-tRNA (142, 151). El apareamiento codón-anticodón gatilla la hidrólisis de GTP y liberación de EF-Tu•GDP a través de un mecanismo desconocido, permitiendo que ocurra la transacilación para que el isómero 3' reactivo sea reconocido por la peptidil transfe-

rasa. Quiggle y Chládek (143) han determinado que el residuo C del extremo 3' del tRNA está comprometido en el reconocimiento requerido para la reacción de la peptidil transferasa, tanto en el sitio A como en el P.

El centro de la peptidil-transferasa está formado por las proteínas L 16, L 11 y L 2 próximas a las proteínas L 7/L 12, sitio común de unión del EF-Tu, EF-G y IF-2 (124). Una vez que la cadena polipeptídica que está alargándose se ha transferido al aa-tRNA unido al sitio A, éste se transforma en peptidil-tRNA. El peptidil-tRNA es inmediatamente reconocido por el EF-2 (6) que lo transloca consumiendo la energía que provee la hidrólisis de GTP. Después de la translocación el sitio A queda disponible para que el siguiente codón del mRNA pueda ser leído por el aa-tRNA correspondiente (117, 124).

El complejo codón-anticodón. La interacción entre el anticodón del tRNA y el codón que codifica para un aminoácido en el mRNA se origina al enfrentarse ambas estructuras en forma antiparalela, de acuerdo a las clásicas reglas de apareamiento de bases Watson-Crick. Sin embargo, la tercera base del codón introduce ciertas complicaciones. Tal como lo propuso Crick (85), el nucleótido que se ubica en el extremo 5' del anticodón puede presentar apareamientos adicionales. Así I puede reconocer a C, A o U, G a C o U y U a G o A. Recientemente, Lagerkvist (144) sugirió una interesante alternativa de lectura del mensaje genético, en la cual sólo los dos primeros nucleótidos de cada codón serían reconocidos primariamente por el anticodón. Las evidencias experimentales indican que este tipo de lectura denominada "dos de tres" (144), es utilizado in vivo y que el código genético está organizado de manera que prevenga el uso de este método de lectura en aquellas situaciones en que la fidelidad de la lectura pudiera estar comprometida.

El análisis de las especies de tRNA presentes en mitocondrias de hongos, anfibios y mamíferos (87) ha evidenciado que en estos organelos existe un número inferior a 32 especies de tRNA, cantidad mínima que se requiere para reconocer todos los tripletes del código utilizando el mecanismo propuesto por Crick (85). Examinando las secuencias de los anticodones correspondientes a los mttRNA para ala, leu₁, leu₂, tre, trp, glu y val de N.crassa, el grupo de RajBhandary (87) encontró que las especies ala, leu₂, tre y val, aminoácidos que corresponden a familias del código que agrupan cuatro codones (GCN, CUN, ACN y GUN, respectivamente) contienen en la primera posición del anticodón una U inalterada. En cambio, las especies de tRNA para glu, leu₁ y trp, aminoácidos que utilizan codones que terminan en purinas (GA_G^A, UU_G^A y UG_G^A, respectivamente), contienen una U* (modificada) en la misma posición del anticodón. De todas las secuencias de tRNA citoplasmáticas publicadas (44) y que contienen U en la posición "oscilante", sólo en tRNA^{leu}_{UAG} de levadura ésta no se encuentra modificada (44, 88). Este tRNA es bastante singular ya que puede reconocer los seis tripletes que codifican para leucina. Simultáneamente a los hallazgos sobre mttRNA de N.crassa, Barrel y col. (88) describieron características similares en mitocondrias humanas y lo mismo el laboratorio de Tzagoloff (86) en mitocondrias de levadura. Aunque todos estos resultados son muy recientes, parecen indicar con bastante certeza que todos los mttRNA que poseen una U sin modificar en la primera posición del anticodón corresponden a las familias del código que agrupan cuatro tripletes por aminoácido, las que serían reconocidas por el mecanismo "dos de tres" (144). Las familias de codones mezcladas i.e. la tercera posición determina la naturaleza del aminoácido que codifica, estarían siendo reconocidas por tRNA que contienen U* en posición "oscilante" siguiendo

en general las reglas descritas por Crick (85). Así, bastaría un mínimo de 24 especies de tRNA para descifrar el código genético completo, número que coincide con las especies encontradas en mitocondrias (86-88). En estas últimas, la "universalidad" del código se encuentra quebrantada. En efecto, el triplete sin sentido UGA, codifica para $\text{mttRNA}^{\text{Trp}}$ (87, 145) y al menos en el organelo humano parece ser que aparte de AUG, AUA codificaría también para metionina (145).

En el reconocimiento codón-anticodón, el tRNA no juega un rol pasivo. El asa del anticodón podría pasar de la conformación debida al apilaje de bases en su extremo 3' (43, 46) a una constituida por apilaje en el extremo 5', transición sugerida inicialmente por Fuller y Hodgson (147). En efecto, observando el proceso de relajación en tRNA^{Fen} se han encontrado resultados consistentes con una conversión entre las configuraciones con nucleótidos apilados en el extremo 3' del anticodón al 5' (148). Muy recientemente, Labuda y Porschke (146) han puesto en evidencia un mecanismo de varias etapas en la interacción codón-anticodón. Una de ellas involucra el cambio conformacional debido a la transición del apilaje desde el extremo 3' del anticodón al 5'. El otro cambio estructural estaría dado por el desplazamiento del asa T ψ C. Finalmente, durante el proceso se formarían dímeros de tRNA (146).

Se sabe que la afinidad del complejo codón-anticodón está influida entre otros por la configuración que otorgan las fuerzas del apilaje de las bases adyacentes al anticodón y por los nucleótidos modificados próximos al extremo 3' (149). Aun más, se ha establecido que el contexto en que se encuentra el codón, i.e. secuencias vecinas, afecta la eficiencia de la traducción (150).

El tRNA como regulador. Aunque la participación de tRNA en procesos regulatorios ha sido muy discutida, se puede ya afir-

mar que ésta existe, entre otras probablemente a nivel de la síntesis proteica. Tales regulaciones pueden involucrar a un tRNA específico como tRNA^{His} en la represión de la biosíntesis de histidina en E.coli y Salmonella typhimurium (156). Allende (157) ha indicado que las proteínas capaces de reconocer estructuras de tRNA no sólo estarían involucradas en las diversas etapas del proceso de traducción, sino que también en la transcripción (y replicación) de ácidos nucleicos. Existen evidencias que demuestran que aa-tRNA (y aa-tRNA-sintetasas) pueden participar en la regulación de varios operones responsables de la biosíntesis de aminoácidos en organismos procaríóticos y eucarióticos (158).

La función del tRNA en la supresión de mutaciones sin sentido es bien conocida (159). La secuencia de tRNA_{SuIII}^{UAG}^{Tir} exhibe una diferencia a nivel del anticodón que resulta a su vez de una mutación del gen para tRNA^{Tir}, capacitándolo para que reconozca el codón ambar en reemplazo de los tripletes normales para tirosina (160). No todos los tRNA supresores de mutaciones sin sentido tienen modificaciones en el anticodón. Comparando la estructura primaria de tRNA_{Su}^{UGA}^{Trp} con la de la especie Su^{-UGA}^{Trp} se encuentra que la alteración está presente en la base 24 del tallo de la dihidrouridina, donde en vez de G se encuentra A (44, 161). Otras supresiones mediadas por tRNA incluyen aquellas en las que tRNA puede insertar el aminoácido correcto frente a un codón mutado (supresión de error) y las supresiones extragénicas de mutaciones que producen desplazamiento de fase de los tripletes que conforman el mensaje genético (158, 162).

Ames y Hartman (163) basado en el conocimiento existente acerca de la degeneración del código genético, postularon en 1963 que los niveles intracelulares y las especies de tRNA presentes eran importantes en la determinación de la velocidad de

síntesis y tipo de proteína que se sintetizaba (hipótesis de la modulación). Cambios en los niveles de especies isoceptoras de tRNA han sido observadas en numerosos organismos en relación a su estado fisiológico y de desarrollo. Entre éstos se encuentran variadas condiciones de crecimiento de microorganismos (cultivos), embriogénesis y diferenciación, acción de hormonas, carcinogénesis, envejecimiento e infección viral (rev. en ref. 162, 165, 166).

Osterman (166) distingue dos grupos de fenómenos involucrados en los cambios de la proporción de especies de tRNA que ocurren concomitantemente con cambios en la síntesis de proteínas. El primero se refiere al fenómeno que comprende un nuevo estado de la síntesis proteica, programado genéticamente en la célula, con una población de moléculas de tRNA necesarias para su realización (proporción adecuada de tRNA isoceptores). El segundo grupo incluye la transformación de la familia de moléculas de tRNA competentes en la célula, inducida por cambios en su medio ambiente. Estos últimos también podrían estar programados pero a nivel del organismo, e.g. desarrollo; alternativamente podrían deberse a efectos no predeterminados como estado nutricional, infección viral, etc. Los cambios endógenos del primer grupo dan lugar a la "adaptación" de una familia de tRNA. Los procesos del segundo grupo resultantes más bien de efectos externos (transporte de ciertos metabolitos, hormonas o partículas virales, etc.), deberían considerarse como función "regulatoria" de la síntesis proteica (166).

El concepto de adaptación funcional fue elaborado previamente por Garel (167), quien examinó una serie de organismos en que se pudo demostrar que la especialización de la población de moléculas de tRNA, aseguraba la máxima eficiencia de la síntesis proteica. Mucho antes, Stent (164) había indicado que la modulación de la traducción se alcanzaría de mejor manera utili-

zando secuencias del mRNA mayores que el codón. Sin mencionarlo directamente, Osterman (166) basándose en consideraciones relativas a la interacción codón-anticodón y tRNA-ribosoma enriquece el concepto original de Ames y Hartman (163) con el planteamiento de Stent (164) y desarrolla su "hipótesis de la preselección". En el hecho, ella incorpora las variables que otorgan una visión más integrada de las posibles interacciones entre distintos aspectos configuracionales de las moléculas de tRNA y el mRNA en el ribosoma.

Los resultados de varios estudios indican que el reconocimiento de un codón está influido por secuencias vecinas en el mRNA (150). Este efecto del contexto del codón sobre la traducción ha sido evidenciado directamente, demostrándose que el nucleótido adyacente al extremo 3' del codón de iniciación AUG (168), del codón de terminación UAG (150) y muy recientemente UGA (169) juega un papel determinante en la eficiencia de la traducción.

Metabolismo del RNA.

Además de la función que cumple el tRNA en la síntesis proteica, éste presenta una serie de actividades que pueden relacionarse convenientemente al metabolismo del RNA.

Estudios acerca de la biosíntesis de tRNA han establecido que se requieren varias etapas de procesamiento para producir el tRNA maduro. En procariontes, la obtención de este último involucra el procesamiento del producto de transcripción primario a nivel de sus extremos 5' y 3', además de la modificación de diversos nucleótidos (rev. ref. 170). En eucariontes a menudo se necesita una etapa adicional debido a la existencia de secuencias intercaladas en una serie de genes de tRNA (171), existiendo evidencias que sugieren que la remoción de

las secuencias intercaladas contenidas en moléculas precursoras de tRNA, se realiza con posterioridad a los procesos nucleolíticos 5' y 3' y que la mayor parte del procesamiento ocurre en el núcleo (170, 172 y ref. citadas en la última).

Reconocimiento de moléculas precursoras de tRNA durante su procesamiento. La remoción de los nucleótidos adyacentes al extremo 5' que permiten obtener el fósforo 5' en la ubicación que caracteriza el principio de la estructura primaria de todos los tRNA maduros, está mediada por una endoribonucleasa, la RNAasa P (170). Esta enzima fue descubierta por Altman y Smith (173), quienes al incubar el precursor de tRNA₁^{Tir} con un extracto crudo de E.coli, hallaron que un fragmento de 41 nucleótidos adicionales ubicados en el extremo 5' del tRNA maduro, era escindido de este último. Ribonucleasa P rompe uniones fosfodiester dando lugar a grupos 3'OH y 5'fosfato y siempre produce la ruptura correspondiente en el lugar exacto requerido por el precursor para generar el extremo 5' correcto del tRNA maduro, debiendo reconocer para ello aspectos de la estructura terciaria del precursor (170, 174). El precursor a nivel de la secuencia que corresponde al tRNA maduro, adopta una conformación similar a la de este último (170). Aun cuando parece ser que RNAasa P es la enzima responsable de generar los extremos 5' P correctos para todos los tRNA, provengan de precursores monocistrónicos o policistrónicos, se ha identificado otra endoribonucleasa que produce clivaje en precursores policistrónicos en mutantes que permiten obtener extractos con RNAasa P inactivada. Esta enzima descrita independientemente por dos laboratorios, se hallado RNAasa O o P₂ (175, 176).

Un aspecto particular se halla en la biosíntesis de tRNA^{Gln} de T4 donde es esencial la acción de RNAasa III, una enzima que procesa precursores de rRNA (177). Recientemente se ha encon-

trado una actividad endonucleásica que parte productos de transcripción primarios del gen agrupado de tRNA de T4, existiendo evidencias que indican que la participación de esta enzima precedería a la acción de RNAasa P (178).

De especial y muy actual interés es la dilucidación del mecanismo a través del cual se remueven las secuencias intercaladas de los pre-tRNA de organismos superiores. Existen evidencias que indican que el procesamiento que permite "editar" un tRNA maduro procedería in vitro en dos etapas (172a). La primera, en una reacción independiente de ATP remueve la secuencia intercalada y produce dos mitades de tRNA, quedando la mitad 5' con un extremo 3'-P y la otra 5'OH, lo que constituye una característica única entre las endonucleasas involucradas en la biosíntesis de RNA. En una segunda etapa, una ligasa cuyo mecanismo también parece ser muy particular, une los extremos 3'-P y 5'-OH formando el enlace fosfodiéster correspondiente.

Aparte de la necesidad de endonucleasas, el procesamiento de moléculas de pre-tRNA requiere exoribonucleasas para podar los nucleótidos del extremo 3' del precursor. Se han encontrado varias exonucleasas en E.coli incluyendo RNAasa II una exonucleasa 3' → 5' (170), la que podría ser responsable del "podaje" requerido por los pre-tRNA en su extremo 3'. También se han descrito otras exonucleasas con actividades compatibles a la anterior. Estas enzimas presentan especificidad por el precursor, reconociendo estructuras de la región correspondiente a tRNA. En efecto, varias mutaciones ubicadas en el asa TΨG de tRNA^{Ser} de T4 bloquean el procesamiento por las 3'-exonucleasas (170).

tRNA-nucleotidiltransferasa. Una de las enzimas que interactúa con tRNA es la CTP(ATP)-tRNA nucleotidiltransferasa, que cataliza la incorporación de residuos C y A al extremo 3' terminal de moléculas de tRNA que han perdido parcial o totalmen-

te la secuencia 3' CCA característica a todas ellas (179). Aunque la función fisiológica de esta enzima se desconoce, parece ser que está involucrada en la reparación de tRNA, el que se encuentra sometido a procesos de recambio, al menos de su A 3' terminal (179, 180). Su importancia está implícita en el hecho que se haya detectado en todos los organismos tanto procariontes como eucariontes, y en los últimos en ambos, citoplasma y matriz mitocondrial (179-182). Se sabe que el reconocimiento de la tRNA-nucleotidiltransferasa por el tRNA es bastante inespecífico, habiéndose encontrado reconocimiento adecuado incluso frente a trozos de la molécula de tRNA previamente disectada (179). Sin embargo, cierto aspecto configuracional tiene relevancia por cuanto tRNA^{Leu} denaturado no es aceptor de AMP (183).

La biosíntesis de los tRNA codificados por el fago T4 específicos para prolina y serina, procede a través de un precursor que contiene ambas secuencias. Sin embargo, ninguna de ellas contiene la secuencia 3'CCA. Schmidt (184) demostró que al menos en este caso tRNA nucleotidil transferasa participa en la síntesis de tRNA maduro incorporando correctamente la secuencia CCA en el extremo 3' tRNA^{Ser} del precursor Pro-Ser-tRNA precediendo a la acción de RNAasa P.

Modificación de bases del tRNA. Fuera de las actividades enzimáticas que permiten el procesamiento de los productos de transcripción de genes de tRNA y de la incorporación de CCA en el extremo 3' de algunos precursores que carecen de él, la maduración de la molécula de tRNA requiere de la modificación enzimática de ciertos nucleósidos para originar los llamados nucleósidos (o bases) modificados, "raros" o "menores". Se ha establecido que estos últimos se forman preferentemente a nivel de los distintos pre-tRNA (48, 49, 162, 185), pero se

desconoce el orden de la secuencia de las reacciones (48, 49). Entre las enzimas más estudiadas están las tRNA metil transferasas, las que en la mayoría de los casos incorporan el grupo metilo utilizando S-adenosil metionina (48, 49, 162, 193). Las tRNA metil transferasas no sólo son específicas para determinados residuos, sino que además reconocen las secuencias inmediatamente vecinas a la base que modifican, debiéndose encontrar éstas en la ubicación correcta de la región del tRNA (48, 49). Aparentemente la acción enzimática de estas metil transferasas se encuentra influida por la estructura terciaria del sustrato. Solari y Allende (193) estudiando tRNA metil transferasas de núcleos y citoplasma de oocitos de Xenopus laevis, observaron una significativa diferencia en la respuesta de estas dos enzimas frente a espermina y Mg^{2+} . Ya que ambas enzimas actúan en distintos compartimientos podría pensarse que su especificidad está relacionada a la naturaleza estructural de los sustratos en ellos.

No todas las modificaciones de las bases del tRNA consisten en reacciones que convierten un nucleósido "normal" en uno "alterado", Recientemente se han encontrado enzimas que reemplazan una base modificada por una normal (48, 49). Se ha detectado una enzima que cataliza la incorporación de G en determinados tRNA, pudiendo esta reacción de guanilación reemplazar la base menor Q de tRNA sin romper la cadena polinucleotídica (186). Así, a través de esta reacción muy particular, una base rara se convierte en una normal.

Peptidil-tRNA hidrolasa. Esta enzima que se encuentra en bacterias y organismos superiores, hidroliza la unión ester entre un péptido (o residuo aminoacilo cuyo grupo NH_2 está sustituido) y el grupo 2' o 3'OH de la ribosa 3' terminal de tRNA (187, rev. en ref. 188). La actividad enzimática presenta baja especificidad por el sustrato, ya que no discrimina sobre el tipo

de péptido o residuo N-aminoacilo esterificado al tRNA y tampoco acerca de la naturaleza de este último (ref. citadas en ref. 189). Ni los aa-tRNA ni formil-Met-tRNA_i^{Met} son hidrolizados por esta enzima (190). Sin embargo, este último es atacado en forma singular por la hidrolasa proveniente de hígado de rata (191).

Schulman (192) ha demostrado que N-formil-Met-tRNA_f^{Met} de bacterias evita la actividad de esta hidrolasa dada la particularidad estructural que le otorga la falta del primer par de bases del tallo aceptor. Al regenerar este apareamiento por conversión química de C a U, fMet-tRNA_f^{Met} se constituye en un eficiente sustrato de la enzima (120).

La función biológica de la enzima es poco conocida, pero se estima que debe estar relacionada al catabolismo de los péptidos que se liberan como peptidil-tRNA incompletos durante la síntesis de proteínas.

El tRNA en la biogénesis de los virus. Se conocen dos especies de tRNA que actúan como "partidores" de la DNA polimerasa RNA dependiente (transcriptasa inversa) de los virus RNA tumorales. Ellos son tRNA^{Trp} en el virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y tRNA^{Pro} en el virus Moloney de la leucemia murina (55, 56, rev. en ref. 194, 195). La característica más peculiar de ambos tRNA es la presencia de la secuencia G-Ψ-Ψ-C que reemplaza a G-U^{*}-Ψ-C en el asa TΨC (194). Hasta ahora se desconoce la implicancia de esta secuencia en el reconocimiento con la transcriptasa inversa. Sin embargo, a pesar que la función "partidora" del tRNA ha sido una de las últimas actividades que se le descubriera a esta macromolécula tan polifuncional, la información existente acerca de las interacciones involucradas, es sorprendentemente amplia. En efecto, se sabe que el tRNA partidador forma un complejo con el DNA y que excluyendo la

A 3' terminal, una secuencia de 16 nucleótidos del extremo 3' del tRNA está comprometida en la interacción (196). Aparte de la unión del partidador a DNA, este es reconocido específicamente por la transcriptasa inversa. Se ha confirmado que la afinidad de la enzima del AMV por tRNA^{Trp} es alta. Araya y Litvak (197) han examinado en bastante detalle esta interacción, determinando las regiones del partidador que se unen covalentemente a la enzima del AMV después de irradiación con U.V., concluyendo que las subunidades α y β de la enzima se encuentran interconectadas por el tRNA y que tanto la región del anticodón como el extremo CCA interactúan fuertemente con la enzima (197, 198). La transcriptasa inversa de AMV reacciona con el tRNA^{Trp} partidador previamente oxidado con IO_4^- formando una base de Schiff entre el $\epsilon\text{-NH}_2$ de una lisina comprometida en el centro activo y el derivado dialdehído de la ribosa 3' terminal del tRNA (200). También se ha demostrado que la misma enzima desenrolla el tallo aceptor del partidador facilitando su ubicación sobre el genoma viral (199).

Estructuras tipo tRNA en RNA virales. Un apreciable número de RNA virales, la mayoría de plantas, posee la capacidad de esterificarse con aminoácidos en reacciones catalizadas por las aa-tRNA sintetasas correspondientes. En particular el RNA del virus del mosaico del nabo amarillo (TYMV) acepta valina en su extremo 3' (201) mientras que el del virus del mosaico del tabaco (TMV) se carga con histidina (202). Se ha demostrado que TYMV además de aminoacilarse puede ser usado como sustrato de la tRNA nucleotidiltransferasa y de la peptidil tRNA hidrolasa, partido por una enzima comparable a la RNAasa P y que el RNA aminoacilado puede formar el complejo ternario con GTP y EF-1 de germen de trigo y aportar su valina en un sistema de síntesis proteica (201, 203-208).

La estructura secundaria del RNA de TYMV se asemeja bastante a la del tRNA (207), no así la del RNA del TMV (209).

Prochiantz y col. (210) encontraron que fragmentos de RNA de bacteriófagos como R17, MS2 y Q β eran sustratos adecuados de tRNA nucleotidil-transferasa de E.coli, sugiriendo que los genomas virales examinados poseen ciertas características presentes en los tRNA. Dado que aa-RNA virales pueden formar complejo ternario con GTP y EF-Tu, siendo este último un componente de la enzima Q β replicasa (211) se ha pensado en implicar estos hallazgos con la replicación viral.

El tRNA en otros procesos bioquímicos.

A través de reacciones catalizadas por un grupo de enzimas conocidas como aminoacil-tRNA transferasas, ciertos aa-tRNA pueden transferir el residuo aminoacilo a moléculasceptoras específicas prescindiendo de los ribosomas. Así los tRNA participan como agentes aminoacilantes en modificaciones enzimáticas de proteínas (212), incorporando arginina, leucina, o fenilalanina al extremo N-terminal de algunas proteínas e.g. arginina a proteínas de la membrana del fantasma del eritrocito (213) y proteínas de la cromatina (214).

La biogénesis de la pared celular requiere Gln-tRNA y Ser-tRNA para la formación de los puentes interpeptídicos en la síntesis de peptidoglican (53, 54, 215). Sin embargo, tal como se ha observado en estafilococos, sólo glicina es incorporada a través de una isoespecie particular de tRNA^{Gly} inactiva en síntesis proteica (54), probablemente para asegurar así, el suministro adecuado del aminoácido que se requiere en gran cantidad en la síntesis de peptidoglicanes (49).

Aparte de las aminoacil-tRNA proteína transferasas se han

descrito otras enzimas que utilizan aa-tRNA. Esto ocurre en la biosíntesis de aminoácil fosfatidil glicerol (217, 218) y en la modificación de lipopolisacáridos (219).

Finalmente, entre las múltiples actividades del tRNA, se le ha situado como inhibidor de ciertas enzimas. Específicamente se ha demostrado que tRNA inhibe fuertemente a la endonucleasa I de E.coli (220). Complejos de endonucleasa I-tRNA presentan una actividad distinta a la enzima sola (221) ya que aunque en forma limitada rompen DNA a través de una reacción de corte simple de una de sus cadenas ("nick"). Se ha detectado además una iso especie de tRNA^{Tir} que deacilada, inhibe en Drosophila a la enzima triptófano pirrolasa involucrada en la síntesis de pigmentos (222).

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA PRESENTE TESIS

En el presente trabajo se investigan tres aspectos que contribuyen al conocimiento de la estructura y función del tRNA. Se desarrolla un nuevo procedimiento para purificar algunas especies de tRNA, se examina la naturaleza del reconocimiento específico entre una enzima y el tRNA, y se estudia la función de esta macromolécula durante diferenciación celular, desarrollo y adaptación al medio ambiente.

Purificación de tRNA específicos mediante heteroaminoacilación heteróloga.

Se sabe que la esterificación de un aminoácido aromático a su tRNA correspondiente lleva al tRNA a unirse más fuertemente a la BD-celulosa (31) propiedad que ha sido usada para purificar tRNA^{Tir}, tRNA^{Trp} y tRNA^{Fen} de levadura (229). Gillam y col. (230) desarrollaron un método muy general para aislar especies de tRNA que no son esterificadas por un aminoácido aromático. El procedimiento involucra la aminoacilación del tRNA, una fenoxiacetilación química que le otorga hidrofobicidad al residuo aminoácido y el aislamiento del material modificado por una columna de BD-celulosa. Por este

método se han purificado entre otros tRNA^{Met} , $\text{tRNA}_F^{\text{Met}}$ (30), tRNA^{Val} (32), todos de E.coli, tRNA^{Asp} , tRNA^{Arg} (230) y $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ (231), los últimos de levadura.

Se ha establecido que ciertas enzimas provenientes de un organismo pueden aminoacilar erróneamente a un tRNA proveniente de otro organismo (107). Sabiendo que la fenilalanil-tRNA sintetasa tanto de levadura como de N.crassa cataliza la incorporación de fenilalanina a varios tRNA de E.coli (107-111) postulamos que la heteroaminoacilación heteróloga podría ser utilizada como una alternativa muy ventajosa en la purificación de tRNA específicos de E.coli. Por ello se examinó el comportamiento cromatográfico de tRNA^{Val} de E.coli en BD-celulosa y el efecto que la incorporación del aminoácido aromático tenía sobre éste.

Como se describe en el capítulo primero, a partir del planteamiento básico se pudo aislar $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ altamente purificados.

N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa. Sitio de reconocimiento del sustrato.

Aparte de la peptidil-tRNA hidrolasa (187-198), en los últimos años se descubrió otro tipo de hidrolasa (224, 225). Esta enzima, la N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa, hidroliza N-AcFen-tRNA a N-AcFen y tRNA. La enzima se ha encontrado en levadura y Artemia salina (225, 232).

A objeto de determinar si el sitio de reconocimiento de la enzima reside en el tRNA o en el residuo N-Acetilfenilalanil, hemos aislado N-AcFen-tRNA hidrolasa del híbrido Saccharomyces fragilis x Saccharomyces dobzhanskii y hemos estudiado su especificidad con distintos sustratos. Experimentos en que usamos N-AcFen-tRNA^{Fen} de levadura, N-AcFen-tRNA^{Fen}

de E.coli y N-AcFen-tRNA₁^{Val} de E.coli, preparado este último por heteroaminoacilación heteróloga con Fen-tRNA sintetasa de Neurospora crassa, demuestran que todos ellos son sustratos adecuados de la enzima. Los resultados que se describen en el capítulo segundo, sugieren que el residuo N-Acetilfenilalanil sería determinante en la acción catalítica e indicaría que la especificidad de la enzima no tendría un requerimiento estricto por un tRNA específico.

Modulación de la población de tRNA.

Está bien establecido que en la región posterior de la glándula del gusano de seda Bombyx mori, se sintetiza durante los últimos días del quinto estadio larval, una proteína en particular, la fibroína de la seda. La estructura primaria de esta proteína la forman básicamente glicina, alanina, serina y tirosina. Los dos primeros aminoácidos constituyen casi tres cuartos de la molécula (233, 234).

Experimentos realizados por Susuki y col. (235) indican que los genes de la fibroína no se amplifican durante la poliploidización de las células y que se replican en proporción al DNA. Existe probablemente sólo un gen de fibroína por complemento haploide de DNA (235, 236). Ello sugiere que la gran cantidad de fibroína que se sintetiza en un momento determinado puede ser el resultado de una rápida traducción del mRNA pre-existente.

Se han examinado los cambios que sufre la población de tRNA durante los distintos procesos fisiológicos de la glándula i.e. desarrollo y síntesis de fibroína (167, 238), encontrándose alteraciones cuantitativas en los niveles intracelulares de algunos aa-tRNA. Las especies más afectadas están asociadas a la síntesis de fibroína (238). Sin embargo,

aunque metionina no se encuentra en la estructura de la fibroína, el aa-tRNA correspondiente se haya aumentado durante la diferenciación terminal de la región posterior de la glándula.

Nuestra hipótesis de trabajo postulaba que el incremento del nivel in vivo de Met-tRNA durante la etapa de síntesis de fibroína (238, 240) se debería a un incremento selectivo de la iso especie comprometida en la iniciación. Para dilucidar este aspecto se estudió la naturaleza de la especie de Met-tRNA que aumenta su nivel.

