

UCH-FC  
DOC-B  
T192

ESTUDIOS SOBRE EL FACTOR DE ELONGACION 1 DE GERMEN DE TRIGO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor  
en Ciencias con mención en Biología

por

ADELA TARRAGO TORRES

Mayo, 1976

Profesor patrocinante

Dr. Jorge E. Allende

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

ADELA TERESA TARRAGO TORRES

ha sido aprobada por el Comité 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 día 29 de Junio de 1976.

Dr. Jorge Allende R.  
Patrocinante de Tesis

Jorge E. Allende

Dr. Bruce Cassels  
Comisión Informante de Tesis

Bruce Cassels

Dr. Luis Izquierdo  
Comisión Informante de Tesis

Luis Izquierdo

Dr. Carlos Jerez  
Comisión Informante de Tesis

\_\_\_\_\_

Dr. Guido Mora  
Comisión Informante de Tesis

\_\_\_\_\_

Dr. Tito Ureta  
Comisión Informante de Tesis

\_\_\_\_\_



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma especial al Dr. Jorge E. Allende por su eficaz y diligente dirección y por la efectiva ayuda dispensada.

A Catherine Allende, mi gratitud por su constante apoyo moral y profesional, consecuencia lógica de su capacidad y altruismo.

Deseo además expresar mi reconocimiento a quienes han contribuido a la materialización de esta tesis y lo que ella significa. A riesgo de cometer alguna omisión involuntaria, quiero testimoniar en forma explícita mis agradecimientos:

A Carmen González, por su respaldo incondicional manifestado en su generoso aporte en la revisión final de este escrito,

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte, U. de Chile, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, particularmente a Antonio Morello, Director del Departamento durante ese período.

A Graciela Becerra, por su colaboración en la expedita transcripción del texto.

A José Mondaca, por su esmero en la confección de las figuras.

Realicé esta tesis para Esteban,  
con la inmensa ayuda de mis padres  
... y a pesar de Carolina y Lorena.



## RESUMEN

Durante el desarrollo de esta tesis se ha estudiado la función del factor de elongación 1 de germen de trigo en la síntesis de proteínas, así como las interacciones de esta proteína con nucleótidos guanílicos y con aminoacil-tRNA.

El factor de elongación 1 (EF1) de germen de trigo presenta diversas formas moleculares como se puede observar por filtración en gel o por gradientes de concentración de sacarosa. Existe una forma de peso molecular mayor que 200.000 daltones y por lo menos tres formas más livianas cuyos pesos moleculares son 83.000, 75.000 y 63.000. La fracción más liviana se purificó hasta homogeneidad pero, debido a su gran labilidad, pierde gran parte de su actividad en la purificación.

La fracción más liviana de EF1 presenta un sitio para unir GTP y un sitio para unir el aminoacil-tRNA. Estudios de estabilidad de estos sitios demuestran que el sitio de unión de GTP es mucho más estable que el sitio de unión del aminoacil-tRNA.

EF1 forma un complejo estable con GTP. Sólo cuando GTP se ha unido a EF1, éste puede interactuar con el aminoacil-tRNA y formar un complejo ternario (EF1 : GTP : aminoacil-tRNA). Es posible aislar este

complejo ternario lo que no es factible con la mayoría de los factores de elongación de eucariontes.

EF1 también interactúa con nucleótidos guanílicos análogos al GTP como GDP, GMP-PCP, ppGpp o con dinucleótidos como ppGpC o pppGpC pero no interactúa con GMP, cGMP, pGpC y con derivados de otras bases nucleotídicas.

La afinidad de EF1 por GDP es cuatro veces mayor que por GTP, a diferencia de lo que ocurre en Escherichia coli en que la constante de afinidad de EFTu por GDP es 25 veces mayor que por GTP.

La forma de mayor peso molecular de EF1 ( $EF1_H$ ) se disocia originando una especie de bajo peso molecular ( $EF1_L$ ) en presencia de GTP o de nucleósidos difosfatos análogos del GTP como GDP o ppGpp.  $EF1_L$  es más inestable que  $EF1_H$  pero presenta mayor afinidad por el aminoacil-tRNA. La concentración de GTP necesaria para disociar la especie pesada es mayor que la que se requiere para interactuar con EF1.

El complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) se aisló por columnas de filtración molecular y su cuantificación se realizó empleando filtros de nitrocelulosa. La unión de GTP y del aminoacil-tRNA a  $EF1_L$  es estequiométrica: se une una molécula de GTP y una de aminoacil-tRNA por molécula de EF1.



Existe diferente afinidad de (EF1 : GTP) por los distintos aminoacil-tRNA: fenilalanil-tRNA tiene mayor afinidad que lisil-tRNA y éste mayor que metionil-tRNA por unirse a (EF1 : GTP).

El metionil-tRNA iniciador interactúa con (EF1 : GTP) pero forma un complejo inestable que no se puede aislar por filtración en gel.

EF1 no interactúa con tRNA o con aminoacil-tRNAs que tengan el grupo amino modificado como el N-acetil-aminoacil-tRNA.

Existen RNA virales de plantas que pueden esterificar enzimáticamente un aminoácido en el extremo terminal 3'. Este extremo tiene una secuencia -CCA como la del tRNA y una estructura similar a un tRNA. Se midió la interacción de EF1 con estos aminoacil-RNA virales y se observó que forman un complejo ternario (EF1 : GTP : aa-RNA viral) de propiedades semejantes al complejo con aminoacil-tRNA.

Se midió la actividad de EF1 para catalizar la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas y para estimular la síntesis proteica en presencia del factor de elongación 2. Se observa que a pesar de que EF1<sub>L</sub> tiene mayor afinidad por el aminoacil-tRNA que EF1<sub>H</sub>, éste es más activo en estimular la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas, por lo cual es posible que EF1<sub>H</sub> actúe catalíticamente en esta reacción o que EF1<sub>L</sub> sea deficiente en su interacción con el ribosoma.



## ABSTRACT

The function of wheat germ elongation factor 1 in protein synthesis and the interactions of this protein with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA have been studied.

Elongation factor 1 (EF1) from wheat germ has multiple molecular forms as seen by gel filtration and by sucrose concentration gradients. One of the species observed has a molecular weight of over 200,000 daltons and there are at least three other species of molecular weights 83,000, 75,000 and 63,000. The lighter fraction has been purified to homogeneity but because of its extreme lability, it loses nearly all its activity upon purification.

The lighter form of EF1 has a site for GTP binding and a site for the binding of aminoacyl-tRNA. Studies on the stability of these sites show that the binding site for GTP is much more stable than the binding site for the aminoacyl-tRNA.

EF1 forms a stable complex with GTP. Only when EF1 has bound GTP, it can interact with the aminoacyl-tRNA and form a ternary complex (EF1 : GTP : aminoacyl-tRNA). It has been possible to isolate this ternary complex; this has not been possible with the majority of the other eukaryotic elongation factors.

EF1 also interacts with guanosine nucleotide analogs of GTP such as GDP, GMP-PCP, ppGpp or with dinucleotides as ppGpC or pppGpC but it does not interact with GMP, cGMP, pGpC or with derivatives of other nucleotide bases.

The affinity constant of EF1 for GDP is four times higher than for GTP in contrast to that which is observed in Escherichia coli where the affinity constant of EFTu for GDP is 25 times higher than for GTP.

The heavy molecular weight form of EF1 ( $EF1_H$ ) dissociates into a lighter form ( $EF1_L$ ) in the presence of GTP or diphosphate nucleotide analogs of GTP as GDP or ppGpp.  $EF1_L$  is more unstable than  $EF1_H$  but presents a higher affinity for the aminoacyl-tRNA. The GTP concentration necessary to dissociate the heavy form of EF1 is higher than the concentration required to interact with EF1.

The ternary complex (EF1 : GTP : aa-tRNA) was isolated by molecular filtration columns and it was measured with a nitrocellulose filter binding assay. The binding of GTP and aminoacyl-tRNA to  $EF1_L$  is stoichiometric: one GTP and one aminoacyl-tRNA molecule are bound per EF1 molecule.