Los resultados que se presentan en el capítulo tercero, identifican una iso especie de tRNA^{Met} que exhibe propiedades similares a las de algunos tRNA^{Met}_i de eucariontes, como la especie que selectivamente se encuentra en mayor concentración en la segunda etapa del quinto estadio larval.

Otros aspectos del capítulo tercero consideran la especialización de algunos tRNA en relación a la naturaleza de la proteína que se sintetiza en un momento dado, y, a la compartimentalización biológica estructural, asociada a la diferenciación funcional. En particular, se estudian las especies isoceptoras de tRNA^{Ala} tanto de la región posterior como de la región media de la glándula del gusano de seda y se demuestra que durante el estado de secreción de fibroína en el quinto estadio larval, existe una especie de tRNA^{Ala} que estando presente en una región no lo está en otra. La especie de tRNA^{Ala} presente en la región posterior contribuye a obtener la máxima eficiencia de la síntesis proteica en el compartimiento morfo-funcional que se estudió (58, 150, 166, 167, 237, 240).

Finalmente, en el capítulo tercero se describen otros aspectos del tRNA relativos a su participación en procesos regulatorios.

Los poiquiloterms euritermales están sometidos a variaciones estacionales de temperatura, frente a las cuales deben enfrentarse en forma adecuada con respuestas compensatorias que aseguren su supervivencia. La síntesis de proteínas ha sido asociada al proceso de aclimatación (rev. en ref. 241). En nuestro laboratorio se han estudiado algunas características celulares y funcionales de hepatocitos del pez Cyprinus carpio aclimatado naturalmente a temperaturas de verano. Este pez, provee de un sistema muy atractivo para determinar la naturaleza de los cambios involucrados en la adaptación termal (241-244), y fue elegido para examinar el posible rol que el tRNA puede tener en la naturaleza de la respuesta adaptativa, i.e. participar en la modulación de la síntesis macromolecular. Al estudiar el contenido in vivo de determinados aminoacil-tRNA, precursores inmediatos de la síntesis de proteínas, se observaron profundas variaciones en los hígados de carpas de verano y de invierno. El contenido de las primeras fue notoriamente más bajo, lo que demuestra que el tRNA estaría implicado en los mecanismos comprometidos en la respuesta compensatoria a los cambios que la aclimatación involucra.

MATERIALES Y METODOS

METODOS.

Cultivo de microorganismos.

A objeto de obtener los organismos requeridos para las preparaciones de enzimas que se han detallado donde corresponde, se procedió a cultivar E.coli de acuerdo al procedimiento descrito por Bolle y col. (254), N.crassa como lo hiciera Eppler (255) y el híbrido S.fragilis x S.dobzhanskii utilizando el sistema usado por Bretthauer y col. (256). Aislada la biomasa, ésta fue procesada de inmediato o se guardó a -70° .

Fraccionamiento de tRNA en columnas de BD-celulosa.

El fraccionamiento de tRNA en columnas de BD-celulosa, se efectuó esencialmente como lo describe Gillam y col. (31, 230), eluyendo con la solución que se indica en cada caso. Todas las cromatografías se efectuaron a 4° .

Preparación de aminoacil-tRNA sintetasas.

La preparación cruda de aminoacil-tRNA sintetasas de E.coli se obtuvo siguiendo el procedimiento de Muench y Berg (249) y la de levadura de panadería de acuerdo al método de Cherayil y col. (250). La preparación de sintetasas de glándula de B.mori de acuerdo a lo indicado por Araya y col. (240) y la de hígado de C.carpio como lo señala Zuvic y col.

(244).

La preparación de una fracción parcialmente purificada de Fen-tRNA sintetasa de N.crassa, se efectuó siguiendo el procedimiento descrito en el artículo de Barnett (252).

Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de E.coli con aminoacil-tRNA sintetasa de E.coli.

La mezcla de reacción patrón (246, 247) contenía en 0,1 ml, tampón 3,3-dimetilglutarato de potasio 100 mM, pH 7,0, acetato de magnesio 10 mM, KCl 10 mM, ATP 2 mM, [^{14}C] o [^3H] aminoácidos 0,02 mM, tRNA de E.coli y una preparación de sintetasa de E.coli. Alternativamente la mezcla estaba compuesta por Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, KCl 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, ATP 2 mM, [^{14}C] o [^3H] aminoácidos 0,02 mM, tRNA de E.coli y sintetasa de E.coli, los últimos siempre en concentraciones que permitieran una aminoacilación completa. Las mezclas fueron incubadas a 37° por 30 min. Las reacciones se detuvieron y se procesaron como se detalla más adelante.

Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de E.coli con Fen-tRNA-sintetasa de N.crassa.

El ensayo patrón de la heteroaminoacilación heteróloga se efectuó esencialmente como lo describió Strickland y Jacobson (248) en mezclas de reacción de 0,1 ml compuestas por tampón cacodilato de potasio 50 mM, pH 6,3, acetato de magnesio 7,5 mM, ATP 0,5 mM ($\text{Mg}^{2+}/\text{ATP} = 15$), [^{14}C]Fen 0,025 mM, tRNA de E.coli y cantidad saturante de una preparación parcialmente purificada de Fen-tRNA-sintetasa de N.crassa. Las

mezclas fueron incubadas a 22° por 30 min. Dentro de este período todas las reacciones fueron completas. Las reacciones se detuvieron y procesaron como se describe más adelante.

Aislamiento de tRNA de B.mori.

Se usó el procedimiento descrito por Chen y Siddiqui (245). Para extraer el tRNA las glándulas (región media o posterior) fueron homogenizadas con un homogeneizador de vidrio y teflón en la solución de extracción compuesta de Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6, MgSO₄ 0,01 M, NaCl 0,01 M, dodecil-sulfato de sodio 0,5%. Al homogeneizado se le agregó un volumen de fenol saturado con la solución de extracción y se volvió a homogeneizar. Posteriormente se agitó la suspensión por 20 min y después se centrifugó a baja velocidad para separar la fase acuosa. La capa fenólica y la interfase fueron lavadas dos veces con la solución de extracción y el RNA contenido en la fase acuosa fue recuperado por precipitación con etanol frío. Después de disolverlo, el RNA de alto peso molecular fue removido a través de una cromatografía en DEAE-celulosa, como lo describe Yang y Novelli (251).

Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de glándula de B.mori con sintetasa de B.mori.

El ensayo tanto de metionina como de alanina se efectuó de acuerdo a Weiss y col. (26) en 0,1 ml de mezcla patrón que contenía tampón Hepes 100 mM, pH 8,0, acetato de magnesio 10 mM, KCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, ATP 4 mM, [³H]

o [^{14}C]aminoácido 0,02 mM, tRNA de la región media o posterior de la glándula del gusano de seda y sintetetasas del mismo origen, de acuerdo a lo que correspondiese, en cantidades suficientes para obtener carga completa. Las mezclas se incubaron a 37° por 30 min y las reacciones se detuvieron y procesaron como se detalla más adelante.

Ensayo de aminoacilación de tRNA^{Met} de B.mori con enzima de E.coli.

La incorporación heteróloga de Met en tRNA de B.mori se efectuó en una mezcla de reacción (0,1 ml) que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 12 mM, KCl 10 mM, β -mercaptoetanol 3 mM, ATP 10 mM, [^3H] o [^{14}C]Met 0,02 mM y una cantidad saturante de una preparación cruda de sintetetasas de E.coli, de manera de lograr una reacción completa, después de incubar a 37° por 30 min o por los tiempos que se indican. La reacción se detuvo y procesó como se describe más adelante.

Procedimiento general para cuantificar la radioactividad incorporada a tRNA en los ensayos de aminoacilación.

Al completarse el tiempo de incubación, a cada mezcla de reacción patrón de aminoacilación de tRNA se le adicionó 2 a 3 ml de TCA 5% frío. El precipitado se recolectó en un disco Millipore (HA, 0,45 μm), y se lavó 3 veces con TCA 5% frío. Posteriormente se disolvió en 5 ml de una solución de centelleo de Bray y la radioactividad se cuantificó con un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago, modelo 6801-6804.

Alternativamente la reacción de aminoacilación se detuvo agregando 0,3 - 0,4 ml de mezcla detenedora (compuesta

por 8 mg/ml de RNA de levadura, 0,3% de casaminoácidos Difco) y 5 ml de una solución fría de HCl 2 N. El precipitado se recolectó en un disco de fibra de vidrio Whatman GF/C el que se lavó 2 a 3 veces con la solución fría de HCl 2 N y finalmente con etanol frío. Después de secar el filtro, éste se introdujo en una solución de centelleo de tolueno para cuantificar la radioactividad.

No se detectaron diferencias entre ambos métodos.

Aminoacilación de tRNA de levadura con aminoacil-tRNA sintetasas de levadura y aislamiento del aminoacil-tRNA.

La aminoacilación se efectuó en mezclas de reacción que contenían Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, aminoácido radioactivo 0,02 mM, tRNA total de levadura de panadería (o tRNA^{Fen} purificado de levadura) y una preparación de aminoacil-tRNA sintetasas de levadura. Las cantidades de tRNA y enzima fueron ajustadas para permitir la carga completa del tRNA. Después de incubar a 37° por aproximadamente 30 minutos (cuantificando a intervalos la radioactividad incorporada como cuentas precipitables en TCA para asegurar que toda la muestra estuviera aminoacilada), la reacción se detuvo agregando un volumen de fenol saturado en una solución de acetato de potasio al 2%, pH 5,5. Después de extraer el aa-tRNA radioactivo de la fase acuosa por precipitación con etanol frío, éste fue disuelto en una solución de acetato de potasio 50 mM, pH 5,0 y filtrado a través de una columna de Sephadex G-25, la que tenía una capa (aproximadamente de 1 cm) de ácido silícico en la parte superior (21). El [³H] o [¹⁴C]aa-tRNA recuperado en el V₀ fue concentrado por precipitación con etanol frío y disuelto en agua

bidestilada (previamente esterilizada en el autoclave) y guardado a -70° . El procedimiento de aislamiento del aa-tRNA aquí descrito se usó en todas las demás preparaciones que se obtuvieron aumentando el volumen de las mezclas de reacción utilizadas en cada ensayo de aminoacilación patrón.

Aislamiento de $[^{32}\text{P}]$ tRNA de la región posterior de la glándula de *B.mori*.

El marcaje y extracción del $[^{32}\text{P}]$ tRNA fue realizado por el Dr. Chen en el Roche Institute of Molecular Biology, esencialmente como lo describe en Chen y Siddiqui (245).

Durante los días 2, 3 y 4 del quinto estadio larval, cada larva de *B.mori* recibió una inyección intracelómica de 0,6 mCi de $[^{32}\text{P}]$ -ortofosfato neutralizado, disuelto a una concentración de 5 a 6 mCi/ml en una solución de citrato de sodio 0,05 M y NaCl 0,15 ml. Las glándulas se separaron 24 hrs más tarde y se lavaron en la misma solución de citrato y NaCl, y se guardaron a -170° para extraer después el tRNA.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El procedimiento utilizado en la electroforesis del $[^{32}\text{P}]$ tRNA de *B.mori* corresponde al descrito por Fradin y col. (38). La primera dimensión se realizó usando un gel de acrilamida al 9,6% - urea 7 M (40 x 15 x 0,15 cm) en tampón Trisborato 89 mM, pH 8,3. La corrida se efectuó a 4° por aproximadamente 45 hr usando 10 a 20 mA por placa. Los límites de la columna formada por el surco que contenía el $[^{32}\text{P}]$ tRNA fueron detectados con un contador geiger. Después de recortar la columna, ésta fue introducida en posición horizontal sobre una placa de gel de poliacrilamida al 20% - urea 4 M

(15 x 15 x 0,3 cm) en tampón Tris-borato 89 mM, pH 8,3 y corrida a 4° (20 mA/placa) por 55 hrs. Las manchas correspondientes se detectaron por autoradiografía, revelando la película Kodak NS-54T previamente expuesta al gel.

Alternativamente, cuando se analizó la población de tRNA^{Ala} (en una sola dimensión), se usó una placa similar a la utilizada para la segunda dimensión. Después de la corrida se tiñió sumergiéndola en una solución de 0,2% de azul de metileno en acetato de sodio al 2%, pH 5,0, y se destiñió lavándola continuamente en agua.

Purificación parcial de N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa.

La N-AcFen-tRNA hidrolasa del híbrido Saccharomyces fragilis x Saccharomyces dozhanskii se purificó esencialmente siguiendo el procedimiento descrito por el laboratorio de Heredia con algunas modificaciones (224, 225). A 33 g de células de la levadura híbrida se le agregaron 65 gramos de arena de vidrio y 35 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, que contenía acetato de magnesio 10 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. La mezcla se homogeneizó en una juguera a 4° por 5 min con intervalos a cada min. El homogeneizado se centrifugó en frío a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 x g durante 90 min en una ultracentrífuga Beckman L2-65B (rotor 65 Ti). A la fracción correspondiente al sobrenadante de este centrifugado se le denominó "extracto crudo".

El extracto crudo fue cromatografiado a través de una columna de DEAE-Sephadex A-50 (2,5 x 18 cm) previamente equilibrada en la misma solución utilizada en la homogeneización de la levadura. La muestra de 24 ml del extracto conteniendo

31 mg/ml de proteínas fue eluida con una gradiente lineal formada por dos soluciones de Tris-HCl, una 0,1 M y otra 0,4 M, ambas de pH 7,0, que contenían acetato de magnesio 10 mM y β -mercaptoetanol 10 mM.

Las fracciones que contenían actividad peptidil y N-AcFen-tRNA hidrolásica fueron juntadas (tubos 68 al 79) y sometidas a precipitación diferencial con sulfato de amonio sólido. A los 68 ml de la fracción obtenida se le adicionó la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar un 60% de saturación. El precipitado (0-60%) se separó y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar un 80% de saturación. El precipitado de este último (60-80%) y el anterior se disolvieron cada uno en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, KCl 10 mM, acetato de magnesio 5 mM y β -mercaptoetanol 10 mM (solución TKMM).

A objeto de purificar la enzima, 3 ml obtenidos de la fracción 60-80% (14,4 mg de proteína/ml) fueron filtrados a través de una columna de Sephadex G-100 (1,5 x 57 cm) previamente equilibrada con la solución TKMM. Después de eluir con la misma solución, el pico de actividad (15 ml) fue cromatografiado en una columna de hidroxilapatita (1,5 x 4 cm) equilibrada en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 6,8, conteniendo acetato de Mg 10 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. La columna se eluyó con una gradiente lineal (0,1 - 1 M) de fosfato de potasio pH 6,8 que contenía acetato de magnesio 10 mM además de β -mercaptoetanol 10 mM. Al conjunto de fracciones que constituyeron el pico de actividad se le agregó glicerol y albúmina de suero de bovino en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 50% y 1% respectivamente. La mezcla se guardó a -20° .

La concentración de proteínas se determinó de acuerdo al método de Lowry (226).

Preparación de N-Acetil- $[^3\text{H}]$ o $[^{14}\text{C}]$ aminoacil-tRNA.

El procedimiento utilizado para acetilar el residuo aminoacilo esterificado al tRNA fue esencialmente el descrito por Haenni y Chapeville (228). A aproximadamente $2,0 \times 10^4$ pmoles de $[^3\text{H}]$ o $[^{14}\text{C}]$ aminoacil-tRNA disueltos en 2 ml de acetato de potasio 20 mM, pH 5,6, se le adicionó un volumen igual de una solución saturada de acetato de potasio pH 5,0. Mientras se mantenía en hielo, al tubo que contenía la mezcla de reacción se le agregó (bajo agitación constante con una barrita magnética) 0,6 ml de anhídrido acético redestilado, en alícuotas de 100 μl cada una a intervalos de 10 min. Enseguida se agregaron 4 ml de agua bidestilada y 3 vol de EtOH frío. La mezcla se dejó reposar por una hora a -60° y el precipitado resultante se separó por centrifugación (7.000 x g por 10 min), se lavó dos veces con agua bidestilada y se disolvió en agua (o en la solución requerida para someterlo a cromatografía en BD-celulosa).

Para cuantificar el nivel de acetilación, los productos fueron analizados por cromatografía en papel. Los N-Ac $[^3\text{H}]$ o $[^{14}\text{C}]$ aminoacil-tRNA fueron hidrolizados con Tris-HCl 1 M, pH 9,5 a 37° por 1 ó 2 horas y cromatografiados en papel Whatmann N° 3 (n-butanol-ácido acético- H_2O ; 78:5:17 v/v) usando como control una muestra del mismo aminoácido radioactivo que constituía el residuo aminoacilo. Después de finalizada la cromatografía, las columnas de papel fueron cortadas a través de líneas horizontales del mismo tamaño. La radioactividad contenida en los trozos de papel fue cuantificada en una solución de centelleo de tolueno. En todas las preparaciones utilizadas en los experimentos, la cantidad de marca en el residuo N-Acetilaminoacilo fue superior al 95%, considerada toda la radioactividad contenida en el hidrolizado a pH alcalino.

Ensayo para determinar la actividad de peptidil y N-AcFen-tRNA hidrolasa.

La mezcla de ensayo patrón (0,1 ml) constituida por tampón imidazol-HCl 50 mM, pH 6,5, acetato de magnesio 2,5 mM, β -mercaptoetanol 2,5 mM, 12,6 pmoles de N-Ac [^{14}C]Fen-tRNA^{Fen} o 7,3 pmoles de N-Ac [^{14}C]Val-tRNA^{Val}, ambos de levadura, y las cantidades de enzimas indicadas en cada caso, se incubó a 30° por 10 min (los cambios de sustrato se indican donde corresponde, lo mismo cuando el tiempo de incubación se prolonga para medir el progreso de la reacción). Al final de la incubación, la reacción se detuvo adicionando 3 a 5 ml de una solución fría de TCA al 5%. Después de mantener los tubos en hielo por 10 a 20 min, el contenido de ellos se filtró a través de discos de fibra de vidrio (Whatman GF/C). Los filtros fueron lavados 2 a 3 veces con la misma solución de TCA, finalmente con EtOH frío y secados. La radioactividad atrapada en ellos se cuantificó en una solución de centelleo que contenía tolueno.

Todos los ensayos, exceptuando el barrido de las columnas, fueron realizados en duplicados. Se efectuaron controles en ausencia de enzima para estimar el nivel de hidrólisis espontánea de los sustratos, el que resultó ser muy bajo (2 a 3%).

Preparación de tRNA de hígado de C.carpio.

A menos que se exprese de otro modo, todos los procedimientos fueron ejecutados entre 0 y 4°C. Para la preparación de tRNA, se utilizaron hígados de carpas recién sacrificadas. El tRNA se aisló de acuerdo al método descrito por Krauskopf y Amthauer (1979). A una cantidad de hígados cortados en

pequeños trozos, se le agregó 1,5 vol de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, conteniendo sacarosa 0,25 M y 0,1% bentonita. Después de homogeneizar con un homogeneizador Potter teflón-vidrio y de centrifugar el homogeneizado a 15.000 x g por 10 min, el sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio y se agregó 1 volumen de fenol saturado con acetato de potasio 0,1 M, pH 5,6, dejándolo agitar durante 1 hr a temperatura ambiente. Enseguida, se centrifugó a 4.000 g, durante 1 hr y se separó la fase acuosa, la que se precipitó con 2,5 vol de etanol frío. El precipitado se colectó centrifugando a 15.000 x g por 10 min, se secó al vacío y se resuspendió con tampón acetato de potasio 0,1 M, pH 5,6. La solución se cargó a una columna de DEAE-celulosa (2 x 42 cm) previamente equilibrada con el mismo tampón. La columna se eluyó a través de un gradiente lineal con NaCl entre 0,1 y 0,5 M en tampón acetato de potasio 0,1 M, pH 5,6. La fracción que contenía el tRNA, se eluyó cambiando la concentración de NaCl a 1 M. El pico de A_{260} se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol frío. El precipitado se separó por centrifugación y se resuspendió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7,2, $MgCl_2$ 10 mM y se guardó a $-20^{\circ}C$. La concentración de tRNA se determinó en base a su absorbancia a 260 nm.

Para los experimentos de determinación de niveles de aminoacilación, se usaron preparaciones de tRNA de hígado de C. carpio, de invierno y de verano, trabajando con 30-40 grs de hígado cada vez, correspondiente a 2 animales.

Determinación de los niveles de aminoacilación in vivo.

Se basó en la capacidad de IO_4^- para oxidar únicamente al tRNA deacilado, dejando intacto al aminoacil-tRNA.

Se usó la técnica descrita por Rizzino y col. (253).

El tRNA contenido en el precipitado correspondiente al pico de A_{260} eluido de la columna de DEAE-celulosa, con 1 M NaCl en acetato de potasio 0,1 M, pH 5,6, se disolvió en el mismo tampón, en ausencia de NaCl y la solución se dividió en dos alícuotas iguales. A una de ellas se le agregó 0,2 volúmenes de metaperyodato sódico 40 mM y a la otra se le agregó igual volumen de H_2O estéril. Ambas soluciones se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Enseguida se detuvo la reacción adicionando glucosa hasta una concentración 20 mM final, e incubando a temperatura ambiente 5 minutos. Con el objeto de eliminar glucosa de ambas muestras y yodato de la muestra oxidada, las preparaciones se filtraron a través de una columna Sephadex G-25 con tampón acetato de potasio 0,1 M, pH 5,6. Los picos de A_{260} obtenidos en el V_0 de cada columna, se precipitaron con 2,5 vol de etanol frío, 0,1 vol de acetato de potasio 20%, pH 5,6 y después de centrifugar a 15.000 x g por 10 min, se secaron y disolvieron en tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 8,7, incubándolos por 60 minutos a 37°C para liberar ambas muestras de tRNA, del aminoácido endógeno esterificado. Tanto la muestra oxidada como el control, se recuperaron por precipitación con 2,5 volúmenes de etanol frío. Una vez separados los precipitados, se disolvieron en Tris-HCl 5 mM, pH 7,2, $MgCl_2$ 10 mM. La capacidad de aminoacilación del tRNA tratado con peryodato, representa el nivel de tRNA aminoacilado in vivo, para una determinada especie. La cuantificación del nivel de aminoacilación de tRNA control, refleja la cantidad total de tRNA de la especie en estudio.

Ensayo de aminoacilación patrón de tRNA de C.carpio con enzima homóloga.

La aminoacilación se midió en mezclas de 0,1 ml que contenían Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 4 mM, KCl 25 mM, ATP 2 mM, DTT 0,1 mM, [¹⁴C] aminoácido 0,02 mM, tRNA y aminoacil-tRNA sintetasas de carpa. La cantidad de enzimas fue ajustada para obtener cargas máximas. Después de incubar 30 min a 30° las reacciones fueron detenidas y procesadas como ya se describió en esta sección.

Líquido de centelleo para cuantificar radioactividad.

Para cuantificar la radioactividad contenida en solución se usó la mezcla de Bray (223). Ocasionalmente ésta también fue utilizada para disolver los filtros de Millipore en los ensayos de aminoacilación de tRNA. Alternativamente se midió la radioactividad contenida en solución, usando una mezcla que contenía una parte de Tritón X-100 y dos partes de solución de centelleo de tolueno. La última contenía 4 g de PPO y 0,1 g de POPOP por litro de tolueno. La solución de tolueno también se utilizó para cuantificar la radioactividad contenida en los discos de fibra de vidrio o filtros Millipore usados en los ensayos de aminoacilación de tRNA.

MATERIALES.

Material biológico.

Las carpas (Cyprinus carpio) de 1,0 a 1,5 Kg de peso se extrajeron con red del río Calle-Calle en Valdivia, y se mantuvieron en una pileta en la que circulaba agua del mismo río.

Durante el período de 3 a 4 semanas que permanecieron en cautiverio, los peces se alimentaron con las partículas en suspensión que contenía el agua circulante.

Las glándulas del gusano de seda Bombyx mori fueron suministradas por el Dr. M.A.Q. Siddiqui, quien las obtuvo como lo describe (245).

La levadura de panadería fue adquirida en la fábrica Collico en Valdivia.

La cepa híbrida de Saccharomyces fragilis x Saccharomyces dozhanskii fue suministrada gentilmente por el Dr. C. Heredia. Esta cepa se utilizó sólo para el aislamiento de N-AcFen-tRNA hidrolasa. La cepa de Neurospora crassa (74 00.31-16A) fue un generoso regalo del Dr. J. Eppler y la de E.coli B del Dr. H. Ennis.

Reactivos y otros materiales.

Sephadex G-25, DEAE-Sephadex A-50, DEAE-celulosa, Tris, EDTA, arena de vidrio, imidazol, DTT, ácido silícico, PPO, POPOP, Tritón X-100, β -mercaptoetanol, ATP, bentonita, dodecil sulfato de sodio, ácido cacodílico, ácido 3,3-dimetilglutárico, Hepes, [^{12}C] aminoácidos, tRNA total de E.coli y de levadura de panadería, tRNA^{Fen} de E.coli, N,N'-metilen-bisacrilamida y azul de metileno fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.). El Plaskon para las columnas RPC-5 fue un obsequio del Dr. Siddiqui. Los filtros Millipore (2,5 cm HA, 0,45 μ) se adquirieron en Millipore (Bedford, Mass. U.S.A.). El papel Whatman y los filtros de fibra de vidrio GF/C en Whatman Ltd. (Springfield Mill, Maidstone Kent, Inglaterra). La sacarosa, el sulfato de amonio, y la urea, todos grado ultrapuro, lo mismo que la BD-celulosa (lote 6902) fueron adquiridos en Schwarz/Mann (Orangeburg,

N.Y., U.S.A.). Un lote de tRNA de E.coli también tuvo la procedencia recién mencionada. La acrilamida se compró en Bio Rad Lab. (Richmond, Calif. U.S.A.).

Los [^3H] o [^{14}C]-aminoácidos, el [^{32}P]-ortofosfato y los patrones de [^3H] y [^{14}C]-tolueno fueron obtenidos de New England Nuclear (U.S.A.) y del Radiochemical Centre Amersham (Inglaterra). El $\text{N}_{5,10}$ -[^{14}C]meteniltetrahidrofolato fue un generoso obsequio del Dr. S.S. Kerwar.

La hidroxilapatita, sales inorgánicas, ácidos, solventes orgánicos y otros reactivos, fueron obtenidos de Merck AG Darmstadt, seleccionándose aquellos de más alta pureza.

RESULTADOS

CAPITULO PRIMERO

PURIFICACION DE tRNA ESPECIFICOS MEDIANTE
HETEROAMINOACILACION HETEROLOGAComportamiento cromatográfico de tRNA^{Val}, tRNA^{Ala} y tRNA^{Fen}
de E.coli en columnas de BD-celulosa.

El fraccionamiento de tRNA total de E.coli se efectuó a través de cromatografía en BD-celulosa como se muestra en las Figuras 3A y 3B. La aceptación de aminoácidos de cada una de las fracciones obtenidas se ensayó utilizando una preparación de aminoacil-tRNA sintetasas de E.coli, identificándose las especies de tRNAceptoras de valina, alanina y fenilalanina, de acuerdo a lo descrito en Métodos. La cromatografía permitió resolver dos especies de tRNA^{Val} (Figura 3A) designadas tRNA₁^{Val} y tRNA₂^{Val} de acuerdo al orden de elución de los picos (32). Se detectaron además tres picos específicos para alanina y uno para fenilalanina (Figura 3B).