The binary complex (EF1 : GTP) has different affinities for the different aminoacyl-tRNAs: phenylalanyl-tRNA has a higher affinity for (EF1 : GTP) than lysyl-tRNA and the latter interacts better than methionyl-



tRNA<sub>m</sub>.

The initiator form of methionyl-tRNA interacts with (EF1 : GTP) but forms an unstable complex which cannot be isolated by gel filtration.

EF1 does not interact with tRNA or with modified aminoacyl-tRNAs in its amino group as N-acetyl-aminoacyl-tRNA.

There exist some plant viral RNAs that can esterify enzymatically an amino acid in the 3' terminus of the RNA. This end has a 3' end terminal sequence -CCA, as does tRNA and a structure similar to that of tRNA.

The interaction of EF1 with these aminoacyl-tRNAs was measured and we observed that it forms a ternary complex (EF1 : GTP : aa-viral RNA) which has similar properties to the ternary complex with the aminoacyl-tRNA.

The activity of EF1 to catalize the binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes was measured as well as the activity to stimulate protein synthesis in the presence of elongation factor 2. It can be seen that although EF1<sub>L</sub> has higher affinity than EF1<sub>H</sub> to bind the aminoacyl-tRNA, the latter is somewhat more active in stimulating the binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes; this fact suggests that EF1<sub>H</sub> acts in a catalytic way in this reaction or that EF1<sub>L</sub> is defective in its interaction with the ribosome.



## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	vi
ABREVIATURAS .....	xiv
LISTA DE TABLAS .....	xvi
LISTA DE FIGURAS Y ESQUEMAS .....	xviii
INTRODUCCION	
Primeros experimentos .....	1
Función de los factores de elongación T y G de <u>E. coli</u> en la síntesis proteica .....	8
Esquema general de la síntesis proteica en procariontes .....	10
Otras funciones del factor de elongación Tu .....	13
Factores de elongación en eucariontes .....	14
Función de EF1 en la síntesis proteica .....	15
Estudios efectuados en esta tesis .....	16
METODOS	
1. Preparación de enzimas y ribosomas de germen de trigo .....	19
2. Purificación de los factores de elongación EF1 y EF2 de germen de trigo .....	19
3. Lavado de ribosomas de germen de trigo .....	21
4. Preparación de tRNA de germen de trigo .....	21
5. Aminoacilación de tRNA .....	21
6. Ensayo para la formación del complejo binario (EF1 : GTP) ...	22
7. Detección del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) en filtros de nitrocelulosa .....	22

	Pág.
8. Aislamiento del complejo (EF1 : GTP : aa-tRNA) en columnas de filtración molecular .....	23
9. Unión de aminoacil-tRNA a ribosomas .....	24
10. Polimerización de fenilalanina a partir de fenilalanil-tRNA en presencia de poli U y de ribosomas .....	24
11. Análisis del factor de elongación de germen de trigo en gradientes de concentración de sacarosa .....	25
12. Detección de lípidos por cromatografía en capa fina .....	25
13. Fraccionamiento de metionil-tRNA en columnas de DEAE-celulosa benzoilada .....	26
14. Formilación de metionil-tRNA .....	27
15. Extracción de RNA viral .....	27
16. Aminoacilación del RNA viral .....	28
17. Formación del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-RNA viral)	28
18. Análisis del aminoacil-RNA viral proveniente del complejo ternario .....	28
19. Acetilación del valil-RNA <sub>TYMV</sub> .....	29
20. Preparación del <sup>3</sup> H-tRNA de levadura .....	30
21. Análisis del <sup>3</sup> H-tRNA de levadura en gel de poliacrilamida .	30
 FUENTE DE LOS MATERIALES .....	 32

## RESULTADOS

### CAPITULO I

PROPIEDADES DEL FACTOR DE ELONGACION 1 DE GERMEN DE TRIGO .....	35
1. Determinación de actividad del factor de elongación 1 de trigo	36
a) Por unión a GTP .....	36
b) Por interacción con aminoacil-tRNA .....	36
c) Por estimulación de la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas	39
d) Por estimulación de la síntesis de un polipéptido .....	41



	Pág.
2. Purificación del factor de elongación 1 de germen de trigo ...	43
3. Perfil de elución del factor de elongación 1 en columna de Sephadex G-200 .....	48
4. Estabilidad del sitio de unión de GTP y de aminoacil-tRNA ....	53
5. Centrifugación del factor de elongación 1 en gradiente de sacarosa .....	57
6. Estabilidad de las formas EF1 <sub>H</sub> (de mayor peso molecular) y de EF1 <sub>L</sub> (de menor peso molecular) .....	60
7. Presencia de fosfolípidos en el factor de elongación 1 .....	63

## CAPITULO II

INTERACCION DE EF1 CON GTP Y ANALOGOS DE GTP .....	70
1. Complejo (EF1 : GTP) .....	70
2. Estabilidad del complejo (EF1 : GTP) .....	75
3. Constantes de disociación del complejo binario (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP) .....	75
4. Interacción de EF1 con ppGpp .....	83
5. Inhibición de la unión de GDP a EF1 por ppGpp .....	88
6. Interacción del dinucleótido pppGpC y análogos de éste con EF1 .....	89
7. Efecto de GTP y nucleótidos análogos sobre la estructura del factor de elongación 1 .....	92
8. Transformación de la especie EF1 pesada en liviana .....	99
9. Efecto de la concentración de GTP en la disociación de la forma pesada de EF1 .....	99



## CAPITULO III

INTERACCION DE EF1 CON AMINOACIL-tRNA EN PRESENCIA DE GTP .....	106
1. Aislamiento y cuantificación del complejo ternario	
a) Cuantificación del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA)	106
b) Aislamiento del complejo (EF1 : GTP :aa-tRNA) por columnas de filtración molecular .....	109
2. Actividad de las dos formas de EF1 en la formación del complejo ternario .....	109
3. Protección de la desacilación del aminoacil-tRNA al formar parte del complejo ternario .....	114
4. Propiedad de un metionil-tRNA como iniciador de la síntesis proteica .....	117
5. Formilación de las dos especies de metionil-tRNA de trigo ..	119
6. Interacción entre EF1, GTP y metionil-tRNA de trigo .....	122
7. Especificidad de EF1 para interactuar con met-tRNA heterólogos .....	130
8. Especificidad de EFTu de <i>E. coli</i> para interactuar con met-tRNA homólogos y heterólogos .....	130
9. Unión de metionil-tRNA a ribosomas en presencia del triplete AUG .....	136
10. Especificidad de la interacción de EF1 y GTP con los distintos aminoacil-tRNA .....	136
11. Interacción entre EF1, GTP y RNA virales que se aminoacilan en su extremo 3' .....	142
12. Aislamiento del complejo (EF1 : GTP : aminoacil-RNA viral) por filtración molecular .....	146
13. Interacción de EF1 y GTP con valil-RNA viral acetilado ....	151
14. Utilidad del complejo ternario como un medio para determinar el estado de aminoacilación del tRNA <u>in vivo</u> .....	154

	Pág.
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>ACTIVIDAD DE EF1 PARA CATALIZAR LA UNION DE AMINOACIL-tRNA A RIBOSOMAS Y PARA ESTIMULAR LA SINTESIS POLIPEPTIDICA .....</b>	<b>163</b>
1. Acción de GTP en la reacción de unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas .....	164
2. Acción de nucleótidos análogos del GTP en la síntesis de polifenilalanina .....	165
3. Actividad de EF1 <sub>H</sub> y EF1 <sub>L</sub> en la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas y en la síntesis proteica .....	168
 <b>DISCUSION</b>	
Formas enzimáticas de EF1:efecto de nucleótidos .....	179
Interacción con GTP .....	186
Interacción con aminoacil-tRNA .....	189
 <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	 <b>194</b>