Alícuotas de cada fracción fueron analizadas en ensayos de aminoacilación utilizando [¹⁴C] Fen y Fen-tRNA sintetasa proveniente de N.crassa. Esta enzima reconoce una serie de especies de tRNA de otros organismos y cataliza la esterificación de Fen en forma errónea. Usando las condiciones indicadas para los ensayos de heteroaminoacilación con Fen-tRNA sintetasa de N.crassa descritas en Métodos, tRNA₁^{Val} (Figura 3A) y las fracciones de tRNA^{Ala} fueron heteroaminoaciladas

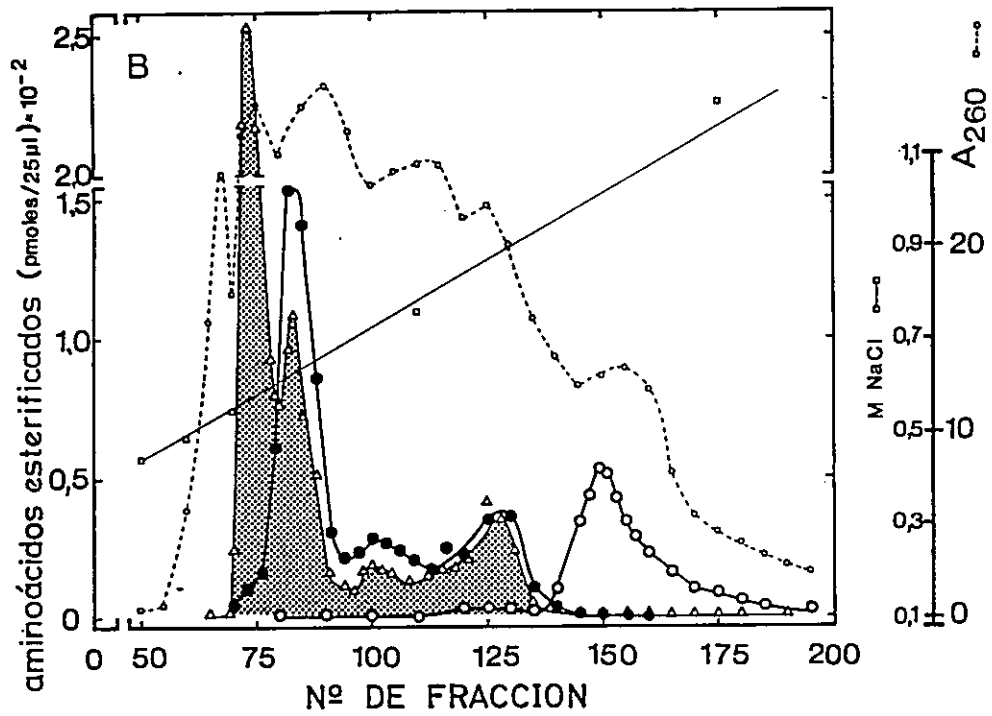
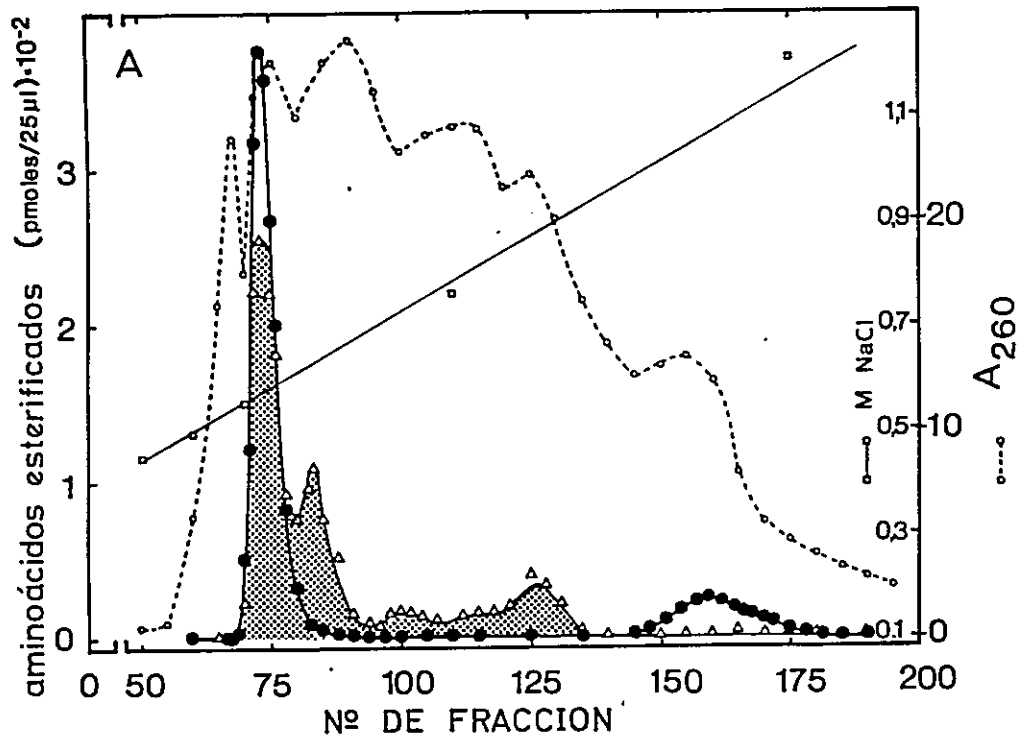


FIGURA 3

Figura 3. Cromatografía de tRNA total de E.coli.

Una muestra de 6930 unidades A_{260} de tRNA de E.coli disueltas en 50 ml de una solución tampón constituida por NaOAc 10 mM pH 5,5, $MgSO_4$ 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM y NaCl 0,3 M, fue colocada sobre una columna de BD-celulosa (0,9 x 90 cm) equilibrada con la misma solución. La elución se efectuó usando el mismo tampón con una gradiente lineal de NaCl como se indica ($\square \longrightarrow \square$). Se colectaron fracciones de 2 ml a una temperatura de 4° y se tomaron alícuotas (25 μ l) de cada fracción, a las que se les cuantificó su capacidad para aceptar valina, alanina y fenilalanina en reacciones con aminoacil-tRNA sintetasas homólogas. También se determinó la aceptación de fenilalanina utilizando ensayos de heteroaminoacilación heteróloga con Fen-tRNA sintetasa de N.crassa, de acuerdo a lo descrito en Métodos.

$\triangle \longrightarrow \triangle$ Incorporación de $[^{14}C]$ Fen con enzima heteróloga (representada también por el área gris).

A: $\bullet \longrightarrow \bullet$ Aceptación de $[^{14}C]$ Val con enzima homóloga.

B: $\bullet \longrightarrow \bullet$ Aceptación de $[^{14}C]$ Ala y $\circ \longrightarrow \circ$ $[^{14}C]$ Fen con enzima homóloga.

(Figura 3B). Los niveles de incorporación errónea de $[^{14}\text{C}]$ Fen alcanzaron al menos a un 70% de los obtenidos en cada especie de tRNA en ensayos con su aminoácido y sintetasa homóloga.

Las fracciones enriquecidas en $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ se juntaron y precipitaron con 2 volúmenes de EtOH. Después de disolver en H_2O bidestilada estéril, se ensayó su capacidad aceptora con $[^{14}\text{C}]$ Val y enzima de *E.coli*, obteniéndose una actividad específica de 385 pmoles de aminoácido incorporado por unidad de A_{260} de tRNA, lo que equivale a una purificación de 8 veces respecto al contenido de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ en tRNA total de *E.coli*. Esta fracción de tRNA se utilizó para estudiar el comportamiento cromatográfico de Fen-tRNA $_1^{\text{Val}}$ obtenido por heteroaminoacilación heteróloga.

Efecto de la heteroaminoacilación heteróloga y de la configuración que adopta el tRNA sobre la conducta cromatográfica.

Para obtener $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA $_1^{\text{Val}}$ en cantidades adecuadas, se aumentó el volumen del ensayo patrón de heteroaminoacilación heteróloga. Cada ml de la mezcla de incubación contenía 58 UA $_{260}$ de tRNA $_1^{\text{Val}}$ enriquecido por la cromatografía en BD-celulosa, además de 2 a 3 veces la cantidad de Fen-tRNA sintetasa de *N.crassa* requerida para alcanzar el plateau del producto heteroaminoacilado. Las concentraciones de tRNA y enzima se eligieron después de estudiar las condiciones que conducían rápidamente a un plateau cuando se graficaban incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Fen vs. tiempo y, aquellos en que el nivel de aminoacilación era proporcional a la cantidad de tRNA presente. Los otros componentes de la mezcla de reacción, tiempo y temperatura de incubación, corresponden a los del ensayo patrón descrito en Métodos. Aumentando el volumen de

ensayo patrón para carga homóloga y utilizando una preparación de aa-tRNA sintetasa de *E. coli* y $[^3\text{H}]$ Val, se obtuvo además $[^3\text{H}]$ Val-tRNA₁^{Val}. Los tRNA aminoacilados se aislaron por extracción fenólica y precipitación con EtOH frío y posteriormente por cromatografía a través de una columna de Sephadex G-25 que tenía una capa de ácido silícico en la parte superior (21).

Al estudiar el comportamiento cromatográfico de $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA₁^{Val}, usando las mismas condiciones descritas en las Figuras 3A y 3B (pH 5,5 en presencia de Mg^{2+}), se observó que el producto heteroaminoacilado eluye a mayores concentraciones de NaCl (0,83 M) respecto al mismo tRNA deacilado (NaCl 0,57 M), valores que se indican en la Tabla I.

Para examinar el posible efecto del estado configuracional del tRNA sobre la conducta cromatográfica en BD-celulosa y a la vez determinar si se podía incrementar la separación entre el tRNA deacilado y el $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA, se efectuaron experimentos a pH 4,0 en presencia y ausencia de Mg^{2+} . Una muestra que contenía $[^3\text{H}]$ Val-tRNA₁^{Val}, $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA₁^{Val} y una alícuota de la fracción enriquecida en tRNA₁^{Val}, fue filtrada a través de Sephadex G-25, usando un tampón formiato de sodio 5 mM pH 4,0 y EDTA 5 mM. El material que eluyó en V_0 , prácticamente libre de Mg^{2+} , fue sembrado sobre una columna de BD-celulosa previamente equilibrada con el mismo tampón pero en presencia de NaCl 0,3 M. Como se muestra en la Figura 4, la interacción entre $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA₁^{Val} y BD-celulosa aumentó marcadamente ya que éste eluyó a una concentración de sal de 0,97 M. El tRNA₁^{Val} deacilado se desplazó para eluir a una concentración de NaCl de 0,74 M. $[^3\text{H}]$ Val-tRNA₁^{Val} eluyó con NaCl 0,77 M (Tabla I). En general, las condiciones usadas determinaron el retardo del perfil de elución del grueso de la población de tRNA (Figura 4).

TABLA I

Concentración de NaCl requerida para eluir $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ de E.coli bajo distintas condiciones cromatográficas

Solución de elución	Concentración de NaCl M		
	$\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$	$[^3\text{H}]\text{Val-tRNA}_{1}^{\text{Val}}$	$[^{14}\text{C}]\text{Fen-tRNA}_{1}^{\text{Val}}$
NaOAc 10 mM pH 5,5, MgSO ₄ 10 mM, βMercaptoetanol 10 mM	0,57	-	0,83
Formiato de sodio 5 mM pH 4,0, EDTA 5 mM	0,74	0,77	0,97
Formiato de sodio 5 mM pH 4,0, MgSO ₄ 10 mM	0,68	0,73	0,97

Los datos se obtuvieron de las cromatografías que se presentan en las Figuras 3, 4 y 5, exceptuando la concentración de NaCl requerida para eluir $[^{14}\text{C}]\text{Fen-tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ en tampón NaOAc 10 mM pH 5,5, la que se obtuvo a través de una cromatografía que no se muestra. Para calcular la concentración de elución se consideró en todos los casos el máximo del pico de elución.

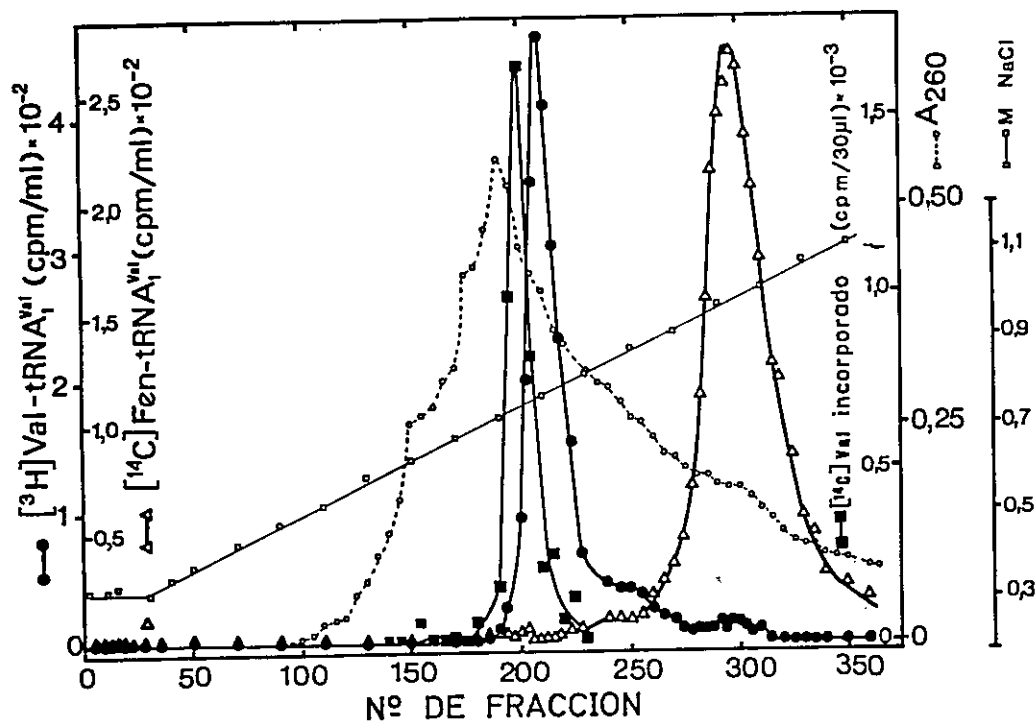


Figura 4. Perfil de elución de Fen-tRNA^{Val}₁ en tampón formiato de sodio pH 4,0 y ausencia de Mg²⁺.

La cromatografía en BD-celulosa se efectuó a 4° en una columna de 0,9 x 100 cm. Esta se sembró con una muestra que contenía tRNA^{Val}₁ enriquecida, [³H]Val-tRNA^{Val}₁ (31500 cpm) y [¹⁴C]Fen-tRNA^{Val}₁ (26500 cpm), prácticamente libre de Mg²⁺, obtenida como se describe en el texto de los Resultados. La elución se efectuó con una solución que contenía formiato de sodio 5 mM pH 4,0, EDTA 5 mM y NaCl, para originar un gradiente lineal con las concentraciones indicadas en la ordenada correspondiente. La aceptación de valina fue cuantificada tomando alícuotas de cada fracción las que fueron incubadas en mezclas de reacción con aa-tRNA sintetasa de E.coli como se describe para el ensayo "patrón" en Métodos.

La radioactividad de cada fracción se midió tomando alícuotas de 1 ml y disolviéndolas en 5 ml de solución Bray (223). El efecto contaminante entre los dos canales ($[^3\text{H}]$ y $[^{14}\text{C}]$) utilizados para la cuantificación de las cpm fue corregido. La recuperación de radioactividad fue de 86% para $[^3\text{H}]$ y 100% para $[^{14}\text{C}]$.

A objeto de investigar el efecto de Mg^{2+} y del pH sobre la conducta cromatográfica de las distintas formas de tRNA estudiadas se procedió a realizar otra cromatografía en BD-celulosa, utilizando una muestra similar a la usada en la columna anterior (Figura 4) excepto que la filtración a través de Sephadex G-25 se llevó a cabo en tampón formiato de sodio 5 mM pH 4,0 conteniendo $MgSO_4$ 10 mM, y que la columna de BD-celulosa se equilibró en este tampón, al que se le adicionó para este propósito NaCl 0,3 M. Como se observa en la Figura 5, el Mg^{2+} no cambió la elución de $[^{14}C]$ Fen-tRNA₁^{Val} (ver Tabla I). Sin embargo, se establece una clara disminución de las interacciones secundarias entre gran parte de la población de tRNA deacilados y BD-celulosa. La elución de tRNA₁^{Val} y de Val-tRNA₁^{Val} ocurrió a concentraciones de sal 0,68 M y 0,73 M respectivamente, tal como se indica en la Tabla I, algo más retardada en relación a la cromatografía con tampón NaOAc 10 mM pH 5,5.

Fraccionamiento de tRNA específicos.

Con el fin de averiguar si la conducta cromatográfica y la ventajosa retención de Fen-tRNA₁^{Val} podrían dar lugar a procedimientos específicos de purificación de determinados tipos de tRNA de E.coli, especialmente aquellos que no siendo aceptores naturales de aminoácidos aromáticos pueden esterificarse con fenilalanina por heteroaminoacilación heteróloga, se realizaron experimentos pilotos para cuantificar el grado de purificación que se puede lograr al separar Fen-tRNA₁^{Val} de la población de tRNA contaminantes presente en la fracción enriquecida de tRNA₁^{Val} de E.coli.

La Figura 6 muestra el resultado que se obtuvo al cromatografiar en BD-celulosa 19 UA₂₆₀ de la fracción enrique-

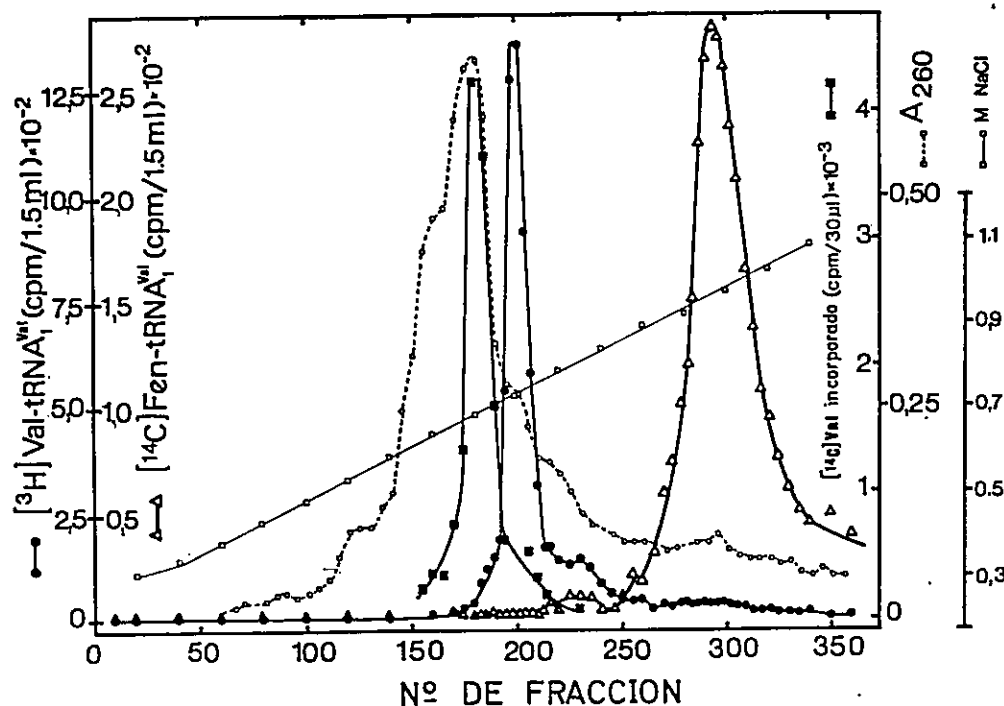


Figura 5. Perfil de elución de $\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ en tampón formiato de sodio pH 4,0 y Mg^{2+} .

Se cromatografió una muestra que contenía $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$, $[^3\text{H}] \text{Val-tRNA}_1^{\text{Val}}$ (21000 cpm) y $[^{14}\text{C}] \text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ (44500 cpm) en una columna con las mismas características señaladas en la Figura 4, la que fue analizada de manera similar, excepto que la muestra contenía Mg^{2+} como se indica en el texto y que la elución se efectuó con una gradiente de NaCl en tampón formiato de sodio pH 4,0, 10 mM MgSO_4 . La recuperación de la radioactividad fue de 88% para $[^3\text{H}]$ y 100% para $[^{14}\text{C}]$.

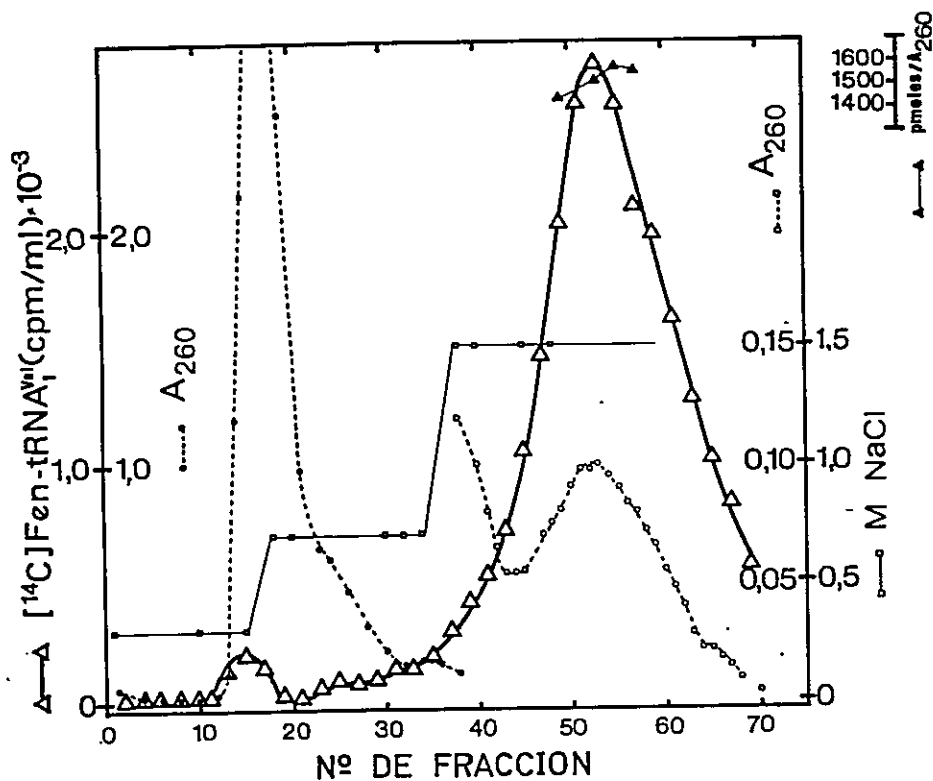


Figura 6. Fraccionamiento de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$.

Una muestra de $[^{14}\text{C}]\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Val}}$ (19 UA_{260}) obtenida por heteroaminoacilación heteróloga con Fen-tRNA sintetasa de *N. crassa* como se indica en el texto de Resultados, fue sembrada en una columna (0,9 x 20 cm) de BD-celulosa previamente equilibrada con una solución de formiato de sodio 5 mM pH 4,0, MgSO_4 10 mM y NaCl 0,2 M. La elución se llevó a cabo utilizando concentraciones crecientes de NaCl en la misma solución de equilibrio de la columna, como se indica al margen de la ordenada derecha. El perfil de A_{260} está representado por dos diferentes escalas señaladas en las ordenadas correspondientes. La cuantificación de la radioactividad se realizó de la misma manera que como se describe en la Figura 4. La recuperación total de la radioactividad fue de 91%.

cida de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ de E.coli heteroaminoacilada con $[^{14}\text{C}]$ fenilalanina, usando Fen-tRNA sintetasa de N.crassa de acuerdo a lo descrito en Métodos.

Se observa claramente que la elución escalada con concentraciones crecientes de NaCl en tampón formiato de sodio 5 mM pH 4,0 con MgSO_4 10 mM, resuelve $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA $_1^{\text{Val}}$ del resto de los tRNA deacilados, y permite obtener un producto con una actividad específica de aproximadamente 1.500 pmoles/ UA_{260} .

Purificación de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ de E.coli.

A objeto de aislar una fracción de tRNA de E.coli enriquecida en $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ y obtener una purificación de estas especies mediante heteroaminoacilación heteróloga, 3.600 UA_{260} de tRNA total fueron cromatografiados en BD-celulosa, siguiendo exactamente el mismo procedimiento utilizado para obtener los resultados indicados en las Figuras 3A y 3B. Aun cuando, como se observa en las Figuras 3A y 3B, la cromatografía en BD-celulosa resuelve $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$, la elución no permite una separación total entre ambas especies debido a que las últimas fracciones del pico de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ se superponen con las fracciones iniciales del pico de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$. Por ello se estimó conveniente introducir una cromatografía en Plaskon (RPC-5) con la cual se podría obtener una separación más nítida de estas dos especies de tRNA susceptibles de ser aminoaciladas por Fen usando Fen-tRNA sintetasa de N.crassa.

La cromatografía de 3.600 UA_{260} de tRNA mencionada más arriba, permitió obtener una fracción (Fracción I) con 1102 UA_{260} que contenía tanto $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ como $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$, de acuer-

do al perfil resultante del análisis de los niveles de aceptación de valina y alanina en ensayos de aminoacilación de alícuotas de cada fracción con sintetasa de E.coli (no se presenta Figura en esta columna). La capacidad de aceptación de valina y alanina se cuantificó en ambos, el tRNA total con que se sembró la columna de BD-celulosa y el tRNA contenido en la Fracción I obtenida de esta última. Los valores obtenidos se indican en la Tabla II.

La Fracción I, fue precipitada con 2 vol de EtOH frío, lavada varias veces y disuelta en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,0, MgSO₄ 10 mM, Na₂S₂O₃ 1 mM y NaCl 0,3 M para someterla inmediatamente después a cromatografía en Plaskon. La columna de Plaskon se cargó con 1096 UA₂₆₀ de la Fracción I y se eluyó con una gradiente de concentración de NaCl utilizando la misma solución en la que se disolvió la Fracción I. Como se muestra en la Figura 7, al analizar la capacidad de aminoacilación de cada una de las fracciones con enzima de E.coli, se obtuvieron dos fracciones enriquecidas, una específica para valina y la otra para alanina, correspondientes a tRNA₁^{Val} y tRNA₁^{Ala} respectivamente. La resolución fue suficientemente amplia como para evitar la contaminación cruzada entre ambas especies.

Las fracciones que contenían tRNA₁^{Val} se juntaron (Fracción II), lo mismo se hizo con aquellas que contenían tRNA₁^{Ala} (Fracción III).

A través de los correspondientes ensayos de aminoacilación se determinó que la Fracción II aceptaba 276 pmoles de valina y la Fracción III 400 pmoles de alanina, las dos por UA₂₆₀ de tRNA (Tabla II).

Para introducir un residuo aminoacilo de caracter hidrofóbico, con el que de acuerdo a los resultados obtenidos al estudiar el comportamiento cromatográfico de Fen-tRNA₁^{Val} au-

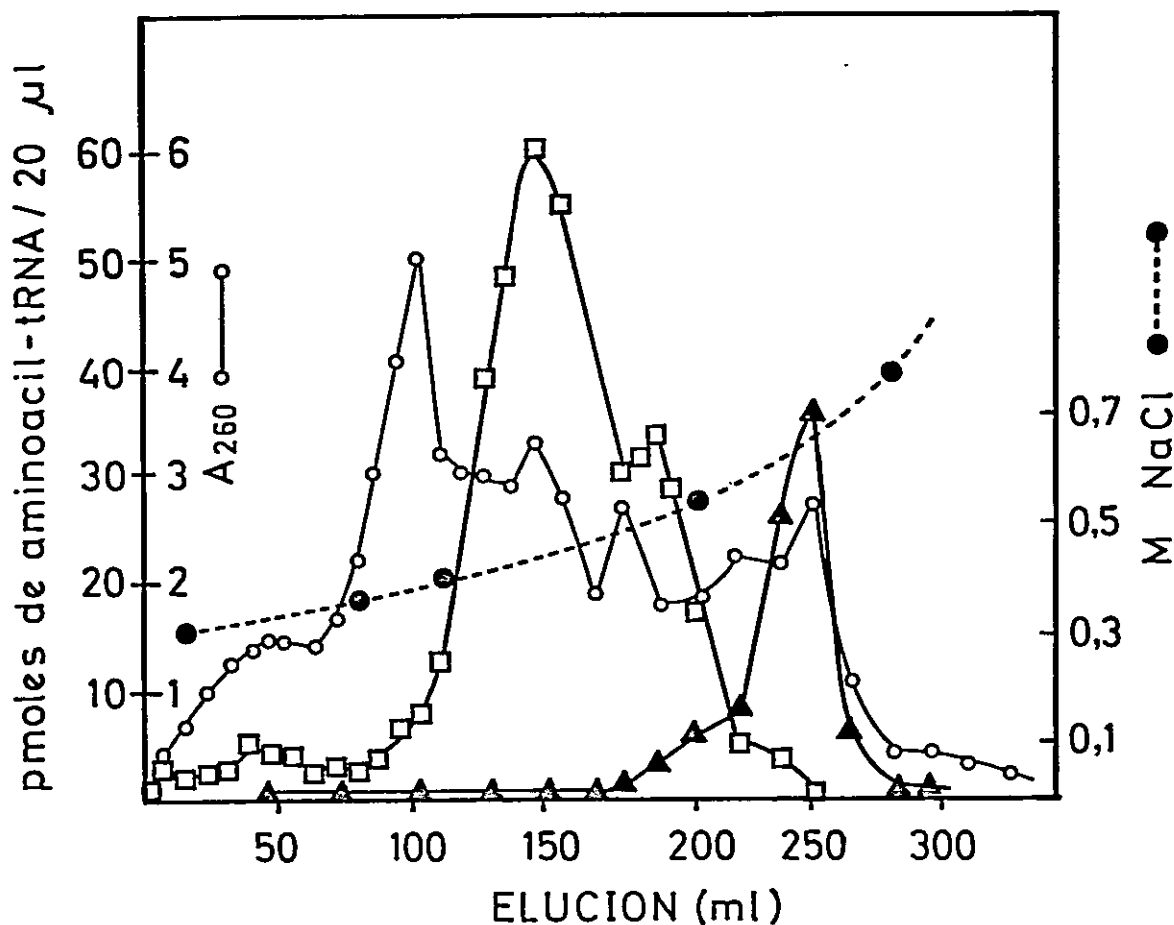


Figura 7. Cromatografía de una fracción enriquecida en $tRNA_1^{Val}$ y $tRNA_1^{Ala}$ sobre Plaskon.

Una muestra de 1096 UA₂₆₀ (Fracción I) de tRNA enriquecido previamente, se cargó a una columna de 0,9 x 90 cm de Plaskon (RPC-5) y se eluyó esencialmente como lo describe Roe y col. (224) generando una gradiente cóncava entre NaCl 0,3 M en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,0, MgSO₄ 10 mM, Na₂S₂O₃ 1 mM y NaCl 1 M en la misma solución, bajo presión positiva la que se obtuvo con una bomba peristáltica LKB (Tipo 4912 A). Las fracciones (3 ml) se recolectaron a 4° a un flujo de 6-8 ml/hr y se tomaron alícuotas para cuantificar la aceptación de aminoácidos en mezclas de reacción con enzima de *E.coli*, siguiendo el procedimiento patrón descrito en Métodos.

□—□ valina, ▲—▲ alanina.

menta la interacción con BD-celulosa, las Fracciones II y III fueron precipitadas cada una con EtOH frío, lavadas y disueltas en agua bidestilada estéril y heteroaminoaciladas con $[^3\text{H}]$ Fen ($\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$) o $[^{14}\text{C}]$ Fen ($\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$) usando Fen-tRNA sintetasa de *N. crassa* como se detalla en Métodos. Los productos de las dos reacciones fueron aislados por extracción fenólica y filtrados a través de una columna de Sephadex G-25 combinada con ácido silícico como se describió anteriormente. Los niveles de heteroaminoacilación alcanzaron al igual que en los experimentos previos, sobre un 70% del valor correspondiente con el aminoácido específico y la enzima homóloga. $[^3\text{H}]$ Fen-tRNA $_1^{\text{Val}}$ y $[^{14}\text{C}]$ Fen-tRNA $_1^{\text{Ala}}$ fueron sembrados en sendas columnas de BD-celulosa, equilibradas con una solución de formiato de sodio pH 4,0, MgSO_4 10 mM y NaCl 0,3 M. La elución se llevó a efecto a través de un gradiente lineal de NaCl usando la misma solución con que se equilibraron las columnas. De acuerdo a la hipótesis de trabajo planteada, los tRNA heteroaminoacilados se separaron claramente de aquellos deacilados en virtud de la incorporación del residuo aromático (Figuras 8 y 9).

Los picos correspondientes a $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ fueron colectados y se examinó la actividad específica de cada uno de ellos. Como se observa en la Tabla II, el primero alcanzó un promedio de 1386 pmoles/UA $_{260}$ mientras $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ uno de 1301 pmoles/UA $_{260}$.

Los datos cuantitativos de cada una de las etapas de purificación, así como también los factores de purificación y los rendimientos están indicados en la Tabla II, los que establecen claramente la factibilidad de aprovechar las ventajas que presenta la conducta cromatográfica de especies hetero-Fen-tRNA en BD-celulosa, en el diseño de nuevos pro-

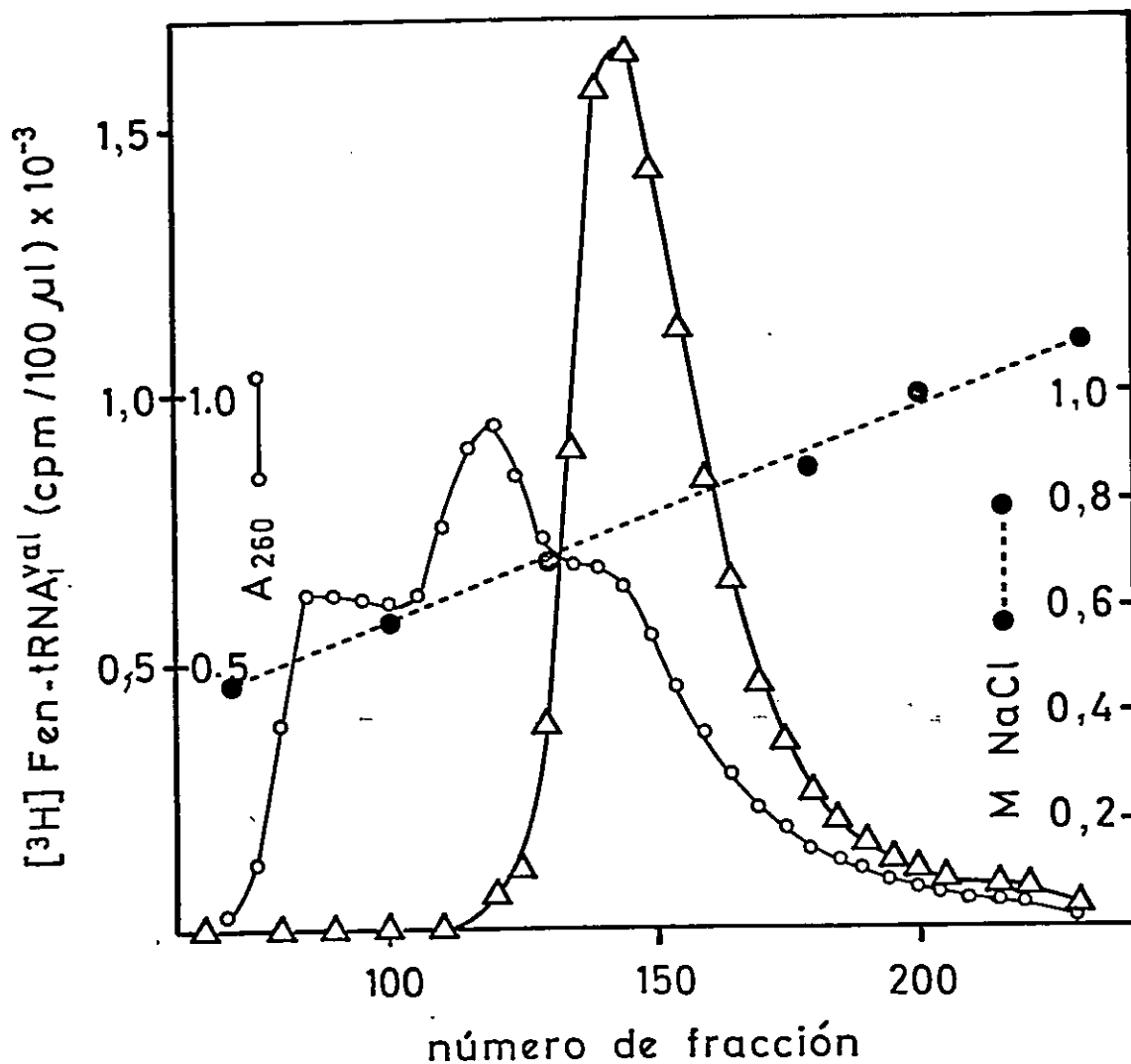


Figura 8. Purificación de tRNA $^{\text{Val}}_1$.

Una muestra de 327 UA $_{260}$ de $[^3\text{H}]$ Fen-tRNA $^{\text{Val}}_1$ obtenida por heteroaminoacilación heteróloga del tRNA $^{\text{Val}}_1$ contenido en la Fracción II, fue sembrada sobre una columna de BD-celulosa (0,9 x 90 cm) y eluida a 4° como se señala en el texto (Resultados). Se colectaron fracciones de 4 ml a un flujo de 30 ml/hr y se tomaron alícuotas para cuantificar la radioactividad contenida en ellas, con una mezcla de centelleo constituida por Triton X-100 y tolueno.

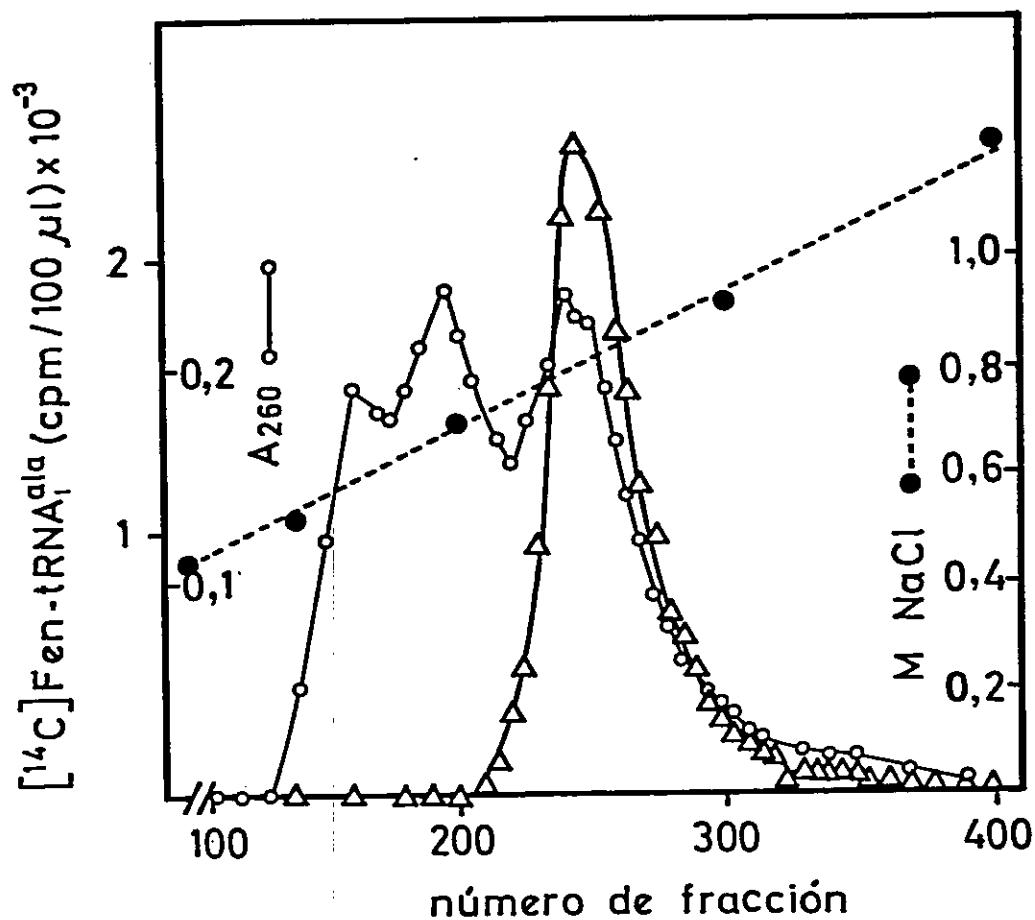


Figura 9. Purificación de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$.

Una muestra de 116 UA_{260} de $[^{14}\text{C}]\text{Fen-tRNA}_1^{\text{Ala}}$ obtenida por heteroaminoacilación heteróloga del tRNA contenido en la Fracción III, fue colocada sobre una columna de BD-celulosa (0,9 x 90 cm). La cromatografía y análisis se llevó a cabo de manera similar a lo descrito en la Figura 8.

TABLA II

ANALISIS CUANTITATIVO DE LAS ETAPAS DE PURIFICACION
DE tRNA^{Val} Y tRNA^{Ala} DE E. COLI

	tRNA ^{Val} UA 260	Actividad especifica *	Factor de purificación	Rendimiento**	tRNA ^{Ala} UA 260	Actividad especifica *	Factor de purificación	Rendimiento**
tRNA total	3600	54,4	1	100	3600	29,2	1	100
Fracción I obtenida por cromatografía en 80-celulosa	1102	164	3	92,3	1102	88	3	92,3
Fracciones resultantes de RPC-5								
Fracción II (tubos 118-206)	473,4	276	5,1	66,7	131,7	400	13,7	50,1
Fracción III (tubos 220-265)	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción II, después de la 2ª columna de 80-celulosa	41	1368	25,1	28,6	-	-	-	-
Fracción III, después de la 2ª columna de 80-celulosa	-	-	-	-	25	1301	44,6	30,9

* La actividad específica se expresa como pmoles de aminoácido aceptado por
unidad de A₂₆₀ de tRNA, medida esta última en una solución de Tris-HCl
5 mM pH 7,5, MgSO₄ 10 mM.

** Expresado en relación a los pmoles recuperados en cada etapa.

cedimientos de purificación que no involucran modificaciones químicas del tRNA.

CAPITULO SEGUNDO

N-ACETILFENILALANIL-tRNA HIDROLASA. SITIO DE
RECONOCIMIENTO DEL SUSTRATOAislamiento de una fracción parcialmente purificada de
N-AcFen-tRNA hidrolasa de levadura

Para aislar N-Acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa, se partió del extracto crudo proveniente de un homogeneizado de células del híbrido S.fragilis x S.dobzhanskii procesado de acuerdo a lo descrito en Métodos, el que contiene las dos hidrolasas que actúan sobre diversos tipos de peptidil o N-aminoacil-tRNA. En efecto, al determinar la actividad enzimática sobre N-AcFen-tRNA y N-AcVal-tRNA se observó que aun cuando ambos sustratos eran hidrolizados, la hidrólisis del primero ocurría a una velocidad aproximadamente 40 veces superior (Tabla III), lo que contrastaba con la naturaleza de la peptidil-tRNA hidrolasa por cuanto esta enzima presenta muy baja especificidad hacia el residuo N-aminoacilo del tRNA. Esta misma observación indujo a Bajo y col. (224) a buscar otra enzima que hidrolizara preferentemente N-AcFen-tRNA, lo que resultó en el hallazgo de una nueva hidrolasa de alta especificidad.

A objeto de separar las dos actividades se procedió a cromatografiar el extracto crudo en una columna de DEAE-Sephadex A-50. La Figura 10 muestra el perfil de actividad hidrolítica frente a los dos sustratos, el susceptible de ser hidrolizado por la peptidil-tRNA hidrolasa N-Ac^[14C]Val-tRNA^{Val}, y que es discriminado por N-AcFen-tRNA hidrolasa, y el sustrato específico de esta última.

TABLA III

Separación de hidrolasas del híbrido
Saccharomyces fragilis x Saccharomyces dozhanskii
 por precipitación con sulfato de amonio

	Actividad pmoles/mg proteína/10 min	
	N-Ac [¹⁴ C] Fen-tRNA ^a	N-Ac [¹⁴ C] Val-tRNA ^b
Extracto crudo	84	1,85
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-60% ^b	98	10,06
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60-80% ^b	3156	0,0

^a Los sustratos se obtuvieron aminoacilando y acetilando tRNA total de levadura como se describe en Métodos.

^b Cortes con (NH₄)₂SO₄ de la fracción eluida de la columna de DEAE-Sephadex A-50 (Figura 10) que contenía las dos actividades hidrolíticas. Los precipitados fueron disueltos y su actividad enzimática cuantificada como se detalla en Métodos, usando 12,6 pmoles de N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA^{Fen} (5.000 cpm) y 7,5 pmoles de N-Ac [¹⁴C] Val-tRNA^{Val} (3.500 cpm) por tubo. La concentración de proteínas usadas en el ensayo con N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA^{Fen} fue de 22 x 10⁻³ mg/tubo y 1,34 x 10⁻³ mg/tubo para las fracciones 0-60% y 60-80% respectivamente. El otro sustrato fue ensayado en presencia de concentraciones de proteína superiores en un orden de magnitud.

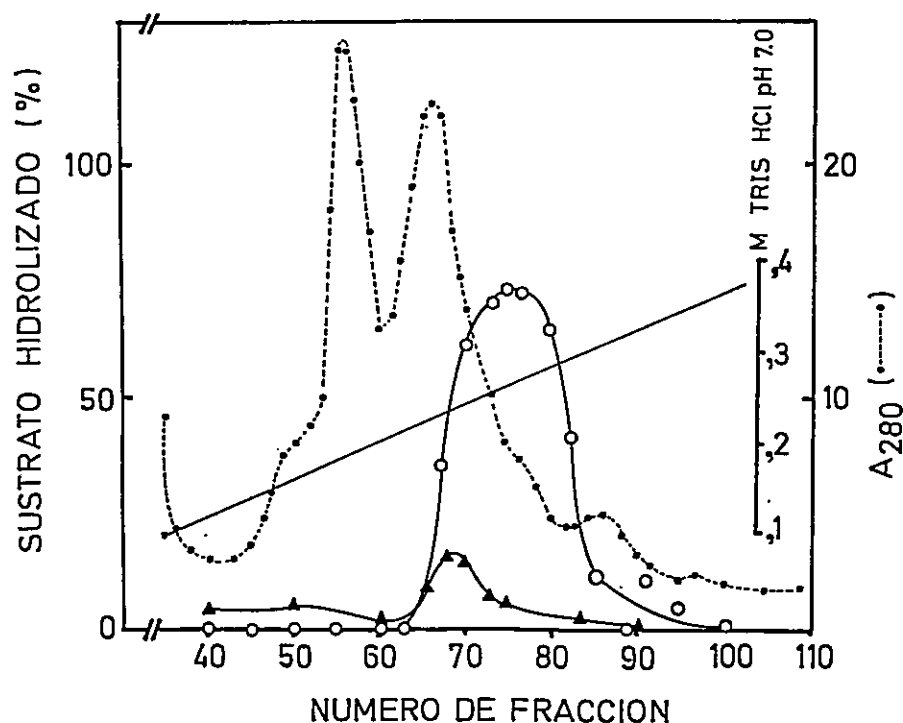
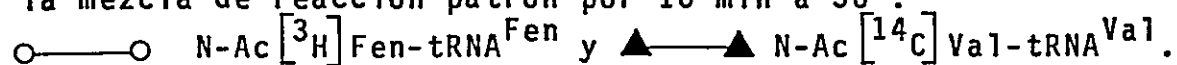


Figura 10. Fraccionamiento de peptidil y N-AcFen-tRNA hidrolasas por cromatografía en DEAE-Sephadex A-50.

El extracto crudo de la cepa híbrida de levadura se cromatografió en una columna de DEAE-Sephadex A-50 (2,5 x 18 cm) como se describe en Métodos. Se colectaron fracciones de 6 ml a un flujo de 30 ml/hr. La actividad de las fracciones se determinó en alícuotas de 10 μ l cuando se usó como sustrato N-Ac [3 H]Fen-tRNA^{Fen} (1760 cpm) y de 50 μ l en las reacciones con N-Ac [14 C]Val-tRNA^{Val} (3500 cpm). Estos sustratos fueron obtenidos aminoacilando tRNA total de levadura con los aminoácidos radioactivos correspondientes (y la sintetasa homóloga) los que fueron acetilados con anhídrido acético como se detalla en

Métodos.

La actividad se expresa como porcentaje del sustrato hidrolizado después de incubar la alícuota con el sustrato en la mezcla de reacción patrón por 10 min a 30°.



Concordando con la observación anterior, el pico de actividad hacia N-AcFen-tRNA fue mucho más grande que el que se obtuvo con N-AcVal-tRNA. Aun más, la elución del máximo de los picos no fue coincidente (Figura 10).

La separación definitiva de las dos actividades se logró cuando la fracción enriquecida en actividad hidrolásica, fue sometida a precipitación diferencial con sulfato de amonio.

Como se muestra en la Tabla III la fracción 60-80% presentó una alta actividad hidrolítica sobre N-AcFen-tRNA, no así sobre N-AcVal-tRNA, sustrato con el cual no se pudo detectar ninguna actividad.

Actividad de la N-AcFen-tRNA hidrolasa (fracción 60-80% sulfato de amonio) sobre distintos sustratos.

Con el fin de averiguar si N-AcFen-tRNA hidrolasa presentaba especificidad de especies i.e. capacidad de reconocer N-AcFen-tRNA^{Fen} de E.coli, condición indispensable para poder utilizar el sustrato N-AcFen-tRNA^{Val} que proveería la información para discriminar acerca de él o los sitios de reconocimiento, se determinó la actividad de la fracción obtenida por precipitación con sulfato de amonio (60-80%) frente a N-Ac [¹⁴C]Fen-tRNA^{Fen} y N-Ac [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} de levadura y a N-Ac [¹⁴C]Fen-tRNA^{Fen} y N-Ac [³H]Fen-tRNA^{Val} de E.coli. Como se observa en la Figura 11, exceptuando al N-Ac [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} de levadura, todos los otros sustratos fueron hidrolizados por la enzima. Sin embargo, N-Ac [³H]Fen-tRNA^{Val} fue hidrolizado a una velocidad cinco veces menor que los otros sustratos activos. La preparación de cada uno de los sustratos se realizó como se describe en Métodos. Al igual que N-Ac [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} de levadura, N-Ac [³H]Fen-tRNA^{Val} de E.coli tenía

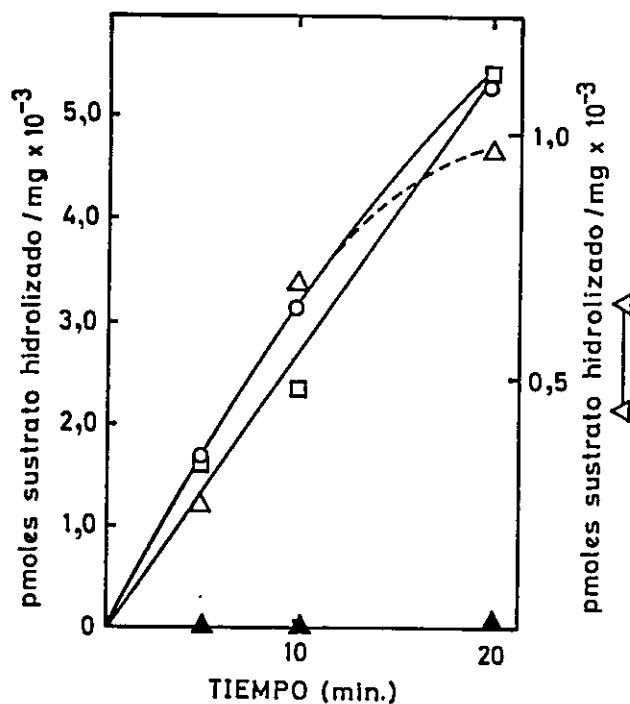


Figura 11. Hidrólisis de distintos N-Acetilaminoacil-tRNA.

La actividad hidrolítica de la fracción que cae en el precipitado 60-80% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se determinó usando cuatro distintos tubos con la mezcla de reacción patrón, cada uno con el sustrato y la cantidad de enzima que se indica. A distintos tiempos, como se señala, la reacción se detuvo y la radioactividad remanente fue cuantificada como se describe en Métodos.

▲ ——— ▲ 3330 cpm (7,3 pmoles) de N-Ac [^{14}C] Val-tRNA^{Val} de levadura ($18 \text{ pmoles}/A_{260}$) y $1,34 \times 10^{-1} \text{ mg}$ de proteína.

- 5000 cpm (12,6 pmoles) de N-Ac ^{14}C Fen-tRNA^{Fen} de levadura (780 pmoles/A₂₆₀) y $1,34 \times 10^{-3}$ mg de proteína.
- 5600 cpm (29,2 pmoles) de N-Ac ^{14}C Fen-tRNA^{Fen} de E.coli (1045 pmoles/A₂₆₀) y $1,34 \times 10^{-3}$ mg de proteína.
- △—△ 4900 cpm (11,3 pmoles) de N-Ac ^3H Fen-tRNA^{Val}₁ de E.coli (58 pmoles/A₂₆₀) y $5,4 \times 10^{-3}$ mg de proteína.

La ordenada de la derecha corresponde a la actividad registrada con el último sustrato.

una baja actividad específica i.e. presencia de una población contaminante de tRNA deacilados. No obstante, la enzima hidrolizó con la misma eficiencia tanto N-AcFen-tRNA^{Fen} de levadura como de E.coli. Consecuentemente, N-AcFen-tRNA₁^{Val} proveía las características requeridas para el sondaje de las regiones del sustrato que son reconocidas por la enzima. Por ello se procedió no sólo a purificar este sustrato sino que también a obtener una preparación más pura de la enzima.

Purificación de N-AcFen-tRNA hidrolasa.

La fracción que contenía la actividad enzimática, obtenida de la precipitación con sulfato de amonio, fue cromatografiada en una columna de Sephadex G-100 de acuerdo a lo descrito en Métodos. La Figura 12 muestra el perfil de elución obtenido, donde se observa la retención relativa del pico de actividad respecto al resto de las proteínas. Con el conjunto de fracciones que contenían la actividad hidrolítica, se prosiguió la purificación a través de una cromatografía en hidroxilapatita. Como se observa en la Figura 13, la elución con un gradiente de concentración de tampón fosfato de potasio pH 6,8 efectuada como se detalla en Métodos, permitió aislar una fracción purificada de N-AcFen-tRNA hidrolasa. Después de estabilizar con glicerol y albúmina de suero de bovino, el conjunto de fracciones que contenían la actividad enzimática fue guardado a -20°.

Purificación de N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA₁^{Val} de E.coli.

Para aislar N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA₁^{Val} de E.coli se procedió a heteroaminoacilar con [¹⁴C] Fen y Fen-tRNA sintetasa de N.crassa a una fracción enriquecida en tRNA₁^{Val} de E.coli

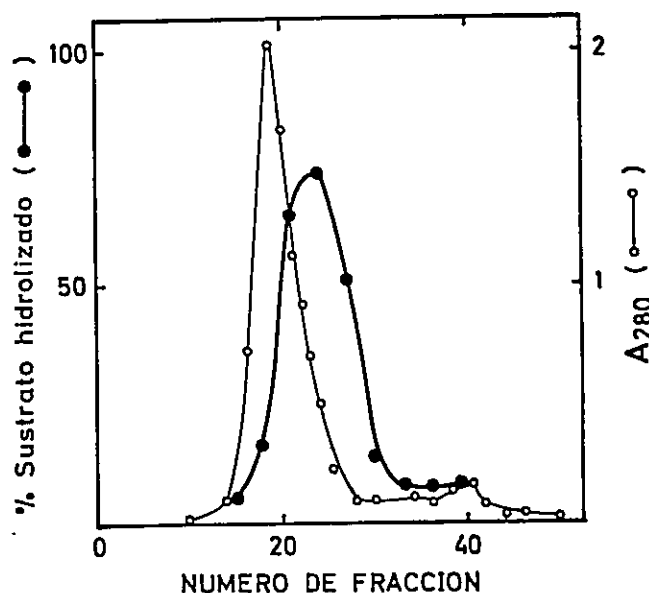


Figura 12. Cromatografía de N-AcFen-tRNA hidrolasa en Sephadex G-100.

La fracción 60-80% obtenida por precipitación con sulfato de amonio se cromatografió en una columna de Sephadex G-100 (1,5 x 57 cm) como se detalla en Métodos. En alícuotas de 25 μ l de cada fracción (3 ml) se detectó la actividad hidrolásica por medio del ensayo patrón.

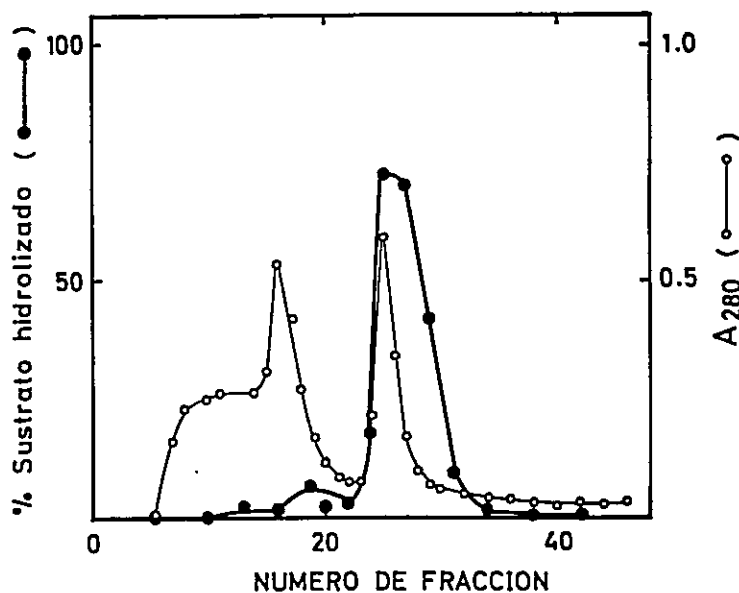


Figura 13. Cromatografía de N-AcFen-tRNA hidrolasa en hidroxilapatita.

La fracción activa proveniente de la filtración en Sephadex G-100, se cromatografió en una columna de hidroxilapatita (1,5 x 4 cm) de acuerdo a lo descrito en Métodos. Se colectaron fracciones de 1,8 ml a un flujo de 70 ml/hr. La actividad se ensayó con la mezcla de reacción patrón, tomando de cada fracción, alícuotas de 50 μ l.

obtenida de una cromatografía en Plaskon, similar a la descrita en el Capítulo I, Figura 7. El producto obtenido fue acetilado con anhídrido acético como se describe en Métodos y purificado por cromatografía en BD-celulosa. Como se muestra en la Figura 14, N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Val} se separó claramente de los tRNA descargados. La naturaleza hidrofóbica del residuo N-AcFen esterificado al tRNA que por sí solo no interactúa fuertemente con la BD-celulosa, fue suficiente para obtener una buena purificación. Después de juntar el pico correspondiente, precipitarlo con EtOH frío y disolverlo en agua bidestilada, se obtuvo N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Val} con una actividad específica de 897 pmoles/A₂₆₀.

Cinética de la hidrólisis de N-AcFen-tRNA de varios orígenes por la N-AcFen-tRNA hidrolasa.

A objeto de determinar si el residuo N-Acetilfenilalanil y/o la región del tRNA que constituye al sustrato es reconocido por la N-AcFen-tRNA hidrolasa, se estudió la actividad de la enzima purificada usando distintos sustratos, N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Fen} de levadura (780 pmoles/A₂₆₀), N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Fen} de E.coli (1045 pmoles/A₂₆₀) y N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Val} también de E.coli (897 pmoles/A₂₆₀). La obtención de los dos primeros sustratos se efectuó como se describe en Métodos y la del último de acuerdo a lo indicado anteriormente (Figura 14).

Como se muestra en la Figura 15, la velocidad de hidrólisis del sustrato formado con tRNA^{Fen} de E.coli fue muy cercana a la obtenida con el sustrato proveniente del tRNA de levadura. Aunque a una velocidad menor (50%), N-Ac [^{14}C] Fen-tRNA^{Val}, fue también hidrolizado eficientemente por la enzima. Al efectuar experimentos controles con N-Ac [^{14}C] Val-tRNA^{Val} de levadura, no se pudo detectar ninguna actividad hidrolítica.