## ABREVIATURAS

aa	Aminoácil
ae	Actividad específica
bisacrilamida	N,N metilén bisacrilamida
BMV	Virus del mosaico del pasto "brome"
Ci	Curie
DEAE	Diethyl amino etil
DTT	Ditiotreitol o reactivo de Cleland
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
EF	Factor de elongación
EF <sub>H</sub>	Factor de elongación de alto peso molecular
EF <sub>L</sub>	Factor de elongación de bajo peso molecular
fen-	Fenilalanil
g	Campo gravitacional (N <sup>o</sup> de veces la gravedad en el centro del tubo)
glu-	Glutamil
GMP-PCP	5'-guanilil metilén-difosfonato
Lis-	Lisil
met-	Metionil
PM	Peso molecular
poli U	Acido poliuridílico



ppGpp	Guanosín-5'-difosfato, 3'(o 2')-difosfato
pppGpp	Guanosín-5'-trifosfato, 3'(o 2')-difosfato
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	Tetrametil etilén diamina
TMV	Virus del mosaico del tabaco
tre-	Treonil
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA <sup>fen</sup>	tRNA específico para fenilalanina
tRNA <sup>met</sup>	tRNA específico para metionina
TYMV	Virus del mosaico del nabo amarillo
UA <sub>260</sub>	Unidad de absorbancia a 260 nm (equivalente a 40 ug de RNA o a 56 ug de ribosomas)
V <sub>e</sub>	Volumen de elución
V <sub>o</sub>	Volumen vacío

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Pág.
I	Ensayo de EF1 por formación de complejo binario con GTP o GDP .....	37
II	Actividad de EF1 medida por su interacción con aminoacil-tRNA: formación de un complejo ternario (EF1 : GTP : metionil-tRNA <sup>m</sup> ) en filtros de nitrocelulosa .....	38
III	Ensayo de EF1 por la capacidad de entregar aminoacil-tRNA a ribosomas .....	40
IV	Ensayo de EF1 por formación de polipéptidos .....	42
V	Purificación del factor de elongación 1 de germen de trigo .....	44
VI	Estabilidad del sitio de unión de GTP en el factor de elongación 1 de germen de trigo .....	54
VII	Estabilidad del complejo binario (EF1 : GTP) .....	76
VIII	Constantes de disociación de (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP) de trigo y de <u>E. coli</u> .....	84
IX	Efecto de dinucleótidos análogos al GTP en la unión de <sup>3</sup> H-GTP a EF1 .....	93
X	Efecto de la concentración de GTP en la disociación de EF1 .....	103
XI	Desacilación de treonil-tRNA por acción de treonil-tRNA sintetasa .....	115
XII	Formilación de met-tRNA con transformilasa de <u>E. coli</u> .	123
XIII	Unión de los diferentes metionil-tRNA de trigo a ribosomas de trigo en presencia del triplete AUG .....	137
XIV	Especificidad por los nucleótidos que catalizan la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas .....	166



TABLA		Pág.
XV	Efecto de GTP y análogos en la síntesis de polifenilalanina en presencia de ribosomas de trigo y poli U .....	167
XVI	Acción de EF1 y EF2 en la síntesis polipeptídica .....	169
XVII	Interacción de EF1 con análogos de GTP .....	190

## LISTA DE FIGURAS Y ESQUEMAS

		Pág.
Esquema I	Esquema general de la síntesis proteica en procariotes .....	12
Figura 1	Separación de las dos especies del factor de elongación 1 por cromatografía en DEAE-celulosa ....	46
Figura 2	Filtración de EF1 en Sephadex G-200 .....	49
Figura 3	Determinación del peso molecular de EF1 <sub>L</sub> de trigo por filtración en gel .....	51
Figura 4	Estabilidad de EF1 en el sitio de interacción con aminoacil-tRNA por formación del complejo (EF1 : GTP : fenilalanil-tRNA) .....	55
Figura 5	Separación de EF1 <sub>L</sub> y EF1 <sub>H</sub> por centrifugación en gradiente de sacarosa .....	58
Figura 6	Estabilidad de EF1 <sub>H</sub> y EF1 <sub>L</sub> de germen de trigo ...	61
Figura 7	Efecto de fosfolipasa C sobre la actividad de las especies EF1 <sub>L</sub> y EF1 <sub>H</sub> separadas por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa y medida por su capacidad de retener <sup>3</sup> H-GTP en filtros de nitrocelulosa .....	64
Figura 8	Efecto de fosfolipasa D sobre la actividad de las dos formas de EF1 separadas por gradiente lineal de sacarosa .....	67
Figura 9	Formación del complejo binario (EF1 : GTP) .....	71
Figura 10	Formación del complejo binario (EF1 : GTP) en función de la concentración de EF1 .....	73
Figura 11	Determinación de la constante de disociación del complejo (EF1 : GTP) .....	78
Figura 12	Determinación de la constante de disociación del complejo (EF1 : GDP) .....	81
Figura 13	Competencia entre ppGpp y GTP por unirse a EF1	86



		Pág.
Figura 14	Competencia de GDP y ppGpp por unirse a EF1 ...	90
Figura 15	Efecto de nucleótidos análogos del GTP sobre la estructura de EF1 .....	95
Figura 16	Disociación de EF1 en presencia de ppGpp: análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa	97
Figura 17	Disociación por GTP de EF1 <sub>H</sub> aislado .....	100
Figura 18	Existencia de las dos formas de EF1 en concentraciones bajas de GTP .....	104
Figura 19	Cuantificación del complejo (EF1 : GTP : fenilalanil-tRNA en filtro de nitrocelulosa .....	107
Figura 20	Aislamiento del complejo ternario (EF1 : GTP : fenilalanil-tRNA) en columnas de Sephadex G-200	110
Figura 21	Capacidad de las dos fracciones de EF1 para formar complejo ternario .....	112
Figura 22	Fraccionamiento de <sup>3</sup> H-metionil-tRNA de trigo por cromatografía en columna de DEAE-celulosa benzoinada .....	117
Figura 23	Fraccionamiento de <sup>3</sup> H-metionil-tRNA de trigo (aminoacilado con sintetasa de trigo) y <sup>14</sup> C-metionil-tRNA de trigo (aminoacilado con sintetasa de <u>E. coli</u> ) en una columna de DEAE-celulosa benzoinada .....	120
Figura 24	Aislamiento del complejo ternario (EF1 : GTP : met-tRNA) por filtración en gel .....	124
Figura 25	Interacción de las dos especies de met-tRNA <sup>met</sup> con EF1 y GTP medido por retención en filtros de nitrocelulosa .....	128
Figura 26	Formación de complejo ternario con EF1 de trigo y las dos especies de met-tRNA de <u>E. coli</u> .....	131
Figura 27	Interacción de EFTu de <u>E. coli</u> con distintas especies de met-tRNA medida por la capacidad de formar complejo ternario .....	133

	Pág.
Figura 28	Estudio comparativo de la afinidad de EF1 por distintos aminoacil-tRNAs medidos por la formación del complejo ternario, aislado por filtración en gel ..... 139
Figura 29	Interacción de valil-RNA del virus TYMV e histidil-RNA del virus TMV con EF1 de trigo y GTP ... 144
Figura 30	Análisis del peso molecular del RNA viral después de haber formado complejo ternario con EF1 y GTP 147
Figura 31	Aislamiento del complejo ternario (EF1 : $^3\text{H}$ -GTP : $^{14}\text{C}$ -valil-RNA <sub>TYMV</sub> ) por filtración en gel ..... 149
Figura 32	Interacción de EF1 con GTP y N-acetil-valil RNA <sub>TYMV</sub> ..... 152
Figura 33	Análisis del $^3\text{H}$ -tRNA de levadura por electroforesis en gel de poli-acrilamida ..... 156
Figura 34	Aminoacilación <u>in vivo</u> de tRNA inyectado en oocitos ..... 158
Figura 35	Determinación de la aminoacilación de tRNA microinyectado en oocitos por su capacidad de formar complejo ternario ..... 161
Figura 36	Filtración de EF1 de trigo en Sephadex G-200 ... 170
Figura 37	Capacidad de EF1 <sub>L</sub> y EF1 <sub>H</sub> para unir GTP y para catalizar la síntesis de polifenilalanina ..... 173
Figura 38	Capacidad de EF1 <sub>L</sub> y EF1 <sub>H</sub> separadas en un gradiente de concentración de sacarosa, para unir GTP y para catalizar la unión de fen-tRNA a ribosomas ..... 176
Esquema II	Estructura de algunos análogos de GTP ..... 187



## INTRODUCCION

### Primeros Experimentos

Los primeros estudios sobre síntesis de proteínas comenzaron a realizarse en la década del 40, en que flotaban ideas como la de Bergman (1) de que la síntesis proteica consistía en una reversión de la proteólisis, o las de Lipmann (2) y Kalcker (3) que hablaban de la existencia de un intermediario fosforilado como una vía obligatoria entre el aminoácido y la proteína. Sin embargo, para precisar el fundamento del problema, fue indispensable que los estudios sobre estructura de proteínas avanzaran significativamente, ya que la información que se disponía sobre esas macromoléculas era vaga y se relacionaba principalmente con su degradación y con el metabolismo de los aminoácidos. En 1950, Sanger (4) en el Simposio de Cold Spring Harbor presentó la primera estructura primaria de una proteína, la insulina. La complejidad de la molécula de insulina dejó en claro que el proceso biosintético necesario para conformar tales moléculas debería ser necesariamente mucho más complejo y específico que una mera reversión de la proteólisis (5).