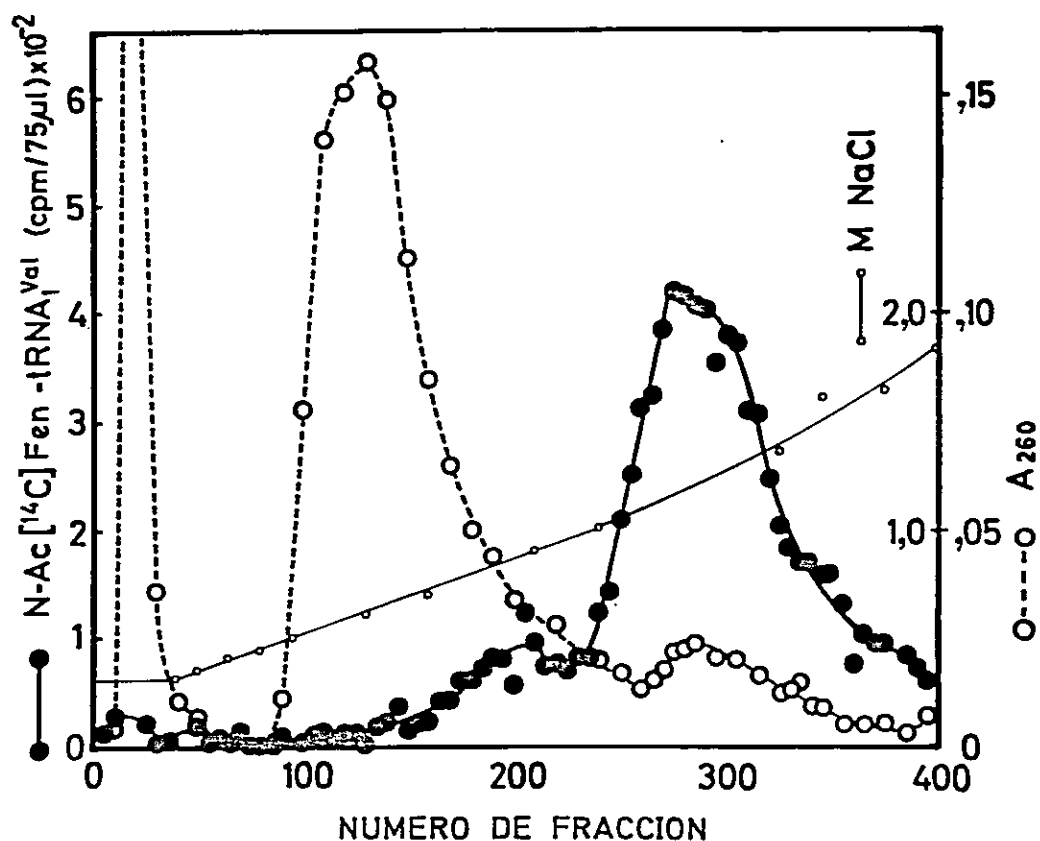


Figura 14. Purificación de N-Ac [¹⁴C]Fen-tRNA^{Val}₁ de *E.coli*. Sobre una columna de BD-celulosa (0,9 x 23 cm) se colocó una solución de 3 ml de formiato de sodio 5 mM pH 4,0, MgSO₄ 10 mM y NaCl 0,3 M en que estaban disueltas 83 UA₂₆₀ de N-Ac [¹⁴C]Fen-tRNA^{Val}₁ de *E.coli* (264 pmoles/A₂₆₀). La columna estaba equilibrada con la misma solución. La cromatografía se efectuó a 4° eluyendo con la solución mencionada más arriba y una gradiente de NaCl como se indica: Se recogieron fracciones de 3,9 ml a un flujo de 39 ml/hr. La radioactividad de cada fracción se cuantificó mezclando alícuotas de 75 µl con 4 ml de una solución de centelleo que contenía Triton X-100 y tolueno.

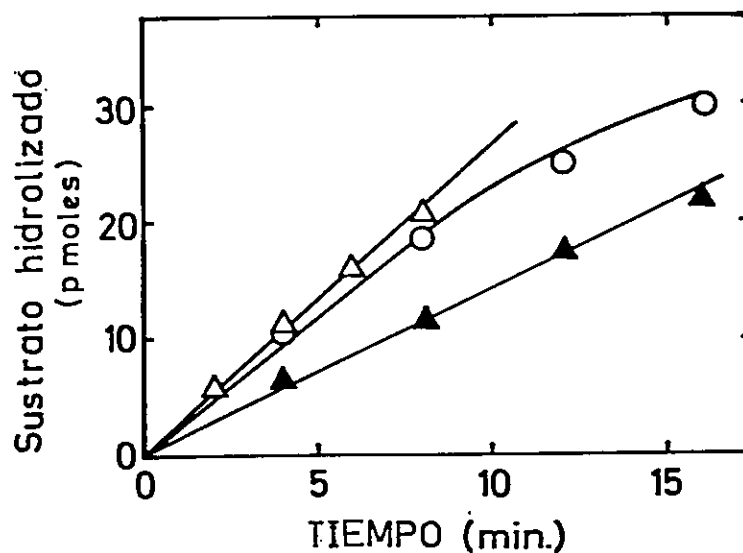


Figura 15. Cinética de la hidrólisis enzimática de distintos N-Acetilfenilalanil-tRNA.

Los ensayos se realizaron en mezclas de reacción patrón, incubando por los tiempos indicados $45,8 \pm 1,0$ pmoles de sustrato y $1,08 \times 10^{-3}$ UA₂₈₀ de la preparación de hidrolasa purificada.

\triangle — \triangle N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA^{Fen} de levadura (780 pmoles/A₂₆₀),
 \circ — \circ N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA^{Fen} (1045 pmoles/A₂₆₀) y
 \blacktriangle — \blacktriangle N-Ac [¹⁴C] Fen-tRNA^{Val}₁ (897 pmoles/A₂₆₀), ambos de E.coli.

Los resultados obtenidos indican que tal como peptidil-tRNA hidrolasa (227) N-AcFen-tRNA hidrolasa no presenta una especificidad de especies estricta ya que sustratos provenientes de E.coli son hidrolizados eficientemente y señalan que el requerimiento estructural que le otorga especificidad a esta enzima, estaría dado por el residuo N-AcFen, como se discutirá en la sección correspondiente.

CAPITULO TERCERO

MODULACION DE LA POBLACION DE tRNA

Cambios selectivos en la población de tRNA durante el desarrollo de la región posterior de la glándula del gusano de seda Bombyx mori.

Durante el quinto estadio larval (V), la glándula del gusano de seda se constituye en uno de los órganos más especializados en síntesis proteica. En efecto, a partir de la segunda parte de este estadio que dura aproximadamente 8 días, la región posterior de la glándula sintetiza sólo fibroína (233-240).

La Figura 16 muestra la electroforesis bidimensional en placa de poliacrilamida de una preparación de [^{32}P]-tRNA que se obtuvo de la región posterior de la glándula en dos diferentes períodos del estadio V. En el recuadro superior de la Figura 16, se distinguen cerca de 30 especies distintas de tRNA. Estas corresponden a una preparación proveniente de las primeras horas del estadio V. El recuadro inferior muestra lo que ocurre al término de la primera parte del estadio V (4° día), justo antes de que comience la síntesis de fibroína. Como se ve en la Figura 16, se detectan cerca de 10 especies de tRNA, con un claro enriquecimiento respecto a su contenido en los inicios del estadio, lo que refleja su participación en el estadio diferenciado de la glándula.

Delaney y Siddiqui (238) observaron que durante el desarrollo de la glándula del gusano de seda, los niveles intracelulares de Gli-tRNA, Ala-tRNA, Ser-tRNA y Tir-tRNA

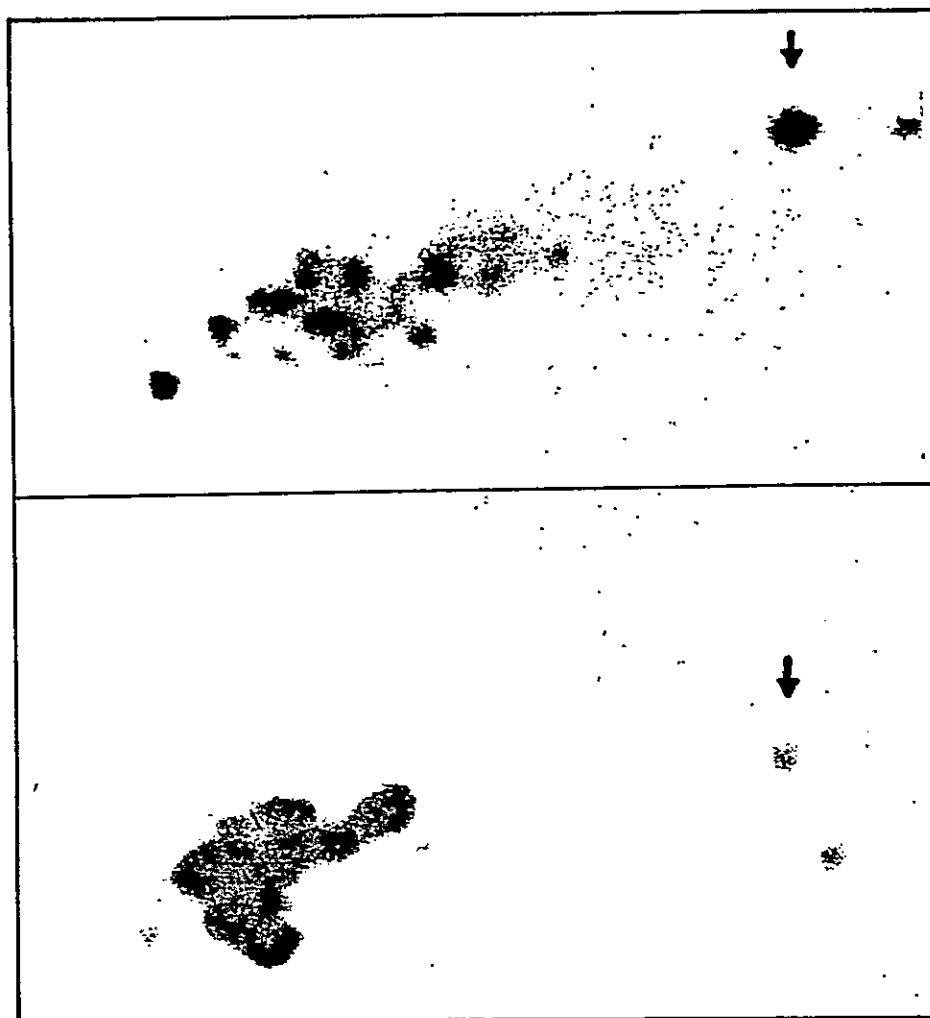


Figura 16. Electroforesis en dos dimensiones de $[^{32}\text{P}]$ -tRNA de la región posterior de la glándula del gusano de seda. La electroforesis se efectuó como se describe en Métodos. Las flechas indican la posición del RNA ribosomal 5S contaminante en las preparaciones de $[^{32}\text{P}]$ -tRNA de la glándula posterior de la glándula de B.mori (245). Cuadro superior: tRNA extraído al inicio del quinto estadio larval. Cuadro inferior: tRNA extraído durante el comienzo de la síntesis masiva de fibroína.

(tRNA específicos para los aminoácidos que constituyen sobre el 90% de la molécula de fibroína) subían aproximadamente 30 veces durante los 4 a 6 días del desarrollo larval, mientras que el aumento de los niveles in vivo de otros aminoacil-tRNA que corresponden a aminoácidos que no se necesitan para la síntesis de fibroína, permanecían bajos, con la sola excepción de Met-tRNA que incrementaba su nivel 24 veces. Metionina no se encuentra en la estructura de la fibroína de la seda.

Una posibilidad para comprender el incremento observado, es que éste tenga su origen en el aumento selectivo de tRNA_{Met} , fundamental para la iniciación de la cadena polipeptídica durante la acelerada síntesis de fibroína que ocurre concomitantemente a la diferenciación terminal de la glándula de B.mori

Fraccionamiento de isoformas de tRNA^{Met} por cromatografía en BD-celulosa.

Para identificar las especies de tRNA^{Met} se extrajo tRNA de la parte posterior de la glándula tanto al inicio (V-1) como al final del estadio larval (V-8). Después de aislar ambas poblaciones de tRNA, éstos fueron aminoacilados con $[\text{}^3\text{H}]$ -metionina y aminoacil-tRNA sintetasas de B.mori, siguiendo el procedimiento general descrito en Métodos. Cuando ambos $[\text{}^3\text{H}]$ -metionil-tRNA fueron fraccionados en sendas columnas de BD-celulosa, dos picos, Met_1 y Met_2 se obtuvieron en cada caso (Figura 17), pero la cantidad relativa entre ellos varió notablemente. Durante el estadio V-1 la razón pico Met_1 /pico Met_2 fue de 0,52 en cambio al término del estadio larval, V-8, la razón aumentó a 1,63 (Tabla IV). Las isoformas de tRNA^{Met} de ambos estadios eluyeron a la misma concentración de sal, por lo que probablemente no existan diferencias cualitativas.

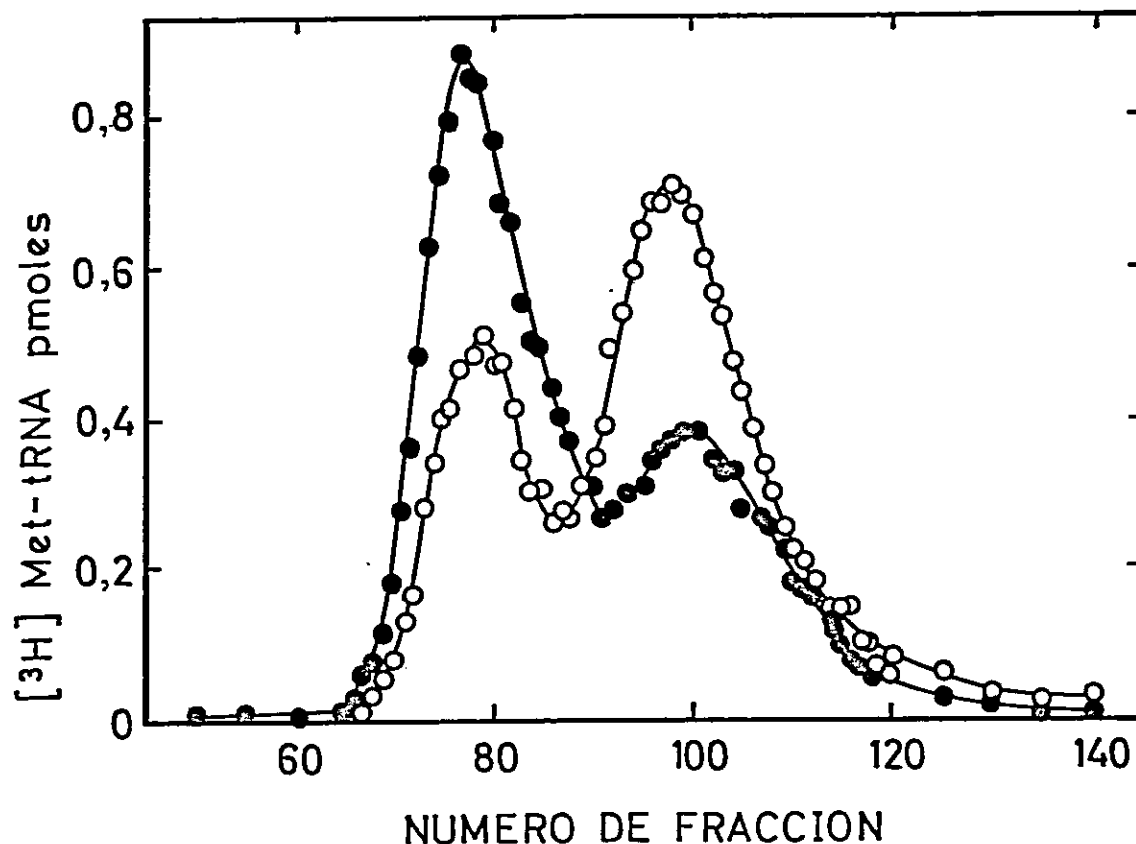


Figura 17. Cromatografía de Metionil-tRNA de *B.mori* en BD-celulosa.

El gráfico representa el resultado de dos cromatografías. Una columna de BD-celulosa (0,5 x 40 cm) fue cargada con 37000 cpm de $[^3\text{H}]$ Met-tRNA de V-1 y otra columna similar con 29500 cpm de $[^3\text{H}]$ Met-tRNA de V-8. Las muestras estaban disueltas en una solución compuesta por acetato de sodio 10 mM pH 4,5, MgCl_2 10 mM, β -mercaptoetanol 1 mM y NaCl 0,35 M. Las columnas estaban equilibradas en la misma solución. La elución se efectuó a 4° con una gradiente lineal de NaCl de 0,35 M a 1 M en la solución mencionada más arriba. Se colectaron fracciones de 1,5 ml a un flujo de 13 ml/hr. La radioactividad se midió contando alícuotas de 1 ml en 10 ml de solución de Bray. La gradiente de sal se midió en alícuotas de las fracciones a través del método de Mohr. El coeficiente de corre-

lación de cada gradiente se calculó con el programa 70803 en una calculadora Hewlett-Packard 9100 resultando valores de 0,9957 y 0,9959 para las cromatografías de tRNA de V-1 y V-8 respectivamente y pendientes de 0,0047 para V-1 y 0,0044 para V-8.

○—○ $[^3\text{H}]$ Met-tRNA de V-1 y ●—● $[^3\text{H}]$ Met-tRNA de V-8.

TABLA IV

CANTIDAD RELATIVA DE ISOESPECIES tRNA^{Met} EN LA
REGION POSTERIOR DE LA GLANDULA DE B.mori

Quinto estadio larval	$\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ (%)	$\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ (%)	$\frac{\text{tRNA}_1^{\text{Met}}}{\text{tRNA}_2^{\text{Met}}}$
1 ^{er} día (V-1)	34	66	0,52
8 ^o día (V-8)	62	38	1,63

Los valores se obtuvieron midiendo el área de cada pico
(Figura 17).

entre las isoformas correspondientes en cada estadio.

Los cambios cuantitativos observados quedaron aun más clarificados cuando los resultados representados en la Figura 17 se regraficaron para señalar la cantidad total en picomoles de cada una de las especies isoceptoras de metionina en cada glándula. Como se observa en la Figura 18, $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ aumentó 12 veces mientras que $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ sólo 4 veces.

Identificación de las isoformas de tRNA^{Met} de la región posterior de la glándula de *B.mori*.

Se sabe que metionil-tRNA sintetasa de *E.coli* reconoce específicamente la especie iniciadora de varios tRNA^{Met} de eucariontes que pueden ser formilados, mientras que las especies no formilables, no son reconocidas por esta sintetasa (154).

A objeto de examinar si la especie $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ de la región posterior de la glándula tenía propiedades semejantes al tRNA iniciador de eucariontes, tRNA del estadio larval V-8 fue fraccionado en una columna de BD-celulosa siguiendo idéntico procedimiento al utilizado en los experimentos representados en la Figura 17, excepto que la esterificación enzimática de $[^3\text{H}]$ -metionina se efectuó con una preparación cruda de aminoacil-tRNA sintetasa de *E.coli*. Como se muestra en la cromatografía de la Figura 19C la especie de tRNA^{Met} heteroacilada con la enzima de *E.coli* eluyó en un solo pico simétrico, cuya posición corresponde exactamente al pico de $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ obtenido por el fraccionamiento bajo condiciones cromatográficas similares (Figuras 19A y B).

Para comparar las propiedades de las dos especies isoceptoras de tRNA^{Met} , 107 UA₂₆₀ de tRNA del estadio V-8 fueron

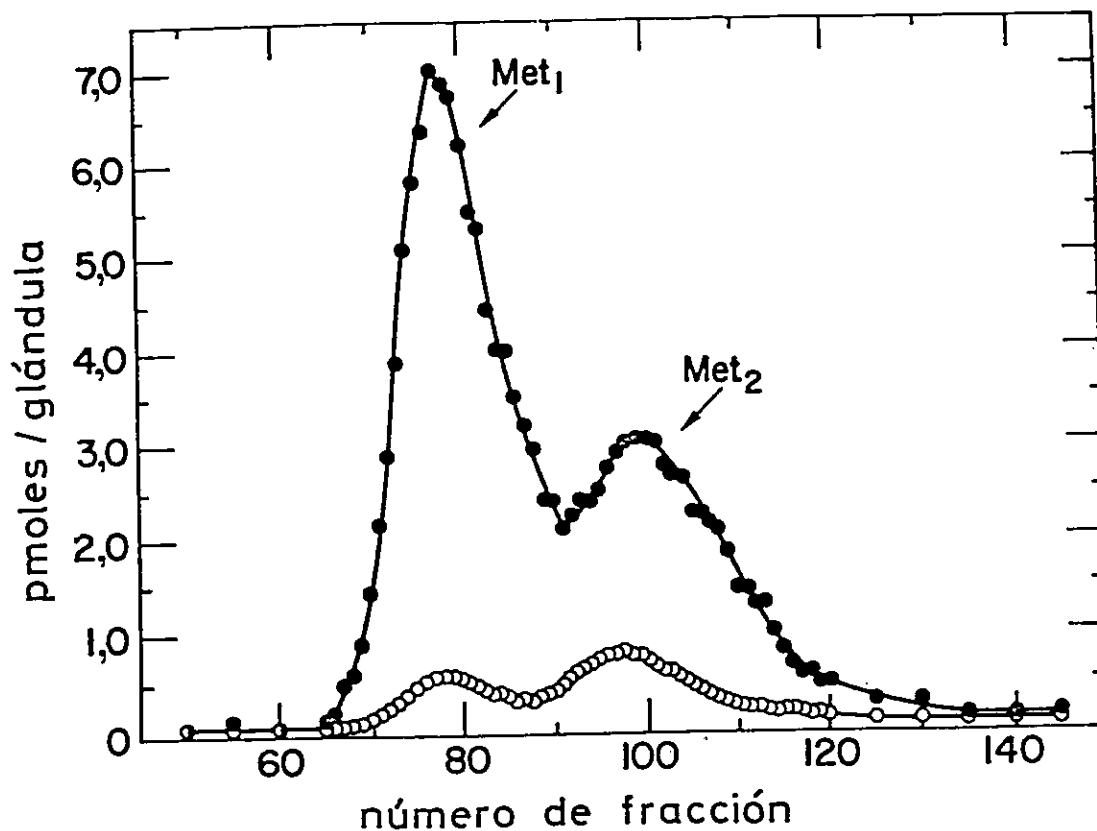


Figura 18. Composición gráfica: Concentración de las iso-especies de $tRNA^{Met}$ en la región posterior de la glándula de B.mori durante su desarrollo.

Los resultados obtenidos en las dos cromatografías que se muestran en la Figura 17, se regraficaron para representar la cantidad de pmoles de tRNA por glándula. Para ello se consideró el contenido total de tRNA en cada glándula: 1,1 UA_{260} en V-1 y 8,0 UA_{260} en V-8 (238, 240).

○ — ○ tRNA de V-1 y ● — ● tRNA de V-8.

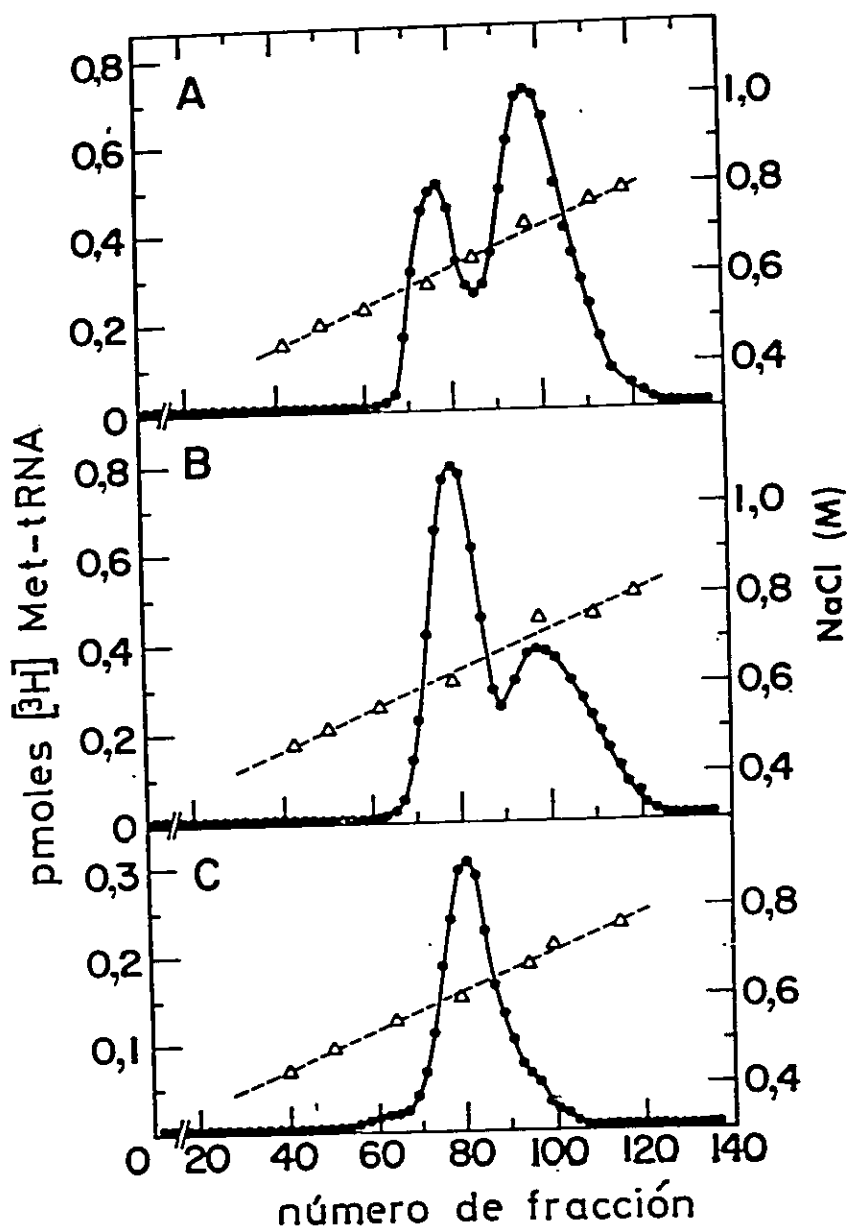


Figura 19. Identificación de la naturaleza del Metionil-tRNA por cromatografía en BD-celulosa.

Los gráficos A y B corresponden a dos cromatografías que se realizaron como se detalla en la Figura 17. En ambas se examinó $[^3\text{H}]$ Metionil-tRNA obtenido por aminoacilación de tRNA de V-1 (A) y de V-8 (B) con una preparación de

sintetasa homóloga. El gráfico C representa una cromatografía similar excepto que la columna fue sembrada con [^3H] Metionil-tRNA (21.600 cpm) obtenido por aminoacilación con una preparación de aminoacil-tRNA sintetisas de E.coli. La cuantificación de la gradiente de NaCl y de la radioactividad se efectuó como se detalla en la Figura 17.

cromatografiadas en escala preparativa en una columna de BD-celulosa (Figura 20). Para aislar $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ y $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ las fracciones correspondientes fueron concentradas por precipitación con EtOH y los tRNA disueltos en agua bidestilada. A cada una de estas especies de tRNA^{Met} se le determinó su capacidad para aceptar metionina en ensayos de aminoacilación con sintetetasas de gusano de seda y de E.coli, como también su capacidad de ser formiladas usando la preparación cruda de sintetetasas de E.coli que contenía actividad de transformilasa.

La cinética de aminoacilación de $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ y $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ como también la de la formilación de $\text{Met-tRNA}_1^{\text{Met}}$ se muestra en la Figura 21. El nivel de saturación de la enzima de E.coli presente en la mezcla de reacción catalizó la rápida formación de metionil- y formil-metionil-tRNA. Los productos permanecieron estables durante los 50 min del ensayo. Claramente, sólo una pequeña fracción (12%) de $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ fue capaz de ser aminoacilada por la sintetasa de E.coli y escasamente un 3% del producto fue formilado. En cambio, $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ fue aminoacilado por la enzima de E.coli a un nivel correspondiente al 81% del que catalizó la enzima homóloga proveniente de gusano de seda. Los resultados obtenidos se representan cuantitativamente en la Tabla V e indican que la especie de tRNA^{Met} que se incrementa selectivamente en la región posterior de la glándula durante el segundo período del estadio larval V donde se sintetiza sólo fibrofina, exhibe propiedades que corresponden a las que presentan en general los tRNA^{Met} iniciadores en eucariontes.

Compartimentalización y especialización de la población de tRNA^{Ala} en B.mori.

Para investigar si la notoria modulación de la población

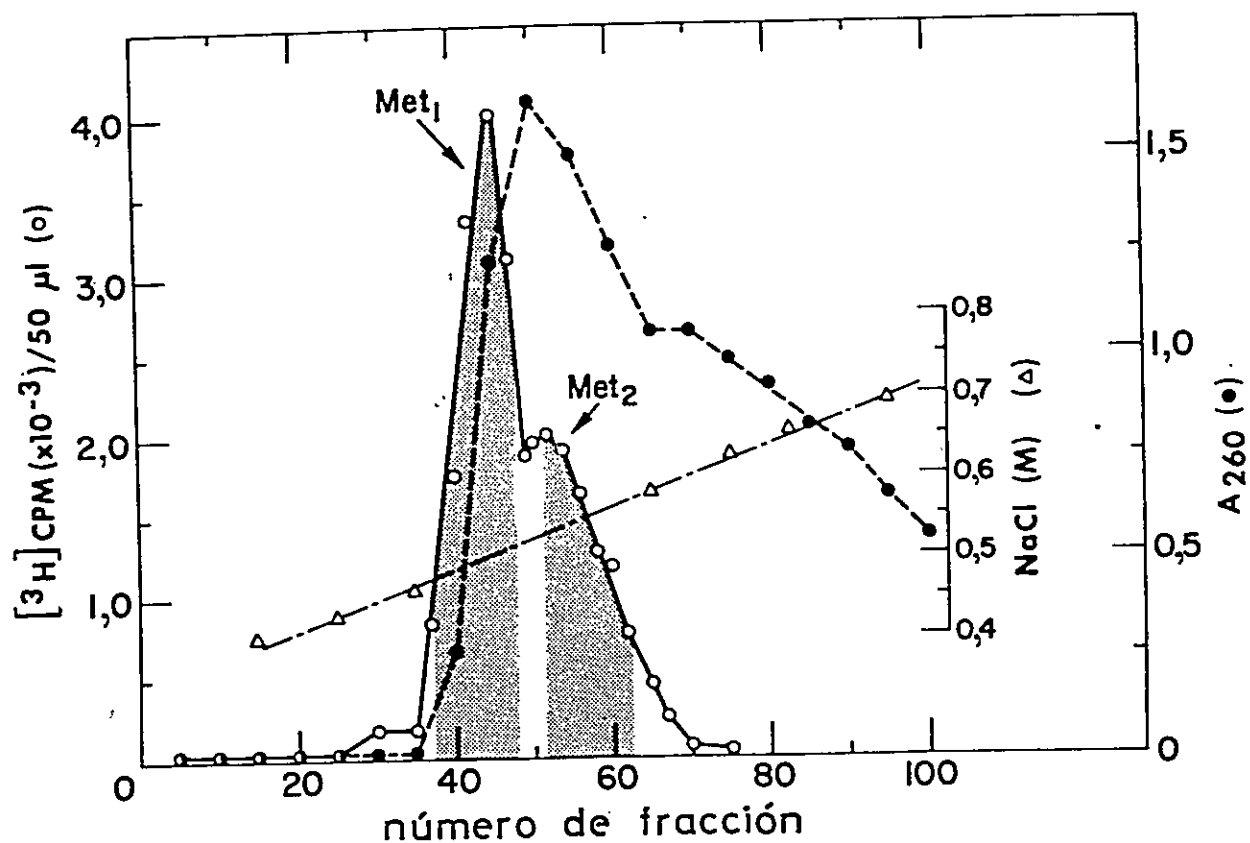


Figura 20. Fraccionamiento de tRNA^{Met} de B.mori en BD-celulosa.

En una columna de BD-celulosa (0,5 x 40 cm) se cromatografiaron 107 UA_{260} de tRNA total de la región posterior de la glándula (V-8), usando las mismas condiciones descritas en la Figura 17. Para determinar la capacidad de aceptación de $[^3\text{H}]\text{Met}$, el tRNA contenido en las alícuotas (50 μl) de cada fracción (1,5 ml) fue aminoacilado en la mezcla de ensayo patrón, tal como se describe en Métodos. Las fracciones que contenían las isoformas de tRNA^{Met} (áreas sombreadas) se juntaron y los tRNA fueron recuperados por precipitación con etanol frío.

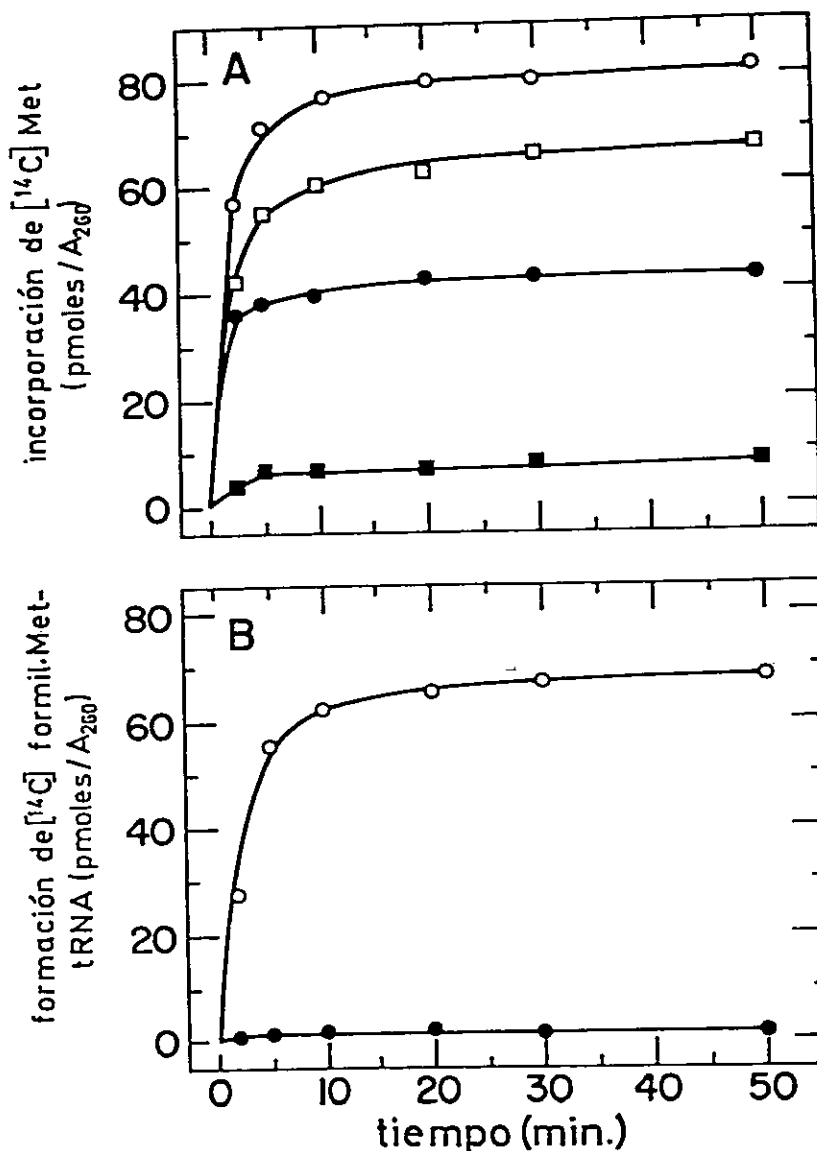


Figura 21. Cinética de la aminoacilación y formilación de tRNA^{Met} .

Se incubaron alícuotas de preparaciones parcialmente purificadas de $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ y de $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ (obtenidas por cromatografía en BD-celulosa, Figura 20), 4,3 y 5,0 UA_{260} respectivamente, con $[^{14}\text{C}]\text{Met}$ y sintetetas de la glándula de *B.mori*, en 1,4 ml de la mezcla de reacción patrón descrita en Métodos. A los intervalos de tiempo indicados se extrajeron alícuotas de 200 μl de cada mezcla y después de precipitarlas con TCA se cuantificó la radioactividad contenida en

ellas (ver Métodos).

La aminoacilación heteróloga con la enzima de E.coli se efectuó en una mezcla de reacción patrón como se describe en Métodos, cuantificando la radioactividad incorporada a los tiempos que se señalan en el gráfico.

Para cuantificar la formilación, el tRNA se incubó por 5 min en la misma mezcla usada para la aminoacilación heteróloga con enzima de E.coli, excepto que $[^{14}\text{C}]$ Met fue reemplazado por $[^{12}\text{C}]$ Met y que después de los 5 min de incubación se agregó ácido $\text{N}_{5,10}$ - $[^{14}\text{C}]$ meteniltetrahidrofolato (44 cpm/pmole) para alcanzar una concentración final de 0,6mM. A los tiempos indicados se extrajeron alícuotas en las que se cuantificó la radioactividad, de la misma manera que para los ensayos de aminoacilación.

A.- incorporación de Met; \circ — \circ tRNA₁^{Met} y \bullet — \bullet tRNA₂^{Met}
 cargados ambos con enzima de B.mori. \square — \square tRNA₁^{Met} y
 \blacksquare — \blacksquare tRNA₂^{Met}, aminoacilados con enzima de E.coli.
 B.- formilación de \circ — \circ tRNA₁^{Met} y \bullet — \bullet tRNA₂^{Met}.

TABLA V

AMINOACILACION Y FORMILACION DE tRNA^{Met} DE LA PARTE
POSTERIOR DE LA GLANDULA DEL GUSANO DE SEDA

Origen de la enzima	Formación de [¹⁴ C]Met-tRNA ^{Met} ₁	Formación de [¹⁴ C]Met-tRNA ^{Met} ₂	Formación de [¹⁴ C]Formil-Met-tRNA ^{Met} ₂
<u>E.coli</u>	62,5	4,7	67,2
<u>B.mori</u>	77,4	40,2	-

(a) pmoles de [¹⁴C]Met incorporados por 1 UA₂₆₀ ya sea por la sintetasa homóloga de B.mori o la heteróloga de E.coli.

(b) pmoles del residuo [¹⁴C]formilo incorporados a [¹²C]Met-tRNA por la enzima de E.coli.

Los datos fueron extraídos de la Figura 21. Ver leyenda correspondiente.

de los tRNA correspondientes a los aminoácidos que constituyen a la fibroína, se refleja en una clara especialización de tRNA específicos respecto a la compartimentalización biológica estructural y/o funcional, se caracterizaron las especies de tRNA^{Ala} tanto de la región posterior como de la región media de la glándula del gusano de seda.

Como se observa en la Figura 22, al cromatografiar en BD-celulosa [³H]-Ala-tRNA obtenido aminoacilando tRNA extraído de la porción media de la glándula en el estadio larval V (6° día), se resolvieron claramente dos picos (I y II) de radioactividad. Lo mismo ocurrió cuando se examinó el comportamiento de [³H]-Ala-tRNA proveniente de la región posterior de la glándula (estadio larval V, 6° día) en una columna de BD-celulosa bajo condiciones similares (Figura 23). La cantidad de tRNA^{Ala} en el pico I y II fue de $23 \pm 3\%$ y $77 \pm 3\%$ para la región posterior y $38 \pm 2\%$ y $62 \pm 2\%$ para la región media de la glándula, respectivamente.

Cuando se examinaron los dos picos principales (Pico II) de tRNA^{Ala} de ambas regiones de la glándula mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en urea, se encontró que el pico II obtenido de la parte posterior contenía dos especies isoceptoras de tRNA^{Ala}, tRNA_{2a^{Ala} y tRNA_{2b^{Ala}, en una razón de 2:1, mientras que el pico II de la porción media contenía sólo una especie, tRNA_{2b^{Ala}, cuya movilidad era idéntica a la iso especie tRNA_{2b^{Ala} de la región posterior de la glándula (Figura 24). Un análisis preliminar del pico I (no se muestra) reveló en la parte posterior de la glándula sólo una iso especie tRNA_{1a^{Ala}. En cambio, en la región media aparentemente existían dos especies, tRNA_{1a^{Ala} y tRNA_{1b^{Ala}, la primera con una movilidad similar a la observada con tRNA_{1a^{Ala} de la región posterior.}}}}}}}}

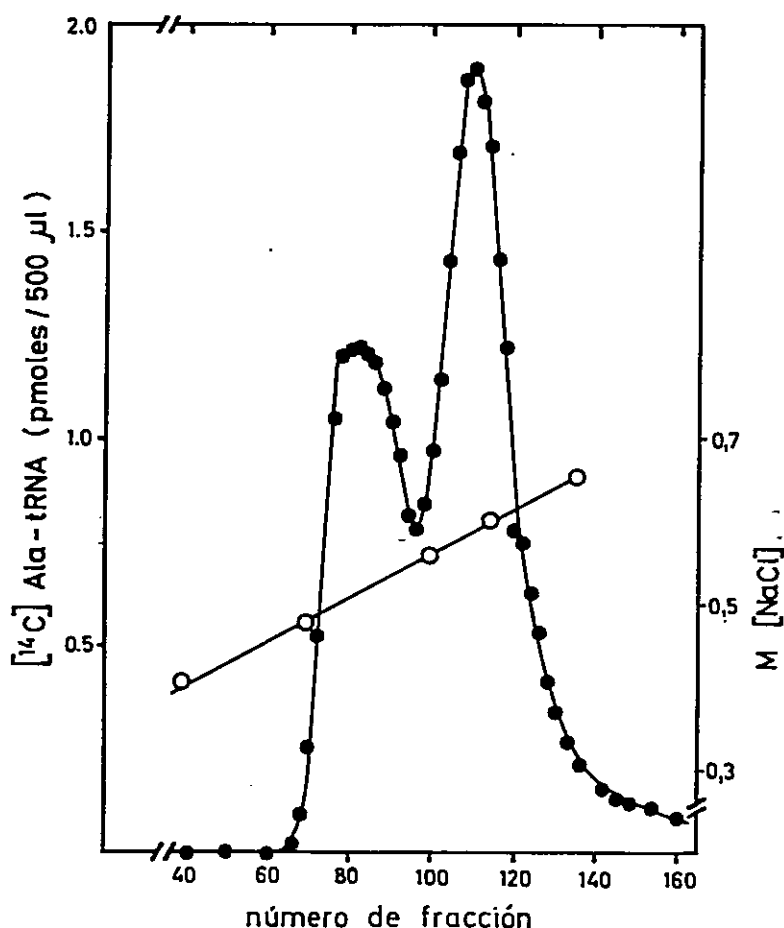


Figura 22. Cromatografía de [¹⁴C]Ala-tRNA^{Ala} de la región media de la glándula de B.mori.

Una muestra de 300 pmoles de [¹⁴C]Ala-tRNA (92.000 cpm) de la región media de la glándula de B.mori (V-6), fue disuelta en 6,5 ml de la solución equilibrante y aplicada sobre una columna de BD-celulosa (0,5 x 64 cm) previamente equilibrada en una solución compuesta de acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, acetato de magnesio 10 mM, β-mercaptoetanol 1 mM y NaCl 0,3 M. La elución se efectuó a 4° con la misma solución, usando una gradiente de NaCl

como se indica en el gráfico. Se colectaron fracciones de 1,5 ml y se cuantificó la radioactividad contando alícuotas de 0,5 ml en una solución de centelleo que contenía tolueno y Tritón. La recuperación de la radioactividad alcanzó al 88%.

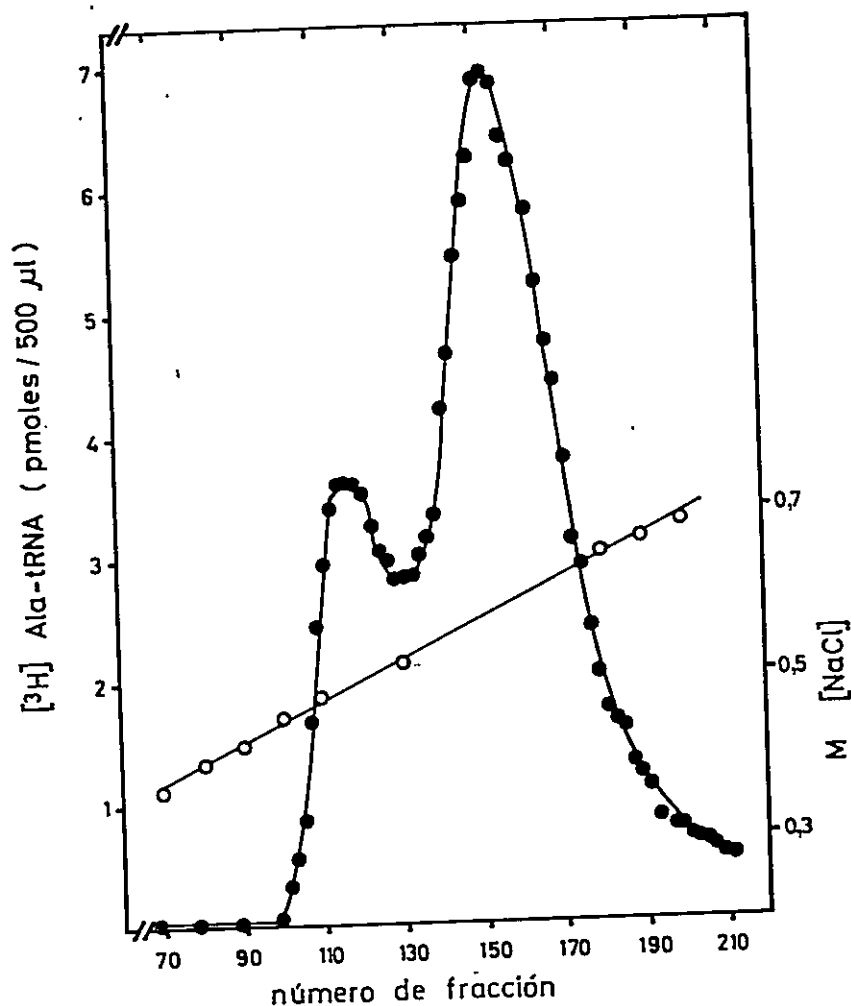


Figura 23. Cromatografía de $[^3\text{H}]\text{Ala-tRNA}^{\text{Ala}}$ de la parte posterior de la glándula de B.mori.

Una muestra de 374 pmoles de $[^3\text{H}]\text{Ala-tRNA}^{\text{Ala}}$ ($2,9 \times 10^6$ cpm) de la región posterior de la glándula del gusano de seda (V-6), fue disuelta en 0,9 ml de la solución equilibrante y colocada sobre una columna de BD-celulosa ($0,5 \times 40$ cm). La elución y análisis de las fracciones se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 22, excepto que se usaron alícuotas de 0,5 ml para medir la radioactividad. La recuperación de las cpm fue de 87%.

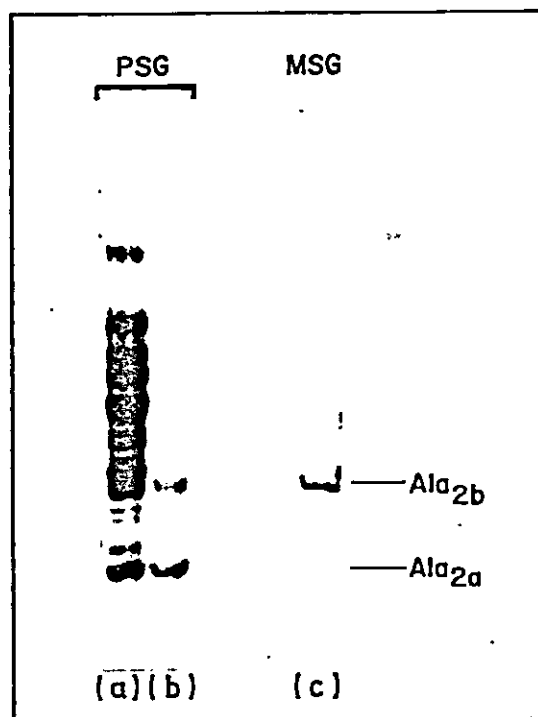


Figura 24. Electroforesis en gel de acrilamida de tRNA^{Ala} de la región media y posterior de la glándula del gusano de seda.

La electroforesis se efectuó en un gel de acrilamida al 20% en urea 4 M y tampón Tris-borato pH 8,3 como se detalla en Métodos.

- a) tRNA total de la región posterior de la glándula (V-6).
- b) tRNA contenido en el pico II (Figura 23) obtenido por fraccionamiento del tRNA analizado en (a).
- c) tRNA contenido en el pico I (Figura 22) obtenido por fraccionamiento de tRNA de la región media de la glándula de B.mori (V-6).

La heterogeneidad del pico I de la columna de BD-celulosa correspondiente a la región media de la glándula (ver Figura 22) se hizo evidente, cuando el correspondiente tRNA deacilado fue examinado cromatográficamente. En efecto, cuando se cromatografió en BD-celulosa tRNA deacilado junto a [^3H] Ala-tRNA de la región media, como se muestra en la Figura 25, se observaron tres picos de actividad en el perfil de la capacidad aceptora de [^3H] Ala de las fracciones, los dos primeros coincidiendo con la posición de elución del pico I. Para estudiar si las diferencias que se observaron en el comportamiento cromatográfico entre [^3H] Ala-tRNA y el tRNA deacilado provenientes de la parte media de la glándula, se podrían reflejar también en la conducta de las iso-especies de tRNA de la región posterior de la glándula, e.g. detección de dos picos coincidiendo con el pico II, se cromatografió en forma conjunta [^3H] Ala-tRNA y tRNA descargado provenientes de la parte posterior. La Figura 26 muestra el resultado obtenido en la columna de BD-celulosa. A través del ensayo de aceptación de aminoácidos se resolvieron nuevamente sólo dos picos. Sin embargo, la elución del tRNA deacilado precedió a la del aminoacilado, siendo notoria la diferente magnitud del desplazamiento que ocurrió en cada uno de los dos picos. En efecto, en el pico II el retardo de [^3H] Ala-tRNA respecto al tRNA deacilado fue bastante mayor que el observado a nivel del pico I.

Tanto el examen cromatográfico como el efectuado a través de electroforesis en geles de poliacrilamida, indican con bastante certeza que la especialización de iso-especies de tRNA^{Ala} en la glándula del gusano de seda, está asociada a la compartimentalización estructural de esta última la que a su vez está íntimamente relacionada a una marcada diferenciación funcional.

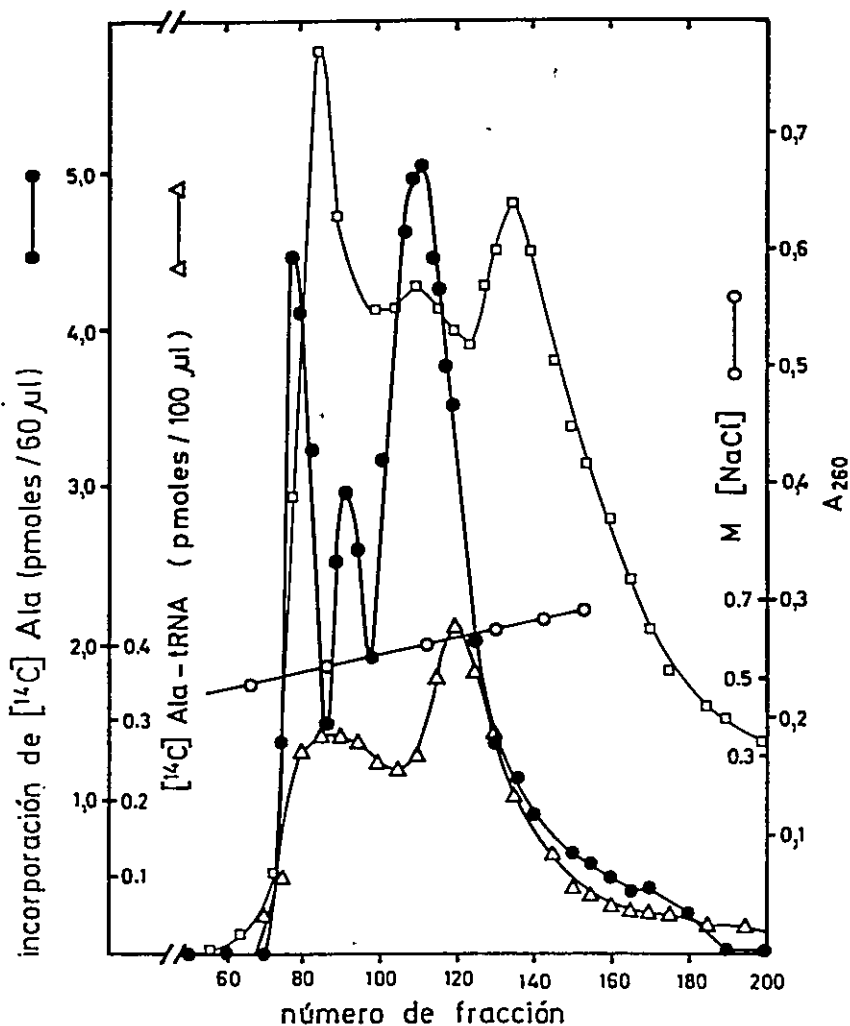


Figura 25. Cromatografía de $tRNA^{Ala}$ y $[^{14}C]Ala-tRNA$ de la región media de la glándula de B.mori.

Una muestra con 148 UA_{260} de $tRNA$ deacilado y 504 pmoles de $[^{14}C]Ala-tRNA$ (147.000 cpm) ambos de la región media de la glándula de B.mori V-6, el último obtenido al aminoacilar 9,7 A_{260} UA_{260} de $tRNA$ total con $[^{14}C]Ala$ como se describe en Métodos, fue colocada sobre una columna de BD-celulosa (0,5 x 64 cm). La cromatografía se llevó a cabo de la misma manera que la descrita en la Figura 22. La aceptación de aminoácidos de las fracciones que contenían los $tRNA$ deacilados se midió incubando alícuotas de 75 μl con $[^{14}C]Ala$ en mezclas de reacción patrón, de

acuerdo a los procedimientos señalados en Métodos. La radioactividad de las fracciones (presencia de $[^{14}\text{C}]\text{Ala-tRNA}^{\text{Ala}}$) se midió con alícuotas de 0,5 ml por fracción usando una mezcla de centelleo de tolueno y Tritón. La recuperación de la radioactividad fue del 84%.

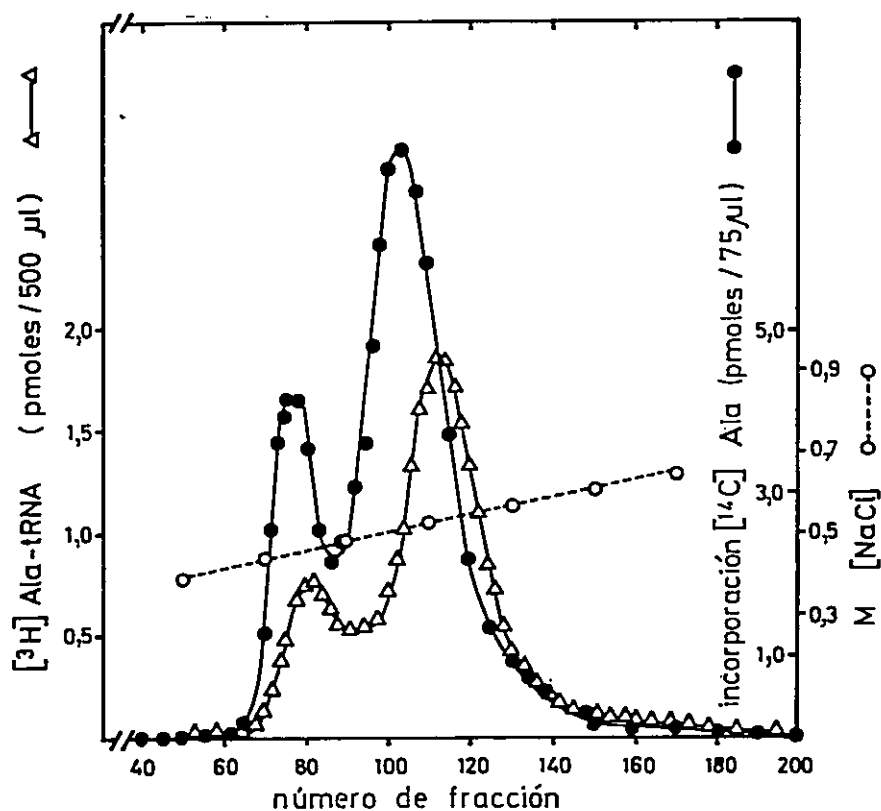


Figura 26. Cromatografía de tRNA^{Ala} deacilado y [³H]Ala-tRNA^{Ala} de la región posterior de la glándula de B.mori.

Una muestra de 17 UA₂₆₀ de tRNA deacilado y 180 pmoles de [³H]Ala-tRNA (1,2 x 10⁶ cpm), ambos de la región posterior de la glándula de B.mori (V-6), el último obtenido al aminoacilar 0,8 UA₂₆₀ de tRNA con [³H]Ala como se describe en Métodos, fue aplicada sobre una columna de BD-celulosa (0,5 x 64 cm). La cromatografía y análisis de las fracciones se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 25, excepto que la radioactividad se midió en alícuotas de 0,1 ml. La recuperación de [³H]Ala-tRNA fue del 103%.

Modulación de los niveles intracelulares de aminoacil-tRNA asociados a la aclimatación del pez Cyprinus carpio.

Se sabe que la síntesis proteica está involucrada en la adaptación de los animales ectotérmicos acuáticos, a cambios naturales de temperatura (241). Sin embargo, se desconoce si durante este proceso existe una modulación de la población de tRNA.

Para estudiar el comportamiento de la población de tRNA durante la aclimatación (entendido este término como el proceso de adaptación al que los animales se someten frente a los cambios naturales del medio, e.g. variación estacional), se procedió a aislar tRNA de hígado de carpas de verano y de invierno, estaciones en que la temperatura de su habitat era de 9-10° y 16-18° respectivamente (242-244). Como se muestra en la Tabla VI, la cantidad de tRNA que se obtuvo a partir de hígados de carpas aclimatadas a verano fue 70% más alta que la que se obtuvo con los animales adaptados a invierno.

El estudio del contenido in vivo de especies de aminoacil-tRNA es de particular interés por cuanto los aa-tRNA son los precursores inmediatos de la incorporación de los aminoácidos a la cadena polipeptídica. Consecuentemente, las variaciones de éstos podrían reflejar un mecanismo de regulación que actúa sobre la síntesis de proteínas.

Los niveles in vivo de Val-tRNA, Ala-tRNA y Met-tRNA contenidos en los hígados de carpas aclimatadas a verano e invierno, se determinaron en base a la propiedad que tiene el IO_4^- de inactivar las especies de tRNA deaciladas de acuerdo al procedimiento detallado en Métodos. La capacidad de aceptación de aminoácidos que se obtiene después del tratamiento con IO_4^- permite cuantificar las moléculas que se en-

TABLA VI

CONTENIDO DE tRNA EN EL HIGADO DE LA CARPA

	tRNA UA ₂₆₀ /g de hígado*
VERANO	5,58 ± 1,17 (7)
INVIERNO	3,28 ± 1,04 (9)

P < 0,001

* Tejido húmedo.