Durante esos años se realizaron los primeros estudios de incorporación de aminoácidos radiactivos empleando cortes de tejidos (6) o células enteras de E. coli (Zamecnik, Stephenson y Novelli, resultados no publicados). Sin embargo, se realizaron numerosos intentos para

obtener un sistema libre de células capaz de incorporar aminoácidos radiactivos en proteínas y en 1951 Siekevitz y Zamecnik publicaron los primeros resultados de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -alanina a proteínas en un sistema de hígado de rata (7,8).

Entre 1951 y 1955 se realizaron numerosos estudios empleando este sistema con la técnica de romper suavemente el tejido y se logró determinar que las incorporaciones de aminoácidos se efectuaban en una fracción microsomal que sedimentaba a  $105.000 \times g$ , más específicamente en los ribosomas (9-11). Se vio en estos trabajos la necesidad indispensable de agregar ATP al sistema que incorpora los aminoácidos a proteínas, y se postuló la idea de que se requería una enzima para estimular la entrada de cada aminoácido.

En 1955, Hoagland, haciendo una analogía con lo que había encontrado Lipmann referente a la participación de ATP en la formación del enlace peptídico entre la  $\beta$ -alanina y el ácido pantoténico, postuló que los aminoácidos, previamente a la incorporación en proteínas, sufrían una activación por ATP con liberación de un pirofosfato inorgánico. El mismo Hoagland encontró experimentalmente que una fracción enzimática de hígado de rata que precipitaba a pH 5 catalizaba esta reacción (12,13). La formación de los aminoacil-adenilatos como intermediarios de la reacción se confirmó con la síntesis de leucil-AMP efectuada por el grupo de Novelli en 1956 (14).



Al año siguiente, en el laboratorio de Zamecnik, Hoagland (15) y simultáneamente Ogata y Nohara (16) descubrían la transferencia del aminoácido activado a un RNA. Sin embargo, fue Berg (17) quien enfatizó la idea de que era una sola enzima la que cumplía la función de activación y transferencia del aminoácido al aceptor polinucleotídico.

En 1953, Watson y Crick (18) habían propuesto su modelo para la estructura del DNA. Ya desde 1947, con los experimentos de Avery (19) sobre el DNA transformante y los de Beadle y Tatum (20) que dieron base a la idea "un gen = una enzima", se suponía que la secuencia de los deoxi-nucleótidos del DNA debía ser la que determinaba la secuencia de amino-ácidos de la proteína. Esta idea ya se aceptaba plenamente en 1951 después de los estudios efectuados con mutaciones del DNA, infección bacteriana, conjugación y recombinación genética o transformación con DNA libre, todo lo cual producía una modificación en el fenotipo de la célula afectada. Sin embargo, si como lo postulaba la teoría de Watson y Crick, las bases del DNA estaban orientadas hacia el interior de la doble hélice, era poco probable que la síntesis proteica se efectuara directamente sobre el DNA. Por otro lado, no se había detectado DNA en la fracción microsomal. Estos datos sugerían la idea que pudiera existir un intermediario que transmitiera la información contenida en la secuencia del DNA hasta el lugar de síntesis de las proteínas. Ya se tenía cierta evidencia respecto al

hecho de que el RNA podría transportar información genética, por estudios realizados con el RNA del virus del mosaico del tabaco; la infección de células huéspedes con RNA provocaba la síntesis de partículas virales completas (21,22).

En este mismo período se efectuaba un Simposio en Nueva York sobre la estructura de las proteínas, en que Moore dió a conocer la secuencia de la ribonucleasa y los enlaces disulfuro que en ella existen (23). Conjuntamente con estos estudios, Anfinsen comenzaba a explicar la relación entre la estructura y la actividad de esta enzima (24).

Conjuntamente con este problema, se planteó la disyuntiva de si la síntesis de la proteína propiamente tal se realizaba uniendo los aminoácidos secuencialmente o simultáneamente sobre un sitio catalítico preformado o por medio de péptidos intermediarios que después se unían entre sí. El problema se resolvió estudiando la entrada de aminoácidos radiactivos en proteínas en un sistema libre de células después de incubar con pulsos de distintos tiempos. De esta misma manera, Dintzis determinó un tiempo después que la síntesis era secuencial y que comenzaba con el aminoácido amino terminal (25).

Alrededor de 1955 se observó la existencia de ciertas moléculas de bajo peso molecular que eran indispensables para la síntesis de proteínas. El ATP puro no era capaz de estimular la síntesis del polipéptido



en un sistema previamente lavado en que se habían eliminado los compuestos de bajo peso molecular. Keller y Zamecnik (26) lograron determinar que se trataba de otro nucleótido, el GTP, que era el responsable de activar el sistema. El GTP no era necesario para activar los aminoácidos por lo que debía necesitarse en etapas posteriores del proceso biosintético.

Hasta 1960 no se postuló la existencia del RNA mensajero (27,28). Fue en ese año cuando el esquema de la síntesis proteica pudo bosquejarse en forma más completa. No obstante, los estudios sobre el código genético efectuados por Crick (29) y el descubrimiento hecho por Nirenberg de que el polinucleótido sintético poli U determinaba la síntesis de polifenilalanina (30), facilitaron enormemente el camino para poder aclarar el problema.

En 1957 en el laboratorio de Zamecnik se observó por primera vez que la adición de un aminoácido radiactivo a un sistema libre de células se traducía en la unión de éste a un RNA de bajo peso molecular presente en la fracción soluble, formándose un aminoacil-tRNA (31). En el año siguiente, Hoagland presentó evidencias de que existía un RNA soluble como intermediario de la síntesis proteica.

En 1961, von Ehrenstein y Lipmann demostraban la universalidad del código genético efectuando la síntesis de hemoglobina en un sistema de reticulocitos de conejo a partir de aminoacil-tRNA de E. coli (32).

Alrededor de 1960 se observó por primera vez, en el laboratorio de Lipmann, la existencia de un factor proteico que estimulaba la transferencia de los grupos aminoacilos a los ribosomas, y que esta proteína era sensible a agentes que inactivan grupos sulfhidrilos (33,34). Con la misma preparación enzimática se estimulaba por igual la transferencia de diferentes aminoácidos, lo que sugirió que la enzima de transferencia era una sola (35). Ya el grupo de Schweet había empleado esta técnica usando ácido poliuridílico como RNA mensajero y fenilalanil-tRNA como única fuente de aminoácidos (36,37).

También se logró determinar en reticulocitos que durante la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas se producía la hidrólisis de GTP a GDP y Pi. En E. coli este mecanismo fue más difícil de establecer (38,39).