El número de experimentos se indica en paréntesis. El tRNA fue extraído de hígados completos de acuerdo al procedimiento descrito en Métodos.

cuentran aminoaciladas in vivo. Si el valor resultante se compara con el obtenido aminoacilando la misma muestra no oxidada, se tiene la proporción de moléculas presentes como aa-tRNA en la población total.

La Tabla VII muestra que el contenido intracelular de los aa-tRNA examinados fue notoriamente más bajo en los animales de verano. Respecto a los peces de invierno, el nivel de Val-tRNA fue 68%, el de Ala-tRNA 47% y el de Met-tRNA 54%.

Estos resultados constituyen la primera evidencia acerca de la ocurrencia de cambios en los niveles intracelulares de aa-tRNA en función de la aclimatación estacional y reflejan además el posible rol regulatorio de los tRNA en la síntesis macromolecular, como se discutirá en la sección correspondiente.

TABLA VII

NIVELES DE AMINOACIL-tRNA in vivo EN HIGADO DE C. carpio

	INVIERNO* (%)	VERANO* (%)
Val-tRNA	92,89 \pm 9,19 (8)	63,00 \pm 9,77 (8)
Ala-tRNA	69,22 \pm 21,06 (5)	32,95 \pm 11,40 (6)
Met-tRNA	81,18 \pm 16,66 (4)	43,53 \pm 13,30 (7)

P < 0,001

* La extensión de la aminoacilación se ensayó usando la mezcla de reacción patrón para C. carpio como se describe en Métodos.

Los tRNA fueron oxidados con IO_4^- y sometidos a hidrólisis no enzimática tal como se detalla en Métodos. Los puntos experimentales que se obtuvieron de cada animal, tanto para los tRNA control como para los tratados, representan al menos el promedio de dos diferentes alícuotas. El número de peces usados (número de experimentos) se señala en paréntesis.

DISCUSION

Los resultados descritos en el capítulo primero demuestran que tanto $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ como tRNA^{Ala} de E.coli son erróneamente aminoacilados por la Fen-tRNA sintetasa de N.crassa, confirmando lo informado originalmente por Barnett (108, 252).

La extensión de la aminoacilación errónea medida en las fracciones obtenidas al cromatografiar en BD-celulosa tRNA total de E.coli (Figura 3), fue distinta a la que se obtuvo en los picos de actividad correspondientes, después de aislado el tRNA contenido en ellos. En efecto, en las fracciones, la esterificación de fenilalanina por la enzima de N.crassa fue de un 70% respecto a la que se alcanzó con el aminoácido y sintetasa homóloga al tRNA, en cambio, el nivel de heteroaminoacilación del tRNA aislado fue muy cercano al 90% (246). El menor valor que se detectó a través del barrido de la columna, podría deberse al contenido de sal en las fracciones, cuya acción inhibitoria es conocida (257).

Las propiedades cromatográficas de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ de E.coli y la de su forma heteroaminoacilada con fenilalanina demuestran que la esterificación con el aminoácido aromático es suficiente para retardar de manera apreciable la elución de este tRNA.

Estas propiedades fueron utilizadas para obtener $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ altamente purificado usando sólo dos etapas cromatográficas en BD-celulosa. La primera, en que se enriquece $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ de E.coli, y la segunda, donde se produce el retardo selectivo del Fen-tRNA₁^{Val} (Figura 6).

Si se introduce un ciclo cromatográfico intermedio, se pueden además separar nítidamente dos especies de tRNA de E.coli, las que pueden ser esterificadas erróneamente con fe-

nilalanina. En efecto, $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ fueron separadas claramente a través de una cromatografía en Plaskon. La heterogeneidad del pico correspondiente a $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ (Figura 7) sugiere la presencia de al menos dos poblaciones de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$. El pico menor podría deberse a la forma entrecruzada de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ donde los residuos $^4\text{SU}_8$ y C_{13} originan una unión covalente como resultado de la irradiación (natural) del tRNA a 335 nm (70-73). Aun cuando los resultados de la columna de RPC-5 pudieran atribuirse a otros factores, es de interés señalar que se ha determinado que la población de $\text{tRNA}_F^{\text{Met}}$ de E. coli con sus residuos $^4\text{SU}_8$ y C_{13} entrecruzados, se puede separar específicamente en una cromatografía de BD-celulosa (258). El entrecruzamiento no altera la formación del derivado aminoacilado $\text{Valil-tRNA}_1^{\text{Val}}$ (73-75, 259).

La introducción del residuo hidrofóbico tanto en la fracción enriquecida de $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ como en la de $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ sirvió para aislar cada una de estas especies usando un ciclo cromatográfico adicional. Como se indica en el capítulo correspondiente, la actividad específica de aceptación de aminoácidos fue de 1368 y 1301 pmoles por UA_{260} para $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ y $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ respectivamente.

Este procedimiento de purificación ofrece una alternativa muy atractiva respecto a otros métodos, entre ellos el descrito por Krauskopf y col. (32) el que requiere fenoxiacetilación del Valil-tRNA para retardar selectivamente su elución en una cromatografía en BD-celulosa. La modificación química (30-32, 230, 231) se evita introduciendo el intermediario aminoacilado erróneamente con la enzima heteróloga. La modificación química presenta varias dificultades. Entre ellas, no siempre se alcanza una reacción completa (31) lo que a menudo ocasiona considerables bajas en el rendimiento del producto que se obtiene. Algunas especies de tRNA purificadas usando

derivados fenoxiacetil-aminoacil-tRNA, son menos activas (32, 72) (i.e. su capacidad de aceptación de aminoácidos medida después de hidrolizar el residuo fenoxiacetil-aminoacilo, es menor que la actividad específica que exhibe el fenoxiacetil-aminoacil-tRNA aislado, referido a pmoles de aminoácido unido por UA₂₆₀). Esta pérdida de actividad sería el resultado de alteraciones químicas (260). Se ha demostrado que el ester N-hidroxisuccinimida del ácido fenoxiacético reacciona con algunos nucleósidos menores, modificando ciertas especies de tRNA (261, 262). Estas desventajas se superan ampliamente con la heteroaminoacilación heteróloga. Aun más, esta última permite discriminar una población de tRNA esencialmente inalterada. En efecto, se ha demostrado que la aminoacilación errónea de tRNA^{Val}₁ de E.coli se bloquea cuando tRNA con el entrecruzamiento ⁴su₈ - C₁₃ se usa como sustrato (259). Así, el tRNA modificado fotoquímicamente se elimina cuando el tRNA enriquecido es heteroaminoacilado para introducirle el residuo hidrofóbico que permite su separación posterior.

Se sabe que varios otros tRNA pueden también esterificarse con fenilalanina utilizando una enzima heteróloga (110, 111). Kern y col. (110) han demostrado que casi todos los tRNA de E.coli podrían heteroaminoacilarse con Fen-tRNA-sintetasa de levadura. Estos autores usaron la fenoxiacetilación de los Fen-tRNA de E.coli aminoacilados erróneamente para caracterizar las especies involucradas, separando los aminoacil tRNA modificados de las moléculas deaciladas por cromatografía en BD-celulosa.

Las ventajas del procedimiento descrito hacen de particular interés extender estos estudios para purificar especies de tRNA distintos a los examinados en esta tesis.

Los resultados que se presentan en el capítulo primero muestran además que los aminoacil-tRNA exhiben distintas pro-

propiedades cromatográficas en BD-celulosa, cuando se estudian en presencia o ausencia de Mg^{2+} . A pH 4,0, Fen-tRNA^{Val}₁ no fue afectado por la ausencia de Mg^{2+} , en cambio Val-tRNA^{Val}₁ se retardó al omitir el catión bivalente desplazando su posición de elución de una concentración de NaCl 0,73 M a una de 0,77 M. El tRNA^{Val}₁ deacilado se desplazó desde NaCl 0,68 M a 0,74 M en ausencia de Mg^{2+} . Las diferencias en la conducta cromatográfica con o sin Mg^{2+} presente, podrían reflejar una diferencia en la configuración asumida por el tRNA al esterificarse con valina o fenilalanina.

La conducta cromatográfica de tRNA^{Ala} de la glándula del gusano de seda, exhibe características que conducen a una interpretación similar. En efecto, los resultados que se presentan en el capítulo tercero, muestran que el perfil de elución del tRNA^{Ala} deacilado es distinto al aminoacilado. Los picos que se obtuvieron ensayando la aceptación de alanina en las fracciones de la columna de BD-celulosa, eluyeron antes que los de los Ala-tRNA correspondientes (Figura 26). El desplazamiento entre el tRNA^{Ala} (pico II) aminoacilado y deacilado, en la región posterior de la glándula, fue mayor que el que se produjo entre ambas formas contenidas en el pico I. El efecto de la aminoacilación fue aun más significativo en el tRNA obtenido de la región media de la glándula. La resolución de los dos picos de aceptación de alanina (tRNA^{Ala}_{1a} y tRNA^{Ala}_{1b} Figura 25) contrasta notoriamente con el pico I, de forma pobre y más bien ancho, que contiene a las especies de Ala-tRNA^{Ala} correspondientes.

Cuando se fracciona tRNA de Halobacterium cutirubrum en BD-celulosa, se resuelven dos isoformas isoceptoras de fenilalanina (257). Como lo observara Griffiths (257), la aminoacilación de una de estas isoformas no produce un desplazamiento de la posición de elución, lo que indica que la afi-

nidad con la BD-celulosa depende de ambos, la naturaleza estructural del tRNA per se y la del aminoácido.

Nuestros resultados sugieren que el aa-tRNA se distingue configuracionalmente del tRNA deacilado y que no sólo la esterificación del aminoácido, sino que también la naturaleza de este último determina (al menos en parte) la estructura de que asume el aa-tRNA.

Las investigaciones acerca de los posibles cambios estructurales que podrían resultar de la aminoacilación del tRNA, generaron una gran cantidad de resultados controvertidos, ya que muchos de los métodos utilizados carecían de la sensibilidad necesaria para la detección de estos cambios (32, 49, 246, 263). Recientemente, Potts y col. (264) usando la dispersión de luz de laser que puede informar acerca de la forma hidrodinámica y la carga electrostática de las macromoléculas, además de la atmósfera iónica asociada, demostraron que en efecto el aa-tRNA y el tRNA deacilado, poseen diferentes configuraciones.

Otro aspecto que se estudió a través de la presente tesis, se relaciona con la búsqueda de los sitios del tRNA comprometidos en la expresión de un proceso que lo involucra. La multiplicidad de actividades biológicas que requieren la participación del tRNA, implican la interacción de este último con una gran variedad de macromoléculas. Por haber sido la primera enzima relacionada a la actividad del tRNA que se descubriera, y más aún, por su importancia para la fidelidad de la traducción del mensaje genético, el reconocimiento entre aminoacil-tRNA sintetasas y tRNA, probablemente es el que ha sido más investigado (ver rev. en ref. 49, 94, 95).

La obtención del producto de la aminoacilación errónea mediada por Fen-tRNA sintetasa, permitió el examen de las bases moleculares del reconocimiento, entre una enzima recientemente descubierta, la N-AcFen-tRNA hidrolasa y el sustrato de

ella N-AcFen-tRNA^{Fen}. Aunque aun se desconoce la función de esta enzima que hidroliza el residuo N-AcFen del tRNA^{Fen} en levadura y Artemia salina (223, 232) su existencia promueve particular interés ya que se sabe que N-AcFen-tRNA es el único aa-tRNA, que aparte del tRNA iniciador fisiológico, es reconocido tanto por los factores de iniciación de procariontes como de eucariontes (265, 266). Existen algunas evidencias acerca de la acetilación de algunos aa-tRNA (267, 268). Coloma y Heredia (225) plantean la posibilidad que la acción de esta hidrolasa se relacione al proceso de síntesis proteica. Específicamente, esta enzima mantendría bajos los niveles intracelulares de N-AcFen-tRNA₁ evitando así interferencias con el proceso de iniciación.

Nuestros estudios demuestran que N-AcFen-tRNA^{Fen} de levadura, y N-AcFen-tRNA^{Fen} y N-AcFen-tRNA₁^{Val} ambos de E.coli son hidrolizados por la N-AcFen-tRNA hidrolasa de levadura. Coloma y Heredia (225) publicaron recientemente que N-AcFen-tRNA^{Fen} de E.coli era hidrolizado a una velocidad mucho más baja (25%) que la que se observa con el sustrato homólogo. Nosotros hemos encontrado en forma consistente y repetitiva la misma cinética de hidrólisis con N-AcFen-tRNA^{Fen} tanto de E.coli como de levadura, usando el extracto crudo y la preparación purificada de hidrolasa (189, 269). Aun cuando la peptidil-tRNA hidrolasa es una enzima diferente, es de interés mencionar que ella no presenta especificidad de especies ya que el tRNA de ambos, E.coli y levadura pueden ser usados para conformar su sustrato (227).

Los resultados descritos en el capítulo segundo indican que la N-AcFen-tRNA hidrolasa de levadura no presenta requerimientos estrictos por una molécula de tRNA específica, ya que tRNA^{Val} de E.coli sirvió para configurar un sustrato adecuado para la enzima, y sugieren que la base molecular que otorga

especificidad a esta hidrolasa es el residuo N-AcFen esterificado a la ribosa de la adenosina 3' terminal de la molécula de tRNA. Los tres tRNA utilizados para sintetizar los sustratos que proveerían las características requeridas para el sondaje de las regiones implicadas en el reconocimiento de la enzima poseen algunas secuencias comunes. En efecto, como se puede observar en la Figura 27, existen secuencias comunes en el tallo y parte del asa D, fuera de la secuencia GTTCG ampliamente conservada en el asa TFC (44). La posibilidad que estas secuencias fueran responsables del reconocimiento puede descartarse ya que recientemente se ha encontrado que N-AcVal-tRNA^{Fen} no sirve de sustrato para esta hidrolasa (225).

El estudio de la regulación de los procesos biomoleculares reviste un interés muy especial ya que si no se conoce como se regula un sistema biológico no se puede comprender integralmente el mecanismo molecular que lo rige. Numerosos hallazgos han implicado a las moléculas de tRNA en procesos regulatorios de la expresión génica (150, 156-169). Nuestros estudios acerca del posible rol del tRNA en estos procesos se realizaron en dos organismos con características funcionales muy particulares.

Un par de glándulas (región posterior) del gusano de seda B.mori, está formado por aproximadamente 1.000 células que sintetizan cerca de 300 mg de fibroína durante la segunda mitad del quinto estadio larval (233, 237). Cada célula contiene cerca de 0,2 µg de DNA (233, 235) del cual alrededor de 0,0022% codifica para la fibroína de la seda (235). Durante el período de desarrollo el mRNA de la fibroína se acumula hasta constituir un 1% del RNA celular (10^{10} moléculas de mRNA) (235). Puesto que el mRNA es estable (76) las moléculas de mRNA traducen 10^{15} moléculas de proteína en 4 días (235, 237) a una velocidad 60 veces superior a la de la sín-

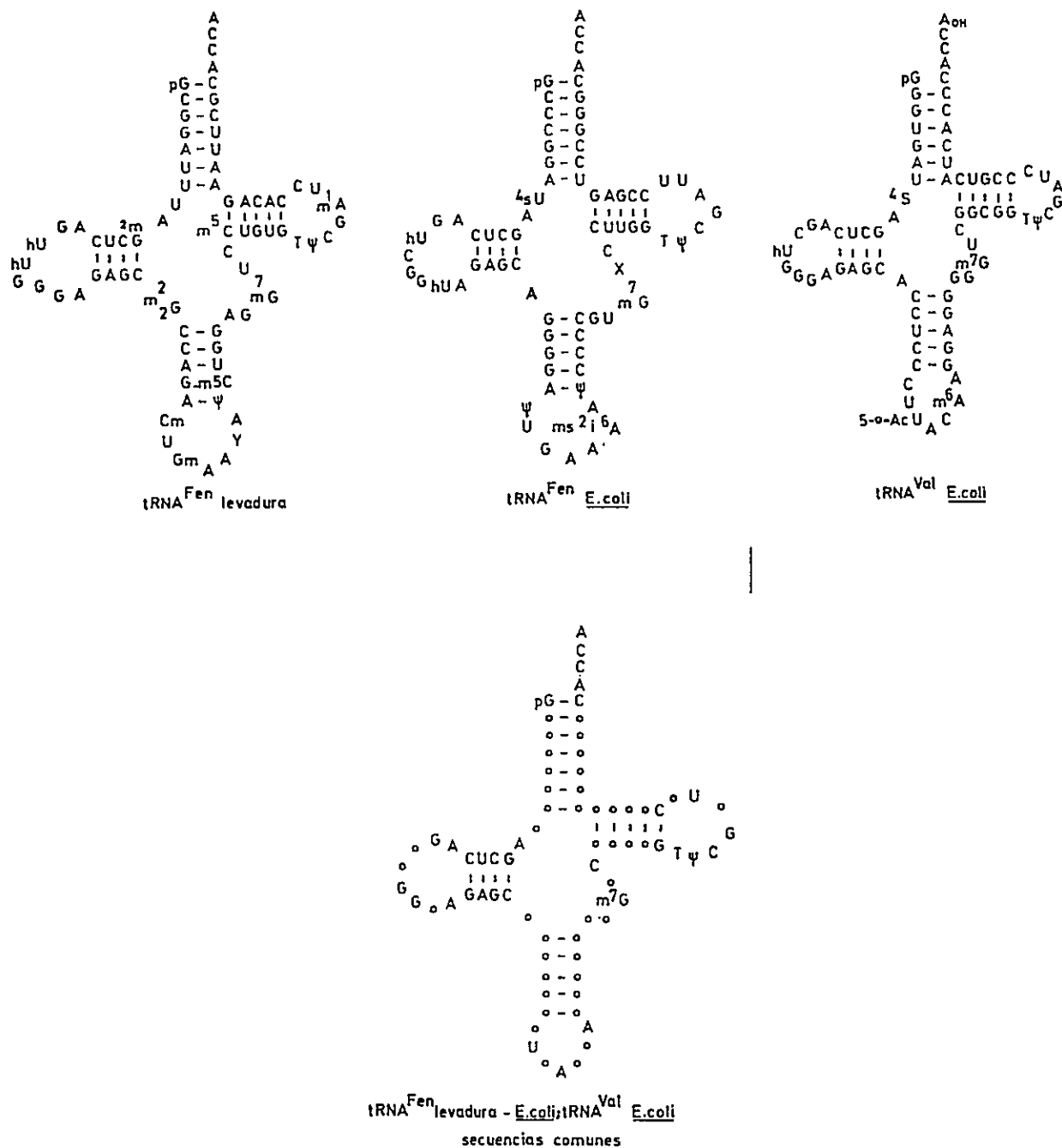


Figura 27. Estructura primaria y secundaria de tRNA^{Fen} de levadura y E.coli y de tRNA^{Val} de E.coli (44).

tesis de albúmina en hígado de pollo (237). Para satisfacer tan alta eficiencia, la célula tiene que contar con una programación de su población de tRNA, tanto respecto a su síntesis como a su utilización, que responda adecuadamente a los exigentes requerimientos de estas células tan especializadas.

Los resultados que se presentan en el capítulo tercero, confirman la existencia de una adaptación de la población de tRNA durante el período secretor de fibroína, ya que no sólo se observa un claro enriquecimiento de algunas especies de tRNA (Figura 16) sino que la naturaleza de éste conlleva una especialización a nivel de las isoformas de tRNA comprometidas en la síntesis de fibroína.

Nuestros estudios demuestran que la población de tRNA^{Met} está sometida a profundos cambios durante el desarrollo de la glándula. La capacidad del tRNA^{Met}₁ de aminoacilarse y formilarse con enzimas de E.coli indican una similitud de este tRNA con tRNA^{Met}_F de E.coli. Ishizuka y col. (270) examinaron péptidos nacientes de peptidil-tRNA aislado de la región posterior de glándulas de B.mori y demostraron que el residuo N-terminal era metionina. Los resultados del capítulo tercero que muestran el incremento preferencial del nivel de tRNA^{Met}₁ en la etapa en que ocurre exclusivamente síntesis de fibroína, proteína que no contiene metionina (234), sugieren con bastante claridad que tRNA^{Met}₁ sería el tRNA iniciador en B.mori. La modulación del nivel de esta isoforma aceptora de metionina, no sólo reviste interés por la adaptación funcional (167) a la que se encontraría sometida, sino que además por el hecho de que aparentemente la etapa de iniciación de la síntesis polipeptídica se encuentra sujeta a un control en células eucariotas (271, 272).

Daillie, Garel y colaboradores (273, 274) distinguen dos grupos de tRNA en la región posterior de la glándula. Los

tRNA que participan en la síntesis de fibroína y que se encuentran en máxima concentración al 7-8° día del quinto estadio larval, y aquellos que no están implicados en la síntesis de esta proteína y que alcanzan su máximo al 4° día del estadio. Puesto que no hay evidencias de amplificación de genes de tRNA en la glándula de B.mori (235, 240) los cambios selectivos en la población de tRNA podrían ser el resultado de una acción génica diferencial o alternativamente, de un mecanismo selectivo a nivel post-transcripcional que pudiera actuar sobre la maduración y procesamiento de los precursores de tRNA.

Varios laboratorios han investigado cuantitativamente los cambios de las especies de tRNA correspondientes a los aminoácidos que componen la fibroína (237-240, 273, 274).

Nuestros resultados, aparte de confirmar la existencia de una adaptación de la población de tRNA, necesaria para asegurar la máxima eficiencia de la síntesis de la fibroína de la seda, ponen en evidencia la compartimentalización del tRNA asociada a la especialización morfo-funcional de las células. En efecto, se detectaron notables diferencias en los isoaceptores de tRNA^{Ala} en las dos regiones de la glándula del gusano de seda, la posterior y la media. La fibroína de la seda (35% alanina, 43% glicina y 10% serina) (234) se sintetiza exclusivamente en la parte posterior, mientras que la sericina de la seda (6% alanina, 17% glicina y 37% serina) (239) se produce en la región media de la glándula. Las especies predominantes de tRNA^{Ala}, tRNA^{Ala}_{2a} y tRNA^{Ala}_{2b} en proporción de 2:1, están presentes en la región posterior durante el período de producción de fibroína, en cambio en la región media se encuentra sólo tRNA^{Ala}_{2b}. Por otra parte, en la región media existe una iso especie, tRNA^{Ala}_{1b} que no está presente en la parte posterior de la glándula. En el tejido de cubierta

de la larva (que contiene proteínas de composición uniforme), se encuentran todas las isoformas de tRNA^{Ala} a excepción de $\text{tRNA}_{2a}^{\text{Ala}}$ (239). Aunque ambos $\text{tRNA}_{2a}^{\text{Ala}}$ poseen el mismo anticodón IGC, difieren estructuralmente. Sprague y col. (58) determinaron la secuencia de las isoformas Ala_{2a} y Ala_{2b} de la glándula de B.mori y encontraron que una de ellas contenía U (o Ψ) en lugar de C en la posición 40. Ya que no se conocen modificaciones enzimáticas que conviertan C a U (o Ψ) o viceversa, se estima que estas isoformas se originan en distintos genes y no son el producto de modificaciones post-transcripcionales.

Fuera de la notable compartimentalización que exhiben las isoformas de tRNA^{Ala} de B.mori, se han descrito compartimentalizaciones intracelulares de componentes implicados en la síntesis de proteínas. Gatica y col. (275) pudieron determinar que una fracción importante de la Fen-tRNA sintetasa presente en oocitos de anfibios, se encontraba en un compartimento celular al que no tenía acceso tRNA inyectado exógenamente. Por otra parte, se sabe que en oocitos previtelogénicos el tRNA y RNA 5S se encuentran asociados principalmente a dos proteínas constituyendo una partícula de almacenamiento que sedimenta a 42 S (276, 277) hasta que los componentes, como el RNA 5S sean requeridos para la biogénesis de los ribosomas.

La presencia de $\text{tRNA}_{2a}^{\text{Ala}}$, exclusivamente en el compartimento donde se acumula la producción de fibroína, podría explicarse frente a los recientes hallazgos que evidencian el efecto del contexto del codón en la traducción del código genético (150, 168, 169). No obstante que ellos no están asociados tan claramente a una compartimentalización morfo-funcional, se han descrito varios casos en que una isoforma determinada de tRNA es fundamental para optimizar la síntesis

de una proteína en particular. Zilberstein y col. (278) encontraron que extractos de células tratadas con interferón traducían en forma incompleta el mRNA de la globina, a menos que se le suministrara una iso-especie de Leu-tRNA que se encontraba en baja cantidad. Guthrie y McClain (279) demostraron que una iso-especie de Ile-tRNA de T4 era imprescindible para la traducción del mensaje viral en E.coli, aun cuando la bacteria posee un tRNA capaz de reconocer el mismo codón que el tRNA de T4.

Al parecer la óptima traducción del mensaje genético implica un proceso más complejo que el simple apareamiento de bases (84), las restricciones y libertades impuestas por la base oscilante (85) y la lectura selectiva conocida como "dos de tres" propuesta por Lagerkvist (144).

La espectacular e histórica determinación de la secuencia del primer genoma humano (mitocondrial) lograda por el grupo de Cambridge (280) permitió detectar la existencia de 22 genes de tRNA. Aparte de las consideraciones que establecen la evidente quiebra de la universalidad del código genético, el limitado número de especies de tRNA impone el uso de reglas, o combinaciones de ellas, cuyo conocimiento será fundamental para interpretar hallazgos que hasta ahora sólo se han podido comprender parcialmente.

Los resultados que se presentan en el capítulo tercero, incluyen estudios con un segundo organismo, cuyas características funcionales, afectadas exógenamente, hacen de interés determinar el rol de la expresión génica en la respuesta a los cambios que se encuentra sometido. El pez Cyprinus carpio, como otros ectotérmicos acuáticos debe adecuar respuestas compensatorias (adaptativas) frente a las variaciones estacionales que sufre su habitat (241-244). Aunque parece evidente

que la síntesis proteica está implicada en el proceso de adaptación a temperatura, no está claramente establecido si su velocidad o extensión aumenta en el verano como ha sido sugerido por algunos autores (ver rev. en ref. 241).

Se sabe que el hepatocito de la carpa exhibe considerables cambios en la distribución de organelos asociados a la síntesis de proteínas cuando se comparan los hígados de animales provenientes de verano e invierno. En los primeros, la citoarquitectura corresponde a una célula francamente activa en síntesis proteica (241, 244, 246). Bouche (281) observó que durante el invierno el hígado de la carpa presenta menores niveles de RNA, rRNA y tRNA, y una población polisomal que corresponde a un estado deprimido de la síntesis de proteínas. En nuestro laboratorio Sáez (282), detectó una mayor velocidad de síntesis de proteínas, usando hepatocitos aislados de animales aclimatados a verano.

Consecuentemente, los resultados del capítulo tercero que demuestran el aumento de los niveles intracelulares de Val-tRNA, Ala-tRNA y Met-tRNA en los peces de invierno, podrían estar asociados a la disminución de la actividad de síntesis macromolecular. De acuerdo a Litt y Weisser (283) cuando un aminoácido no es utilizado en la síntesis de proteínas, el tRNA correspondiente tenderá a acumularse totalmente aminoacilado. Por el contrario, en respuesta a una gran demanda, el estado estable de la aminoacilación tenderá a disminuir.

En el cerebro, a medida que procede la maduración neuronal, la síntesis de proteínas disminuye en un 70%, sin embargo, la proporción de los aa-tRNA casi no varía (284). En cambio, durante las etapas en que ocurre máxima síntesis, en B.mori se han determinado incrementos en los niveles de tRNA aminoacilados con los aminoácidos que se requieren para la

síntesis específica de proteínas (238, 285). Lo mismo en glándula mamaria (286).

De acuerdo al conocimiento existente, no está claro como se relaciona el nivel intracelular de los aminoacil-tRNA con la eficiencia de la síntesis de proteína. No obstante, las diferencias de la población de aa-tRNA entre los dos estados adaptativos de la carpa, sugieren la participación del tRNA en los mecanismos que determinan la respuesta compensatoria.

Para conocer más de esta respuesta compensatoria, hemos comenzado a estudiar la mitocondria del hepatocito de la carpa. Se desea aislar el genoma mitocondrial y determinar si a este nivel se pueden detectar cambios en la expresión de los genes de tRNA durante las variaciones estacionales. De esta manera, se podría obtener información respecto al rol de la expresión génica en la respuesta compensatoria y conocer además las características moleculares de los tRNA mitocondriales, sean o no el producto de una expresión diferencial. El sistema recién mencionado, podría proveer además información acerca de la posible actividad reguladora de los tRNA o aminoacil-tRNA sobre la expresión génica.

Aparte de contribuir al conocimiento del tRNA con el diseño de un nuevo procedimiento para purificar tRNA específicos y de determinar las bases moleculares del reconocimiento entre una enzima y el tRNA, los resultados que se presentan en esta tesis permiten asociar la participación de los tRNA al proceso de expresión génica durante diferenciación celular, desarrollo y adaptación al medio ambiente en ectotermos euritermales y reflejan la posibilidad que el tRNA juegue un rol en la regulación de la síntesis de macromoléculas.