A partir de estos datos, el conocimiento de las enzimas o factores de transferencia avanzó rápidamente. Se sabía que la síntesis proteica requería GTP, GSH y factores proteicos solubles; al tratar de purificar estos últimos se constató que existían dos factores complementarios que se aislaron en reticulocitos de conejo (40), en E. coli (41-43) y en hígado de rata (44-46). Inicialmente se describieron dos factores de transferencia purificados parcialmente en Sephadex G-200 a partir de un sistema de células eucarióticas (hígado de rata), que fueron llamados TF1 y TF2 (47,48). Sin embargo, los principales estudios realizados a partir



de las investigaciones de Allende y colaboradores fueron efectuados en E. coli. En este sistema se describieron los factores de transferencia A y B que serían más tarde denominados T y G (43). Posteriormente se encontró que el factor T tenía dos actividades, ambas necesarias para la síntesis de polifenilalanina y fueron denominadas Tu y Ts, diferenciándolas por su estabilidad (49,50). Tu y Ts existen en forma de un complejo que se disocia en presencia de GTP, formándose el complejo binario (Tu:GTP) y liberándose Ts (51).

A continuación se aislaron los factores de transferencia de Bacillus stearothermophilus (52) y de extracto de levadura (53,54).

Los factores de transferencia, actualmente llamados factores de elongación, han sido obtenidos en forma cristalina a partir de células de E. coli (55,56).

Arlinghaus y colaboradores (39), trabajando en preparaciones de reticulocitos, separaron las reacciones de la síntesis de proteína en 2 etapas: a) la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas, que requiere un factor de transferencia y GTP y, b) la formación del enlace peptídico que requiere el segundo factor de transferencia.

Simultáneamente a los experimentos de Schweet, se vio en E. coli que se podía realizar una unión no enzimática del aminoacil-tRNA a los ribosomas, que ocurría a temperaturas relativamente bajas y que requería

altas concentraciones de  $Mg^{++}$  (42, 57-59).

En 1964, los estudios de la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas empleando tripletes específicos para cada aminoácido, realizados por Nirenberg y Leder (60) ayudaron enormemente en el estudio de los factores de transferencia ya que sistematizaron el ensayo para medir su actividad. Mediante esta técnica unían un aminoacil-tRNA a ribosomas en presencia del triplete correspondiente sin necesidad de formar enlaces peptídicos por lo que sólo era necesaria la intervención del factor de transferencia EFTu o de altas concentraciones de  $Mg^{++}$ .

#### Función de los factores de elongación EFT y EFG de *E. coli* en la síntesis proteica

Los factores de elongación EFTu y EFTs de *E. coli* forman un complejo (EFTu : Ts) que se encuentra en la fracción citoplasmática soluble. En presencia de GTP y aminoacil-tRNA, EFTu forma un complejo ternario (EFTu : GTP : aa-tRNA). A partir de este complejo se produce la entrada del aminoacil-tRNA a los ribosomas (61), de modo que el complejo ternario es un intermediario en la reacción de unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas (62,63).

Cuando EFTu forma parte del complejo ternario no tiene afinidad por GDP ni por EFTs (62, 64-67).

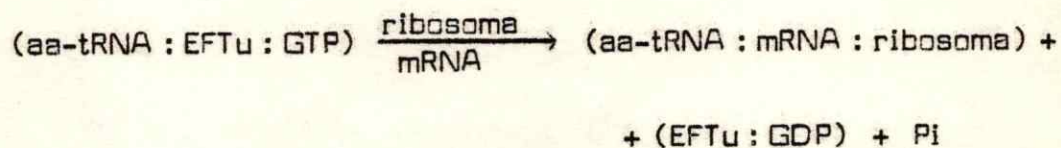
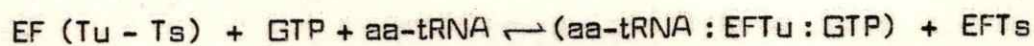


El GTP permanece intacto durante la formación del complejo ternario (52,65); sin embargo, al transferir el aminoacil-tRNA a los ribosomas, se hidroliza en GDP y Pi (68,69). Es decir, el factor de elongación reconoce un sitio ribosomal (probablemente las proteínas ribosomales  $L_7$  y  $L_{12}$  como se verá más adelante), sólo cuando está unido a GTP. Si el nucleótido unido a EFTu es GDP u otro análogo del GTP, el factor pierde su especificidad para unirse al ribosoma.

La hidrólisis de este GTP es necesaria para que el aminoácido pueda formar el enlace peptídico con el aminoácido precedente (68,70).

Una vez que el aminoacil-tRNA se ha transferido al ribosoma, el GTP se hidroliza y se libera el factor de elongación unido a GDP (71). El factor Tu se desprende del GDP por acción catalítica del factor Ts (72, 73).

El esquema total sería el siguiente:



La especificidad de la interacción del factor de elongación con el aminoacil-tRNA es bastante alta ya que EFTu no interactúa con tRNA

desacilado o con aminoacil-tRNAs que tengan el grupo amino del aminoácido bloqueado, como por ejemplo, el N-acetil-aminoacil-tRNA o formil-metionil-tRNA (65,66,74,75).

### Esquema general de la síntesis proteica en procariontes

La iniciación de la síntesis de la cadena polipeptídica se efectúa mediante la formación de un complejo entre el formil-metionil-tRNA, la subunidad ribosomal 30S y el triplete AUG del RNA mensajero, con la intervención de 3 factores de iniciación: IF3, que estimula la unión del RNA mensajero a la subunidad ribosomal 30S (76); IF2 e IF1 que unen el formil-met-tRNA al complejo (ribosoma (30S) : mRNA) (IF1 se une al complejo sólo en presencia de IF2, GTP y formil-met-tRNA)(76)(Esquema I).

La elongación de la cadena peptídica en bacterias se efectúa por la acción sucesiva de los factores de elongación EFT (EFTu + EFTs), que estimula la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas; la peptidil transferasa, que cataliza la formación del enlace peptídico con el aminoácido precedente, y el factor de elongación EFG o translocasa, cuya función es efectuar un movimiento del mRNA-peptidil-tRNA dentro del ribosoma, de modo de permitir que el ribosoma interactúe con un nuevo codón del mRNA (77).



La interacción de los factores de elongación con el ribosoma es competitiva, de modo que la unión de EFG no se produce hasta no haberse liberado EFTu; de estos datos se ha concluido que los factores de elongación se unen al mismo sitio ribosomal o a proteínas de función superpuesta entre sí. Estudios de estructura y función de proteínas ribosomales han demostrado que las proteínas acídicas  $L_7$  y  $L_{12}$  de la subunidad 50S del ribosoma están involucradas en las funciones de estos factores sobre el ribosoma (78-81).

La terminación de la síntesis de la cadena proteica se produce por una liberación del polipéptido una vez que se ha llegado a un triplete sin sentido en el RNA mensajero; en esta reacción participan dos factores de terminación: el factor  $R_1$  que actúa cuando se traducen los tripletes UAA y UAG y  $R_2$  que estimula la terminación frente a los tripletes UAA y UGA. Se ha descrito además la participación de un factor S que estimula la velocidad de liberación de la proteína, disminuyendo la  $K_m$  para los trinucleótidos terminales pero no la  $V_{máx}$ ; podría ser que estimulara la unión del codón sin sentido más que la hidrólisis del peptidil-tRNA (82).

En el esquema I se observa un resumen de los procesos que ocurren en la síntesis proteica.





### Otras funciones del factor de elongación Tu

La enzima  $\text{Q}\beta$  replicasa, enzima que duplica el RNA del bacteriófago  $\text{Q}\beta$  está formada por 4 subunidades diferentes, 3 de las cuales están codificadas por el genoma de la bacteria y una es específica para el virus. Se ha observado recientemente que dos de las subunidades son idénticas a los factores de elongación Tu y Ts de E. coli en cuanto a migración electroforética, secuencia parcial de aminoácidos, presentan reacciones antigénicas cruzadas y tienen igual actividad frente a GTP y GDP (83). La función de estas proteínas como subunidades de la replicasa del fago  $\text{Q}\beta$  no se conoce pero podría esperarse que facilitara la interacción del aminoacil-tRNA con el RNA viral. Por otro lado se ha visto que el extremo 3' terminal del fago  $\text{Q}\beta$  tiene una secuencia semejante a la de un tRNA (84) como ocurre en los RNA de virus de plantas, aunque en el caso del RNA de  $\text{Q}\beta$ , no ha sido posible incorporar un aminoácido al extremo terminal 3'.

Se ha descrito, además, una posible interacción de la RNA polimerasa de E. coli con el factor de elongación EF (Tu - Ts) (85) ya que se observó que el factor Tu se encontraba presente junto a las fracciones de la RNA polimerasa durante su purificación, eluyendo ambas actividades siempre juntas; se vio además, que la actividad de la RNA polimerasa es inhibida por ppGpp. Este nucleótido análogo del GTP se une al factor de

elongación EFTu (83) compitiendo con el GTP y de este modo inhibiría la actividad de EFTu para estimular la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas. El hecho de que el ppGpp inhiba la actividad de la RNA polimerasa, llevó a pensar a estos autores que EFTu y EFTs tuviesen algún rol en la síntesis in vitro de RNA (86,87). Sin embargo estos datos de la influencia de EFTuTs en la actividad de la RNA polimerasa no han sido confirmados por otros autores.

#### Factores de elongación en eucariontes

A pesar de que uno de los primeros estudios sobre factores de elongación fue hecho en reticulocitos (36), actualmente se sabe mucho menos de los factores de elongación de células eucarióticas que de células procarióticas.

En eucariontes se han aislado dos factores de elongación que serían equivalentes a los descritos en E. coli: EF1 semejante a EFT y EF2 correspondiente a EFG.

Se han aislado preparaciones con propiedades similares a EFT en cerebro de ternera (88), en hígado de rata (48,89,90), en reticulocitos de conejo (91) y en levadura (92); en germen de trigo, el factor de elongación ha sido estudiado en nuestro laboratorio (75, 93-96) y por Legocki y Marcus (97,98).



El factor EF1 fue purificado hasta homogeneidad en reticulocitos de conejo (91); en este sistema EF1 presenta un peso molecular de 186.000 daltones; en urea 8 M se disocia en 3 subunidades en que la subunidad de peso molecular 62.000 es inactiva para unir aminoacil-tRNA; la forma activa de EF1 puede contener 2, 3 o 4 subunidades.

Como se verá más adelante, en germen de trigo EF1 presenta diversas formas moleculares (96); lo mismo se ha observado en cerebro de ternera (99).

Debido a que el factor EF1 es muy lábil, queda aproximadamente un 10 % de la actividad original después de purificarlo. Esto ha retardado su estudio en células eucarióticas.

#### Función de EF1 en la síntesis proteica

EF1 de reticulocitos forma un complejo binario estable con GTP, aparentemente más estable que el complejo formado entre EF1 y GDP (100).

El complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) no ha sido posible aislarlo en hígado de rata ni en reticulocitos de conejo (100). Sin embargo, se puede aislar de germen de trigo (75) y de levadura (92) por lo que estos sistemas son ideales para el estudio de esta etapa de la síntesis proteica en eucariontes.

Los factores de elongación y todos los componentes que participan en la síntesis de proteínas en plantas han sido en general muy poco estudiados.

### Estudios efectuados en esta Tesis

Durante el desarrollo de esta tesis se han estudiado las propiedades y purificación del factor de elongación 1 de germen de trigo y se ha observado que, a diferencia de lo que ocurre en E. coli, EF1 presenta múltiples formas moleculares capaces de disociarse por acción de GTP, lo que posiblemente podría representar un mecanismo de regulación de la síntesis proteica a nivel de la traducción en eucariontes. Se verá, además, que aparentemente en células superiores no existe el factor de elongación EFTs que tiene una función catalítica de disociar el complejo binario (EFTu : GTP) en las células bacterianas. Es probable que esta actividad no se necesite en células superiores ya que, como se verá, la afinidad de EF1 de trigo por GDP es poco mayor que por GTP, contrariamente a lo que ocurre en E. coli.

Se ha estudiado la interacción de EF1 con GTP y la especificidad de esta interacción empleando nucleótidos análogos al GTP. Los requerimientos para GTP en la síntesis proteica son más específicos que los requerimientos de nucleótidos para catalizar las reacciones previas como la formación del complejo binario (EF1 : GTP), del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) o la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas.

Se ha efectuado además un estudio de la formación del complejo ternario que se forma entre el factor de elongación 1, GTP y el aminoacil-



-tRNA en una etapa previa a la entrega del aminoacil-tRNA a los ribosomas. El sistema de germen de trigo es un sistema ideal para estudiar este complejo ternario en eucariontes ya que en la mayoría de los sistemas de células superiores no ha sido posible aislarlo. Se estudia la especificidad de EFl para reaccionar con el aminoacil-tRNA y su capacidad para interactuar con distintos aminoacil-tRNAs, así como su afinidad frente a RNA virales que llevan un aminoácido en su extremo 3'.

Se analizó la capacidad de las distintas formas moleculares de EFl para formar el complejo ternario (EFl : GTP : aa-tRNA) y para estimular la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas.

El hecho de que EFl interactúe con aminoacil-tRNAs tiene una importancia adicional debido a que es una de las proteínas que reconocen ácidos nucleicos. En general, todo el mecanismo relacionado con la información que va del DNA hacia la traducción de la proteína está controlado por interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas.

Hay algunas interacciones poco específicas como las de poliaminas o de polipéptidos con ácidos nucleicos y, en menor grado, las interacciones entre las histonas y el DNA; en estas asociaciones se observa poca diferencia entre las constantes de afinidad de la molécula peptídica y distintas regiones de los ácidos nucleicos. En cambio existen otras interacciones muy específicas en que la proteína reconoce una secuencia

nucleotídica o una estructura terciaria determinada en el ácido nucleico; en la interacción entre proteínas con el DNA se ha encontrado que existen secuencias que presentan simetría y son las regiones en que la proteína reconocería e interactuaría con el DNA; en el caso de proteínas que interactúan con el tRNA (aminoacil-tRNA ligasas, factores de elongación, proteínas ribosomales), se reconoce ya sea una secuencia específica en el tRNA o una estructura terciaria de la molécula de ácido nucleico. En todos estos casos, la constante de afinidad de la unión entre la proteína y el ácido nucleico es muy alta.



## MÉTODOS

### Preparación de enzimas y ribosomas de germen de trigo

Durante la realización de los trabajos presentados en esta tesis se ha empleado el germen de trigo ya sea preparado a partir de cepas genéticamente puras de *Triticum durum* (INDAP, Chile), mediante el procedimiento de Johnston y Stern (101) o germen de trigo comercial proporcionado por el Molino La Estampa, Santiago, Chile.

El germen se muele en mortero con arena y una solución de sacarosa 500 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $MgCl_2$  10 mM, KCl 25 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Este homogenizado se filtra por gasa y se centrifuga a  $28.000 \times g$  durante 20 minutos. La solución sobrenadante filtrada por lana de vidrio se centrifuga a  $105.000 \times g$  durante 2 horas. El sobrenadante de esta centrifugación contiene los factores de elongación y el precipitado contiene los ribosomas de germen de trigo.

### Purificación de los factores de elongación EF1 y EF2 de germen de trigo

La fracción sobrenadante de  $105.000 \times g$  se precipita entre 40 y 80% de saturación con sulfato de amonio. En este estado los factores de elongación son estables durante varias semanas guardados a  $-20^{\circ}$ .

Para una posterior purificación la fracción precipitada con sulfato de amonio se disuelve en solución Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 2-mercaptoetanol 2 mM, se dializa contra la misma solución durante una noche y se

somete a una cromatografía en DEAE celulosa equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM. Las fracciones activas en unir GTP se precipitan entre 0 y 80 % de saturación con sulfato de amonio. Esta fracción se recromatografía previa diálisis en DEAE celulosa equilibrada con solución Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM y se eluye con una gradiente lineal de KCl entre 0 y 200 mM, disuelto en la misma solución de equilibrio de la columna.

De esta cromatografía se obtienen dos formas de EF1 de distinto peso molecular, ambas con capacidad para unir <sup>3</sup>H-GTP.