BIBLIOGRAFIA

1. Zachau, H.G. (1978) en Transfer RNA (Altman, S. ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 1-13.
2. Crick, F.H.C. (1957) Biochem.Soc.Symp. N° 14, 25-26.
3. Hoagland, M.B. (1960) en Nucleic Acids (Chargaff, E. and Davidson, J.N., eds.) Academic Press, N.Y. Vol. 3, pp. 349-408.
4. Maas, W.K. and Novelli, G.D. (1953) Arch.Biochem. 43, 236
5. Hoagland, M.B. and Novelli, G.D. (1954) J.Biol.Chem. 207, 767
6. Hoagland, M.B. (1955) Biochim.Biophys.Acta 16, 288-289.
7. Berg, D. (1956) J.Biol.Chem. 222, 1025-1034.
8. Davie, E.W., Koninsberger, V.V. and Lipmann, F. (1956) Arch. Biochem.Biophys. 65, 21-38.
9. Hoagland, M.B., Zamecknik, P.C. and Stephenson, M.L. (1957) Biochim.Biophys.Acta 24, 215-216.
10. Ogata, K. and Nohara, H. (1957) Biochim.Biophys.Acta 25, 659-660.
11. Berg, P. and Ofengand, E.J. (1958) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 44, 78-86.
12. Schweet, R.S., Bovard, F.C., Allen, E. and Glassman, E. (1958) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 44, 173-177.
13. Zamecknik, P.C. (1953) Fed.Proc. 12, 295.
14. Zamecknik, P.C., Stephenson, M.C., Scott, J.F. and Hoagland, M.B. (1957) Fed.Proc. 16, 275.
15. Chapeville, F., Lipmann, F., von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray, W.J. and Benzer, S. (1962) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 48, 1086-1092.
16. Kirby, K.S. (1956) Biochem.J. 64, 405
17. Brown, G.L. (1963) Prog.Nucl.Acid Res. 2, 259-310.

18. Kirby, K.S. (1967) en Techniques in Protein Biosynthesis (Campbell, P.N. and Sargent, J.R., eds.), Academic Press, N.Y., Vol. 1, pp. 265-297.
19. von Ehrenstein, G. (1967) Meth. Enzymol. 12 A, 588-596.
20. Holley, R.W., Apgar, J., Doctor, B.P., Farrow, J., Marini, A. and Merrill, S.H. (1961) J. Biol. Chem. 236, 200-202.
21. Krauskopf, M., Araya, A. and Litvak, S. (1974) Comp. Biochem. Physiol. 48 B, 619-628.
22. Holley, R.W. and Merrill, S.H. (1959) J. Am. Chem. Soc. 81, 753.
23. Nishimura, S., Harada, F., Narushima, U., Seno, T. (1967) Biochim. Biophys. Acta 142, 133-138.
24. Kelmers, A.D., Novelli, G.D. and Stulberg, M.P. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3979-3983.
25. Weiss, J.F. and Kelmers, A.D. (1967) Biochemistry 6, 2507-2513.
26. Weiss, J.F., Pearson, R.L. and Kelmers, A.D. (1968) Biochemistry 7, 3479-3487.
27. Pearson, R.L., Weiss, J.F., Kelmers, A.D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 228, 770-774.
28. Gillam, I., Millward, S., Blew, D., von Tigerstrom, M., Wimmer, E. and Tener, G.M. (1967) Biochemistry 6, 3043-3056.
29. Maxwell, I.H., Wimmer, E. and Tener, G.M. (1968) Biochemistry 7, 2629-2634.
30. Henes, C., Krauskopf, M. and Ofengand, J. (1969) Biochemistry 8, 3024-3028.
31. Gillam, I.C. and Tener, G.M. (1971) Meth. Enzymol. 20 C, 55-70.
32. Krauskopf, M., Chen, C.M. and Ofengand, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 842-850.
33. Gross, D.J., Parkhurst, L.J. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 181-187.

34. McKutchan, T.F., Gilham, P.T., Soll, D. (1975) *Nucleic Acid Res.* 2, 853-864.
35. Seno, T., Kobayashi, M. and Nishimura, S. (1968) *Biochem. Biophys. Acta* 169, 80-94.
36. Singhal, R.P. (1974) *Europ. J. Biochem.* 43, 245-252.
37. Nowak, G., Leonowicz, A. and Trojanowski, J. (1979) *Anal. Biochem.* 94, 48-52.
38. Fradin, A., Gruhl, H. and Feldman, H. (1975) *FEBS Letters* 50, 185-189.
39. Dirheimer, G., Keith, G., Sibler, A-P. and Martin, R.P. (1979) en *tRNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp. 19-41.
40. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T. Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R. and Zamir, A. (1965) *Science* 147, 1462-1465.
41. Sanger, F., Brownlee, G.G., Barrell, B.G. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 373-398.
42. Barrell, B.G. (1971) en *Procedures in Nucleic Acid Research* (Cantoni, G.L., Davies, D.R., eds.) Harper & Row, Vol. 2, pp. 751.
43. Rich, A. and RajBhandary, U.L. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 805-860.
44. Gauss, D.H. and Sprinzl, M. (1981) *Nucleic Acid Res.* 8, r1-r23.
45. Gauss, D.H., Grueter, F. and Sprinzl, M. (1979) en *tRNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 521-537.
46. Kim, S-H. (1979) en *Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 83-100.

47. Arcari, P. and Brownlee, G. (1980) *Nucleic Acid Res.* 8, 5207-5212.
48. Nishimura, S. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S. ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 168-195.
49. Ofengand, J. (1977) en *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Weissbach, H. and Pestka, S., eds.) Acad. Press N.Y., pp. 8-79.
50. Dube, S.K., Marcker, K.A. (1969) *Europ. J. Biochem.* 8, 256-262.
51. Yamada, Y. and Ishikura, H. (1975) *FEBS Letters* 54, 155-158.
52. Heckman, J.E., Hecker, L.I., Schwartzbach, S.D., Barnett, W.E., Baumstark, B. and RajBhandary, U.L. (1978) *Cell* 13, 83-95.
53. Roberts, R.J. (1972) *Nature New Biol.* 237, 44-45.
54. Roberts, R.J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4787-4796.
55. Harada, F., Sawyer, R.C. and Dahlberg, J.E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 3487-3497.
56. Harada, F., Peters, G.G. and Dahlberg, J.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10979-10985.
57. Simsek, M., Petrissant, G. and RajBhandary, U.L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2600-2604.
58. Sprague, K.U., Hagenbuchle, O. and Zúñiga, M.C. (1977). *Cell* 11, 561-570.
59. Ofengand, J. and Henes, C. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6241-6253.
60. Pifer, P.W. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 295-304.
61. Fresco, J.R., Adams, A., Ascime, R., Henley, D. and Lindahl, T. (1966) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 527-537.
62. Henley, D.D., Lindahl, T. and Fresco, J.R. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55, 191-198.
63. Lindahl, T., Adams, A. and Fresco, J.R. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55, 941-948.

64. Cramer, F. (1971) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 11, 391-421.
65. Englander, J.J., Kallenbach, N.R. and Englander, S.W. (1972) *J. Mol. Biol.* 63, 153-169.
66. Gamble, R.C., Schimmel, P.R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1356-1360.
67. Kearns, D.R. and Shulman, R.G. (1974) *Accts. Chem. Res.* 7, 33-39.
68. Streeck, R.E. and Zachau, H.G. (1972) *Eur. J. Biochem.* 30, 382-391.
69. Pongs, O., Bald, R. and Reinwald, E. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 117-125.
70. Favre, A., Yaniv, M. and Michelson, A.M. (1969) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 37, 266-271.
71. Favre, A., Michelson, A.M. and Yaniv, M. (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 367-379.
72. Krauskopf, M. and Ofengand, J. (1971) *FEBS Letters* 15, 111-115.
73. Ofengand, J., Delaney, P. and Bierbaum, J. (1974) *Meth. Enzymol.* 29, 673-684.
74. Chaffin, L., Omilianowski, D.R. and Bock, R.M. (1971) *Science* 172, 854
75. Chen, C.M., Krauskopf, M., Hachman, J., Weissbach, H. and Ofengand, J. (1970) *Plant Physiol.* 46, 30
76. Suzuki, Y. and Brown, D.D. (1972) *J. Mol. Biol.* 63, 409-429.
77. Melcher, G. (1972) *Biophysik* 9, 13-38.
78. Kim, S.H., Sudath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.S., Wang, A.H.J., Seeman, N.C. and Rich, A. (1974) *Science* 185, 435-440.
79. Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C., Klug, A. (1974) *Nature* 250, 546-551.

80. Rich, A., Quigley, G.J., Teeter, M.M., Ducruix, A. and Wov, N. (1979) en tRNA: Structure, Properties and Recognition (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 101-113.
81. Schevitz, R.W., Podjarny, A.D., Krishnamachari, N., Hughes, J.J. and Sigler, P.B. (1979) en tRNA: Structure, Properties and Recognition (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 19-41.
82. Moras, D., Comarmond, M.B., Fischer, J., Weiss, R., Thieny, J.C., Ebel, J.P. and Giegé, R. (1980) *Nature* 288, 669-674.
83. Wright, T.H., Manor, P.C., Beurling, L., Karpel, R.L., Fresco, J.R. (1979) en tRNA: Structure, Properties and Recognition (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 145-160.
84. Woese, C.R. (1969) en Progress in Molecular and Subcellular Biology (Hahn, F.E., ed.) Springer-Verlag, Alemania, pp. 5-39.
85. Crick, F.H.C. (1966) *J.Mol.Biol.* 19, 548-555.
86. Bonitz, S.G., Berlani, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 77, 3167-3170.
87. Heckman, J.E., Sarnoff, J., Alzner-DeWeerd, B., Yin, S., and RajBhandary, U.L. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 77, 3159-3163.
88. Barrel, B.G., Anderson, S., Bankier, A.T., De Bruijn, M.H.L., Chen, E., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 77, 3164-3166.
89. Berlani, R., Pentella, C., Macino, G. and Tzagoloff, A. (1980) *J.Bacteriol.* 141, 1086-1097.

90. Ofengand, J., Lin, F-L., Keren-Zur, M. and Boublik, M. (1980) *Ann. New York Acad. Sci.* 36, 324-354.
91. Allende, J.E. and Allende, C.C. (1971) *Meth. Enzymol.* 20, 210-220.
92. Allende, C.C., Chaimovich, H., Gatica, M. and Allende, J.E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 93-101.
93. Santi, D.V., Webster, R.W. and Cleland, W.W. (1974) *Meth. Enzymol.* 29, 620-627.
94. Igloi, G.L. and Cramer, F. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S. ed.) MIT Press, Cambridge, pp. 294-349.
95. Schimmel, P.R. and Soll, D. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 601-648.
96. Rouget, P., Chapeville, F. (1968) *Eur. J. Biochem.* 4, 305-309.
97. Myers, G., Blank, H.V. and Soll, D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4955-4964.
98. Parfait, R. and Grosjean, H. (1972) *Eur. J. Biochem.* 30, 242-249.
99. Nazario, M. and Evans, J.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4934-4942.
100. Santi, D.V. and Pena, V.A. (1971) *FEBS Letters* 13, 157-160.
101. Papas, T.S. and Peterkofsky, A. (1972) *Biochemistry* 11, 4602-4608.
102. Lotfield, R.B. (1972) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12, 87-128.
103. Soll, D. and Schimmel, P.R. (1974) *The Enzymes* 10, 489-538.
104. Zachau, H.G., Acs, G. and Lipmann, F. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 885-889.
105. Preiss, J., Berg, P., Ofengand, E.J., Bergmann, F.H. and Dieckmann, M. (1959) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45, 319-328.

106. Hecht, S.M. (1979) en tRNA: Structure, Properties and Recognition (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp. 345-360.
107. Jacobson, K.B. (1971) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 11, 461-488.
108. Barnett, W.E. and Jacobson, K.B. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 51, 642
109. Barnett, W.E. and Epler, J. (1966) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 549-555.
110. Kern, D., Giegé, R. and Ebel, J.P. (1972) *Europ. J. Biochem.* 31, 148-155.
111. Roe, B., Sirover, M., Dudock, B. (1973) *Biochemistry* 12, 4147-4154.
112. Ochoa, S. and Mazumder, R. (1974) *The Enzymes* 10, 1-51.
113. Weissbach, H. and Ochoa, S. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 191-216.
114. Hershey, J.W.B., Yanov, J. and Fakunding, J.L. (1979) *Meth. Enzymol.* 60, 3-11.
115. Benne, R., Brown-Luedi, M.L. and Hershey, J.W.B. (1979) *Meth. Enzymol.* 60, 15-35.
116. Bosch, L. and Van der Hofstad, G.A.J.M. (1979) *Meth. Enzymol.* 60, 11-15.
117. Lucas-Lenard, J. and Beres, L. (1974) *The Enzymes* 10, 53-80.
118. Jerez, C., Sandoval, A., Allende, J., Henes, C. and Ofengand, J. (1969) *Biochemistry* 8, 3006-3014.
119. Schulman, L.H. and Her, M.O. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 275-282.
120. Schulman, L.H. (1979) en tRNA: Structure, Properties and Recognition (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 311-324.

121. Richter, D. and Lipman, F. (1970) *Nature* 227, 1212-1214.
122. Richter, D., Lipman, F., Tarragó, A., Allende, J.E. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1805-1809.
123. Ono, Y., Skoultchi, A., Klein, A. and Lengyel, P. (1968) *Nature* 220, 1304-1307.
124. Pongs, O. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S., ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 78-104.
125. Ofengand, J. and Liou, R. (1981) *Biochemistry* 20, 552-559.
126. Grunberg-Manago, M. and Gross, F. (1977) *Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 20, 209-284.
127. Lake, J.A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1903-1907.
128. Richter, D., Erdmann, V.A. and Sprinzl, M. (1973) *Nature New Biol.* 246, 132-135.
129. Erdmann, V.A., Sprinzl, M. and Pongs, O. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 942-948.
130. Cashel, M. (1975) *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 301-318.
131. Haseltine, W.A. and Block, R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 1564-1568.
132. Pedersen, F.S., Lund, E. and Kjeldgaard, N.O. (1973) *Nature New Biol.* 243, 13-15.
133. Richter, D., Fehr, S. and Harder, R. (1979) *Eur. J. Biochem.* 99, 57-64.
134. Richter, D. (1976) *Arch. Biol. Med. Exper.* 10, 85-91.
135. Richter, D., Erdmann, V.A. and Sprinzl, M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3226-3229.
136. Cantor, C.R. (1979) en *tRNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 363-392.
137. Schine, J. and Dalgarno, L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1342

138. Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) *Nature* 254, 34-38.
139. Traut, R.R., Heimark, R.L., Sun, T.T., Hershey, J.W.B. and Bollen, A. (1974) en *Ribosomes* (Nomura, M., Tissieres, A., and Lengyel, P., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 271-308.
140. Hussain, Z. and Ofengand, J. (1973) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 50, 1143-1151.
141. Chládek, S., Ringer, D. and Zemlicka, J. (1974) *Biochemistry* 13, 2727
142. Sprinzl, M. and Wagner, T. (1979) en *tRNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp. 473-485.
143. Quiggle, K. and Chládek, S. (1980) *FEBS Letters* 118, 172-175.
144. Lagerkvist, U. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1759-1762.
145. Barrell, B.G., Bankier, A.T. and Drouin, J. (1979) *Nature* 282, 89-94.
146. Labuda, D. and Porschke, (1980) *Biochemistry* 19, 3799-3805.
147. Fuller, W. and Hodgson, A. (1967) *Nature* 215, 817-821.
148. Urbanke, C. and Maass, F. (1978) *Nucleic Acid Res.* 5, 1551-1560.
149. Grosjean, H., Soll, D.G. and Crothers, D.M. (1976) *J. Mol. Biol.* 103, 499-519.
150. Bossi, L. and Roth, J.R. (1980) *Nature* 286, 123-127.
151. Julius, D.J., Fraser, T.H. and Rich, A. (1979) *Biochemistry* 18, 604-609.
152. Marcker, K. and Sanger, F. (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 835-840.
153. Dickerman, H.W. and Weissbach, H. (1968) *Meth. Enzymol.* 12, 681-687.

154. Smith, A.E. and Marcker, K. (1970) *Nature* 226, 607-610.
155. Tarragó, A., Monasterio, O. and Allende, J.E. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 41, 765-773.
156. Lewis, J.A. and Ames, B.N. (1972) *J. Mol. Biol.* 66, 131-142.
157. Allende, J.E. (1975) *PAABS Revista* 4, 343-352.
158. La Rosa, R. and Soll, D. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S., ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 136-167.
159. Korner, A.M., Feinstein, S.I. and Altman, S. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S., ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 105-135.
160. Goodman, H.M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S. and Smith, J.D. (1968) *Nature* 217, 1019-1024.
161. Hirsh, D. (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 439-458.
162. Littauer, U.Z. and Inouye, H. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42, 439-470.
163. Ames, B.N. and Hartman, P.E. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 349-350.
164. Stent, G.S. (1964) *Science* 144, 816-820.
165. Sueoka, N. and Kano-Sueoka, T. (1970) *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 10, 23-55.
166. Osterman, L.A. (1979) *Biochemie* 61, 323-342.
167. Garel, J.P. (1974) *J. Theor. Biol.* 43, 211-225.
168. Taniguchi, T. and Weissmann, C. (1978) *J. Mol. Biol.* 118, 535-565.
169. Engelberg-Kulka, H. (1981) *Nucleic Acid Res.* 9, 983-991.
170. Altman, S. (1978) en *Transfer RNA* (Altman, S., ed.) The MIT Press, Cambridge, pp. 105-135.
171. Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop, R. and Rutter, W.J. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 190-194.
172. Hooper, A.K., Kujam, J. (1981) *Nucleic Acid Res.* 9, 1019-1029.
- 172a. Knapp, G., Ogden, R.C., Peebles, C.L. and Abelson, J. (1979) *Cell* 18, 37-45.

173. Altman, S. and Smith, J.D. (1971) *Nature New Biol.* 233, 35-39.
174. Bothwell, A.L.M., Stark, B.C. and Altman, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1912-1916.
175. Sakano, H. and Shimura, Y. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3369-3373.
176. Schedl, P., Roberts, J. and Primakoff, P. (1976) *Cell* 8, 581-599.
177. McClain, W.H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 718-724.
178. Goldfarb, A. and Daniel, V. (1980) *Nucleic Acid Res.* 8, 4501-4516.
179. Deutscher, M.P. (1973) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 13, 51-92.
180. Carre, D.S., Litvak, S. and Chapeville, F. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 224, 371-381.
181. Mukerji, S.K. and Deutscher, M.P. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 481-488.
182. Schofield, P. and Williams, P. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5584-5588.
183. Lindahl, T., Adams, A., Geroch, M. and Fresco, J.R. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 178-185.
184. Schmidt, F.J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8399-8403.
185. Soll, D. (1971) *Science* 173, 293-299.
186. Okada, N., Harada, F. and Nishimura, S. (1976) *Nucl. Acid Res.* 3, 2593-2603.
187. Cuzin, F., Kretchmer, N., Greenberg, R., Hurwitz, R. and Chapeville, F. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 2079-2086.
188. Lapidot, Y. and de Groot, N. (1972) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12, 189-228.

189. Villanueva, J. and Krauskopf, M. (1980) *Biochem. Int.* 1, 417-421.
190. Vogel, Z., Zamir, A. and Elson, D. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61, 701-707.
191. Menninger, J.R., Deery, S., Draper, D. and Walker, C. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 335, 185-195.
192. Schulman, L.H. and Pelka, (1977) *Biochemistry* 16, 4256-4265.
193. Solari, A. and Allende, J.E. (1980) *Arch. Biol. Med. Exper.* 13, 287-293.
194. Dahlberg, J.E. (1977) en *Protein-Nucleic Acid Recognition* (Vogel, H., ed.) Academic Press, pp. 345-358.
195. Araya, A. (1980) Tesis. Doctorado de Estado Universidad de Bordeaux II.
196. Cordell, B., Stavnezer, E., Freideich, R., Bishop, J.M. and Goodman, H.M. (1976) *J. Virol.* 19, 548
197. Araya, A. and Litvak, S. (1979) *Cold Spring Harbor Symp.* 43, 631-637.
198. Araya, A., Keith, G., Fournier, M., Gandar, J.C., Labouesse, D. and Litvak, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 437-448.
199. Araya, A., Sarih, L. and Litvak, S. (1979) *Nucleic Acid Res.* 6, 3831-3843.
200. Araya, A., Hevia, E. and Litvak, S. (1980) *Nucleic Acid Res.* 8, 4009-4020.
201. Pinck, M., Yot, P., Chapeville, F. and Duranton, H.M. (1970) *Nature* 226, 954-956.
202. Oberg, B. and Philipson, L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 927-932.
203. Yot, P., Pinck, M., Haenni, A.L., Duranton, H.M. and Chapeville, F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 1345-1352.
204. Litvak, S., Carré, D.S. and Chapeville, F. (1970) *FEBS Letters* 11, 316-319.

205. Haenni,A.L., Prochiantz,A., Bernard,O. and Chapeville,F. (1973) Nature New Biol. 241, 166-168.
206. Prochiantz,A. and Haenni,A. (1973) Nature New Biol. 241, 168-170.
207. Silberklang,M., Prochiantz,A., Haenni,A.L. and RajBhandary, U.L. (1977) Eur.J.Biochem. 72, 465-478.
208. Litvak,S., Tarragó,A., Tarragó-Litvak,L. and Allende,J.E. (1973) Nature New Biol. 241, 88-90.
209. Guilley,J., Jonard,G. and Hirth,L. (1975) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 72, 864-868.
210. Prochiantz,A., Bénicourt,C., Carré,D. and Haenni,A.L. (1975) Eur.J.Biochem. 52, 17-23.
211. Blumenthal,T., Landers,T.A. and Weber,K. (1972) Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 69, 1313-1317.
212. Soffer,R.L. (1974) Adv.Enzymology 40, 91-139.
213. Kaji,H. and Rao,P. (1976) FEBS Letters 66, 194-197.
214. Kaji,H. (1976) Biochemistry 15, 5121-5125.
215. Stewart,T.S., Roberts,R.J. and Strominger,J.L. (1971) Nature 230, 36-38.
216. No se utiliza este número en el texto.
217. Nesbit,J.A. and Lennarz,W.J. (1968) J.Biol.Chem. 243, 3088-3095.
218. Gould,R.M., Thornton,M.P., Liepkalns,V. and Lennarz,W.J. (1968) J.Biol.Chem. 243, 3096-3104.
219. Gentner,N. and Berg,P. (1971) Fed.Proc. 30, 1218.
220. Hurwitz,J., Becker,A., Gefter,M.L. and Gold,M. (1967) J.Cell.Physiol. 70, Suppl. 1, 181.
221. Goebel,W. and Helinski,D.R. (1970) Biochemistry 9, 4793-4801.
222. Mischke,D., Kloetzel,P. and Schwochan,M. (1975) Nature 255, 79-80.

223. Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
224. Bajo, M.A., Moratilla, M.C. and Heredia, C.F. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 255-261.
225. Coloma, A. and Heredia, C.F. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 597-603.
226. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
227. Jost, J.P. and Bock, R.M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5866-5873.
228. Haenni, A.L. and Chapeville, F. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 114, 135-148.
229. Litt, M. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 507-511.
230. Gillam, I., Blew, D., Warrington, R.C., von Tigerstrom, M. and Tener, G.M. (1968) *Biochemistry* 7, 3459-3468.
231. Richter, D. and Lipmann, F. (1970) *Nature* 227, 1212-1214.
232. Miralles, J., Sebastian, J. and Heredia, C.F. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 518, 326-333.
233. Tashiro, Y., Morimoto, T., Matsuura, S. and Nagata, S. (1968) *J. Cell. Biol.* 38, 574-588.
234. Sprague, K.U. (1975) *Biochemistry* 14, 925-930.
235. Susuki, Y., Gage, L.P. and Brown, D.D. (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 637-649.
236. Lizardi, P.M. and Brown, D.D. (1975) *Cell* 4, 207
237. Krauskopf, M., Araya, A. and Siddiqui, M.A.Q. (1976) *Arch. Biol. Med. Exper.* 10, 65-72.
238. Delaney, P. and Siddiqui, M.A.Q. (1975) *Develop. Biol.* 44, 54-62.
239. Meza, L., Araya, A., León, G., Krauskopf, M., Siddiqui, M.A.Q. and Garel, J.P. (1977) *FEBS Letters* 77, 255-260.
240. Araya, A., Krauskopf, M. and Siddiqui, M.A.Q. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 924-934.

241. Krauskopf, M., Amthauer, R., Sáez, L. and Zuvic, T. (1981) en Molecular Approaches to Gene Expression and Protein Structure (Weissbach, H., Siddiqui, M.A.Q. and Krauskopf, M., eds.) Academic Press, N.Y., en prensa.
242. Krauskopf, M., Amthauer, R. and Sáez, L. (1979) Arch. Biol. Med. Exper. 12, 373-378.
243. Amthauer, R., and Krauskopf, M. (1979) Comp. Biochem. Physiol. 62 B, 231-236.
244. Zuvic, T., Brito, M., Villanueva, J. and Krauskopf, M. (1980) Comp. Biochem. Physiol. 67 B, 167-170.
245. Chen, G.S. and Siddiqui, M.A.Q. (1975) J. Mol. Biol. 96, 153-170.
246. Rosenmann, E. and Krauskopf, M. (1974) Nucl. Acid Res. 1, 935-944.
247. León, G., Ruiz, N., Meza, L. and Krauskopf, M. (1977) Experientia 33, 1029-1030.
248. Strickland, J.E. and Jacobson, K.B. (1972) Biochemistry 11, 2321-2323.
249. Muench, K. and Berg, P. (1966) en Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni, G.L. and Davies, D., eds.) Harper & Row, New York, pp. 375-383.
250. Cherayil, J.D., Hampel, A. and Bock, R.M. (1968) Meth. Enzymol. 12, 166-169.
251. Yang, W.K. and Novelli, G.D. (1971) Meth. Enzymol. 20 C, 44-55.
252. Barnett, W.E. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. 53, 1462-1467.
253. Rizzino, A.A., Bresalier, R.S. and Freundlich, M. (1974) J. Bacteriol. 117, 449-455.
254. Bolle, A., Epstein, R.H., Salser, W. and Geiduschek, E.P. (1968) J. Mol. Biol. 31, 325-348.
255. Eppler, J.L. (1969) Biochemistry 8, 2285-2290.

256. Bretthauer, R.K., Marcus, L., Chaloupka, J., Halvorson, H.O. and Bock, R.M. (1963) *Biochemistry* 2, 1079-1084.
257. Griffiths, E. (1970) *FEBS Letters* 10, 225-228.
258. Petrissant, G. and Favre, A. (1972) *FEBS Letters* 23, 191-194.
259. Kumar, S.A., Krauskopf, M. and Ofengand, J. (1973) *J. Biochem. (Tokyo)* 74, 341-353.
260. Kothari, R.M. and Taylor, M.W. (1972) *J. Chromatogr.* 73, 479-501.
261. Friedman, S. (1973) *Nature New Biol.* 244, 18-19.
262. Nauheimer, U. and Hedgcoth, Ch. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 631-642.
263. Potts, R., Fournier, M.J. and Ford, N.C. (1977) *Nature* 268, 563-564.
264. Potts, R.O., Wang, Ch., Fritzing, D.C., Ford, N.C. and Fournier, M.J. (1979) in *tRNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J.N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp. 207-220.
265. McCroskey, R.P., Zasloff, M. and Ochoa, S. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2451-2455.
266. Lucas-Lenard, J. and Lipmann, F. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1050-1057.
267. Narita, K., Tsuchida, I., Tsunozawa, S. and Ogata, K. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 327-332.
268. Liew, C.C., Haslett, G.W. and Allfrey, V.G. (1970) *Nature* 226, 414-417.
269. Villanueva, J. and Krauskopf, M. (1978) *Abstracts Meeting on tRNA*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 131.
270. Ishizuka, S., Kawakami, M., Ejiri, S. and Shimura, K. (1974) *FEBS Letters* 47, 318-322.
271. Haselkorn, R. and Rothman-Dene, L.B. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42, 397-438.

272. Ochoa, S. and de Haro, C. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 549-580.
273. Chavancy, G., Daillie, J. and Garel, J.P. (1971) *Biochimie* 53, 1187-1194.
274. Garel, J.P., Mandel, P., Chavancy, G. and Daillie, J. (1971) *Biochimie* 53, 1195-1200.
275. Gatica, M., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 202, 653-656.
276. Denis, H. and Mairy, M. (1972) *Eur. J. Biochem.* 25, 524-534.
277. Kloetzel, P.-M., Whitfield, W. and Sommerville, J. (1981) *Nucl. Acid Res.* 9, 605-621.
278. Zilberstein, A., Dudock, B., Berissi, H. and Revel, M. (1976) *J. Mol. Biol.* 108, 43-54.
279. Guthrie, C. and McClain, W.H. (1979) *Biochemistry* 18, 3786-3795.
280. Anderson, A.T., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.D., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G. (1981) *Nature* 290, 457-465.
281. Bouche, G. (1975) Tesis. Doctorado de Estado Universidad de Paul Sabatier.
282. Sáez, L. (1981) Tesis. M.Sc. Universidad Austral de Chile.
283. Litt, M. and Weisser, K. (1978) *Science* 201, 527-529.
284. Chou, L. and Johnson, T.C. (1972) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 47, 824-830.
285. Chavancy, G. and Fournier, A. (1979) *Biochimie* 61, 229-243.
286. Elska, A., Matsuka, G., Matiash, U., Nasarenko, I. and Semova, N. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 247, 430-440.