La forma más liviana, que eluye primero, se ha purificado mediante cromatografía en columna de fosfocelulosa equilibrada con solución Tris-HCl 20 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM y se eluye con KCl 150 mM disuelto en la misma solución de equilibrio. Las fracciones con actividad de unión de <sup>3</sup>H-GTP se precipitaron entre 0 y 80 % de saturación con sulfato de amonio y se filtraron por una columna de Bio-Gel P-150 (1,5 x 50 cm), obteniéndose el factor EF1 puro a juzgar por una electroforesis en gel de poliacrilamina al 8 %, pH 8,3 corrida durante 3 horas con una intensidad de 4 mA por gel donde se observa una sola banda.

El factor de elongación 2 de trigo se eluye de la columna de DEAE celulosa con una concentración de KCl 0,3 M. No se continuó su purificación posterior.



### Lavado de ribosomas de germen de trigo

Los ribosomas se lavan con una solución de alta fuerza iónica que contiene  $\text{NH}_4\text{Cl}$  500 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM, se centrifugan 2 horas a  $105.000 \times g$  y el precipitado se resuspende en la solución de homogenización y se centrifuga en la misma solución durante 2 horas a  $105.000 \times g$ . Los ribosomas se guardan congelados, resuspendidos en esta solución, en una concentración de  $500 \text{ UA}_{260}$  por ml.

### Preparación de tRNA de germen de trigo

El tRNA de germen de trigo se prepara como se describe en el artículo de Allende (93) a partir de germen de trigo comercial; con 600 g de germen de trigo se obtienen aproximadamente 500 mg de tRNA.

### Aminoacilación de tRNA

La unión del aminoácido al tRNA se realizó básicamente siguiendo el procedimiento descrito por von Ehrenstein y Lipmann (32). Se incubó tRNA (2 mg/ml de incubación) con el aminoácido radiactivo (con o sin los 19 aminoácidos restantes fríos) en concentración de  $2,5 \times 10^{-5}$  M en presencia de la aminoacil-tRNA sintetasa. El medio de incubación contiene Tris-HCl 100 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ATP 5 mM y GSH 4 mM. La reacción se incubó durante 20 minutos a  $37^\circ$ , se detiene por adición de acetato de potasio 2 % final pH 5,0 y un volumen de fenol destilado,

saturado con agua. Se agita y se centrifuga 15 minutos a  $12.000 \times g$ . El sobrenadante se reextrae con fenol y se precipita con etanol a  $-20^{\circ}$  durante más de 2 horas. El precipitado se disuelve en acetato de sodio  $5 \times 10^{-3} M$  pH 5,0 y se guarda a  $-20^{\circ}$ .

#### Ensayo para la formación del complejo binario (EF1 : GTP)

El complejo (EF1 : GTP) se forma por incubación del factor de elongación y GTP en presencia de Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $NH_4Cl$  50 mM,  $MgCl_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM durante 5 minutos a  $0^{\circ}$ . La reacción se detiene por una dilución de 15 veces con solución Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $NH_4Cl$  50 mM,  $MgCl_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM también a  $0^{\circ}$ .

El factor de elongación EF1 tiene la propiedad de ser retenido en filtros de nitrocelulosa (102). Debido a esto el complejo binario se detecta y se cuantifica fácilmente empleando GTP radiactivo, filtrándolo en filtros de nitrocelulosa y contando la radiactividad de los filtros en un sistema de centelleo, en 5 ml de solución de tolueno con Omnifluor (4 g/l).

La eficiencia del contador es de 85 % para  $^{14}C$  y 15 % para  $^3H$ .

#### Detección del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) en filtros de nitrocelulosa

El complejo (EF1 : GTP : aa-tRNA) se forma por incubación de factor EF1 con GTP y aa-tRNA en presencia de Tris-HCl 10 mM pH 7,5,



MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM, durante 5 minutos a 0°. La reacción se detiene por una dilución del medio de reacción de 15 veces tal como se efectuó para el complejo (EF1 : GTP). Sin embargo, el complejo ternario, a diferencia del complejo binario, no es retenido en filtros de nitrocelulosa por lo que su cuantificación se hace por disminución de las cuantas de GTP radiactivo retenido en los filtros. A mayor concentración de aminoacil-tRNA hay menor cantidad de cpm de (EF1 : <sup>3</sup>H-GTP) retenidos en el filtro. Dichos filtros se secan y se cuentan en un sistema de centelleo.

#### Aislamiento del complejo (EF1:GTP: aa-tRNA) en columnas de filtración molecular

El complejo ternario se puede aislar en columnas de Sephadex G-200 o Bio-Gel P-150 equilibrada con cacodilato de sodio 50 mM pH 7,0, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól 1 mM y GTP 75 uM. Para ello se incuba el factor EF1 con 100 pmoles de aa-tRNA y GTP 0,15 mM en presencia de cacodilato de sodio 50 mM pH 7,0, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y ditiotreitól (DTT) 1 mM durante 10 minutos a 0°, se coloca en la columna y se eluye con una solución que contenga la misma concentración de sales y del tampón cacodilato.

Las fracciones de la columna se precipitan con TCA frío al 5 % para detectar la elución del aminoacil-tRNA, se filtran en filtros de

lana de vidrio y se cuentan en un sistema de centelleo. La aparición de radiactividad en fracciones que eluyen antes del aminoacil-tRNA libre es una medida de la formación del complejo ternario.

#### Unión de aminoacil-tRNA a ribosomas

La unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas se realiza por incubación a 20° durante 20 minutos, de una mezcla de 0,1 ml que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, DTT 10 mM, GTP 0,5 mM, 40 ug de poli U, entre 2 y 3 unidades A<sub>260</sub> de ribosomas de trigo y entre 10 y 15 pmoles de <sup>14</sup>C-fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol). La reacción se detiene por una dilución de 30 veces con solución fría de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM y se filtra inmediatamente a través de filtros de nitrocelulosa. El filtro se seca y se cuenta en un sistema de centelleo.

#### Polimerización de fenilalanina a partir de fenilalanil-tRNA en presencia de poli U y de ribosomas

La síntesis de polifenilalanina se realiza por incubación durante 15 minutos a 37° de una mezcla de 0,1 ml que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, DTT 1 mM, GTP 0,5 mM, 5 ug de creatín fosfoquinasa, creatín fosfato 5 mM, GSH 2 mM, 40 ug de poli U, entre 2 y 3 unidades A<sub>260</sub> de ribosomas de germen de trigo lavados y alrededor de 15 pmoles de <sup>14</sup>C-fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol). La



reacción se detiene por precipitación con 5 ml de TCA frío al 5 % y se filtra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/A. Los filtros se secan y se cuentan en un sistema de centelleo.

#### Análisis del factor de elongación de germen de trigo en gradientes de concentración de sacarosa

Las dos formas del factor de elongación, EFl liviana y EFl pesada, se separan mediante una centrifugación de 18 horas a 37.000 rpm en gradiente lineal de sacarosa; cada gradiente contiene 5 ml de solución; se centrifuga en el rotor SW 39.

La concentración de sacarosa empleada va de 5 a 20 % disuelta en solución Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTT 1 mM. En aquellos casos en que se indica, se agregaron distintos nucleótidos a lo largo de toda la gradiente en concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M.

Se recogen de 23 a 25 fracciones de 6 gotas cada una y se analiza la actividad de EFl por retención de  $^3\text{H}$ -GTP en filtros de nitrocelulosa como se describió anteriormente.

#### Detección de lípidos por cromatografía en capa fina (103)

La solución del factor EFl (2,46 mg/ml) se dializó durante la noche contra 4 litros de agua bidestilada; posteriormente se llevó a sequedad por liofilización. El residuo se disolvió en 1 ml de HCl 6 N y se mantuvo durante una noche a  $104^\circ$  en una ampolla cerrada, después de lo cual se

liofilizó nuevamente a sequedad.

El residuo se disolvió en cloroformo:metanol = 3:1.

Las placas (de 250  $\mu$  de espesor) se prepararon con una suspensión de 10 g de sílica gel HF en 25 ml de agua y se guardaron a temperatura ambiente. Antes de usarlas se activaron por calentamiento durante 45 minutos a 140<sup>o</sup>.

La cámara cromatográfica se saturó con butanol:ácido acético: agua = 3 : 1 : 1 con papel filtro interior para asegurar una saturación total; se colocaron las muestras y se corrieron con la misma mezcla.

Las placas se revelaron con vapores de I<sub>2</sub> y con una solución de dicromato de potasio en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Fraccionamiento de metionil-tRNA en columna de DEAE-celulosa benzoylada

El fraccionamiento de <sup>3</sup>H-met-tRNA se realizó en una columna de DEAE celulosa benzoylada según la técnica descrita por Tener (104) (1,5 x 35 cm) equilibrada con solución de acetato de sodio 10 mM, pH 5,2, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2-mercaptoetanol 0,5 mM y NaCl 400 mM y se eluyó con una gradiente lineal de NaCl entre 0,4 M y 1 M, disuelto en la misma solución (con 400 ml en cada cámara). Se analizan alícuotas de las fracciones de la columna por precipitación con 5 ml de TCA frío al 5 % o se cuentan directamente en solución de Bray (105).



### Formilación de metionil-tRNA

La formilación del metionil-tRNA se realizó tal como lo describen Dickerman y Weissbach (106), empleando como fuente de la enzima transformilasa un sobrenadante de 105.000 x g de E. coli tratado previamente con protamina para eliminar los ácidos nucleicos. El grupo formilo radiactivo proviene del N<sup>5,10</sup> metenil-<sup>14</sup>C-tetrahidrofolato; este compuesto se empleó con una actividad específica de 28 mCi/mmol.

### Extracción de RNA viral

La suspensión del virus TYMV o TMV (donación de los Dres. L. Bosch de Leiden y H. Mundry de Tübingen) se adiciona de igual volumen de fenol al 90 % y se agita a intervalos durante 5 minutos en frío. Se centrifuga a 10.000 x g durante 5 minutos y se separa la fase acuosa. La fase fenólica se reextrae con el mismo volumen de cacodilato de sodio 0,01 M pH 6,0. Se extrae el resto de fenol de las 2 fases acuosas juntas con éter 3 veces consecutivas; el éter se evapora con vacío y el RNA viral se precipita con 2,5 volúmenes de etanol a -20<sup>o</sup> agregando previamente 0,1 volumen de acetato de potasio 20 % pH 5,0. Se deja durante la noche a -20<sup>o</sup> y el RNA se centrifuga 15 minutos a 12.000 x g. El RNA se disuelve en cacodilato de sodio 0,01 M pH 6,0 y se guarda a -20<sup>o</sup>.

### Aminoacilación del RNA viral (107)

La esterificación del RNA de TYMV con valina o del TMV con histidina se realizó incubando Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, ATP 5 mM, 1 a 2,5 mg/ml de aminoacil-tRNA sintetasa de E. coli o de levadura parcialmente purificada,  $1 \times 10^{-5}$  M de <sup>14</sup>C-histidina (ae 45 mCi/mmol) o de <sup>14</sup>C-valina (ae 100 mCi/mmol) y 250 pmoles por ml de RNA de TMV o de TYMV. La incubación se efectuó durante 30 minutos a 35° y la reacción se detuvo por adición del mismo volumen de fenol. La fracción acuosa que contiene el aa-RNA se separó por centrifugación a 10.000 x g. El RNA aminoacilado se purifica tal como se describe para el aminoacil-tRNA, precipitando varias veces la fracción acuosa con etanol a -20°.

### Formación del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-RNA viral)

El complejo (EF1 : GTP : aa-RNA viral) se formó por incubación de 50 ug de EF1 con <sup>3</sup>H-GTP  $2,5 \times 10^{-6}$  M (ae 1000 mCi/mmol) y distintas cantidades de aa-RNA viral en 0,2 ml durante 5 minutos a 0°. Se mide igual como se describe para la formación del complejo (EF1 : GTP : aa-tRNA) en filtros de nitrocelulosa.

### Análisis del aminoacil-RNA viral proveniente del complejo ternario

El aa-RNA viral se incubó con <sup>3</sup>H-GTP y EF1 de germen de trigo en cantidades limitantes como se ha descrito, de modo que todo el



aminoacil RNA viral presente está formando parte del complejo ternario. El complejo se pasa por filtro y se recoge el filtrado. Para el análisis del aa-RNA viral, el complejo ternario se trata con dimetil sulfóxido en concentración final de 80 % (v/v) durante 15 minutos a 20°. El RNA se precipita con etanol a -20° y el precipitado se disuelve en solución 10 mM de cacodilato de sodio pH 6 y 100 mM de NaCl. Se agrega formaldehído en concentración final de 1 % (v/v), se incuba durante 10 minutos a 0° y se somete a una filtración en Sephadex G-100 (2 x 90 cm) equilibrada en la misma solución de cacodilato-NaCl. Se analiza la densidad óptica a 260 nm y la radiactividad de las fracciones.

#### Acetilación del valil-RNA<sub>TYMV</sub>

La acetilación del grupo amino de la valina del valil-RNA<sub>TYMV</sub> se efectuó siguiendo básicamente la técnica de Haenni y Chapeville (108) empleada para acetilar el aminoacil-tRNA. A 47 pmoles de <sup>14</sup>C-valil-RNA disueltos en 0,5 ml de agua se le adicionó el mismo volumen de acetato de potasio saturado (pH 5,2) y se agregó 0,12 ml de anhídrido acético en porciones de 20 ul cada 10 minutos agitando suavemente, en frío. Después de aproximadamente 1 hora se agregó 1,5 ml de agua y 6 ml de etanol a -20°. Se dejó a esta temperatura una noche y el N-acetil-valil-RNA<sub>TYMV</sub> precipitado se separó por centrifugación durante 20 minutos a 28.000 x g. Se disolvió en agua y se guardó a -20°.

### Preparación de $^3\text{H}$ -tRNA de levadura

Las levaduras (se empleó una cepa  $U^-$ ) se crecen en un medio estéril que contiene 6,17 g de extracto nitrogenado de levadura, 10 g de ácido succínico, 6 g de NaOH, 20 g de glucosa, 40 mg de L-lis, L-tri, L-his, L-tre, 10 mg de uracilo y 1 g de extracto de levadura por litro de agua. Se ajusta a pH 5,0 con HCl y se filtra con materiales estériles.

Se toma un inóculo de 0,5 ml y se agrega a 50 ml del mismo medio pero que contiene 1 mg de uracilo/litro y 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -uracilo. Se crece durante 3 días a  $30^\circ$  y las levaduras se recogen por centrifugación. Las células se rompen con una presión de 12.000 libras/pulgada<sup>2</sup> empleando una prensa francesa y se centrifuga a 28.000 x g durante 10 minutos. Las células del precipitado se vuelven a romper en la prensa francesa. El sobrenadante de ambas centrifugaciones se centrifuga durante 2 horas a 105.000 x g sobre 2 ml de sacarosa 2 M. El sobrenadante de esta centrifugación se trata con el doble de volumen de fenol destilado, se agita y se centrifuga extrayendo la capa acuosa. Se reextrae con fenol y se precipita con etanol a  $-20^\circ$  durante una noche, después de lo cual se centrifuga y el precipitado se disuelve en agua bidestilada.

### Análisis del $^3\text{H}$ -tRNA de levadura en gel de poliacrilamida

El gel de poliacrilamida (al 7,5 %) se preparó empleando las siguientes soluciones: Solución A (poliacrilamida al 30 % P/v y



bis-acrilamida al 0,8 % P/V para dar una razón poliacrilamida:bis-acrilamida = 37,5. Solución B (Tris (base) 890 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  28 mM y ácido bórico 880 mM ajustada a pH 8,3 con NaOH 1 N). Solución C (persulfato de amonio al 0,4 % P/V). Se mezclaron 5 ml de solución A con 2 ml de solución B y 1 ml de solución C y se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de N,N,N,N TEMED y 12 ml de agua.

El gel de 18 cm de largo se hizo en 2 veces con un intervalo de 10 minutos para evitar la formación de burbujas en el interior del gel. Previo a la aplicación de la muestra el gel se precorre durante 45 minutos con una intensidad de 2 mA/gel para eliminar el exceso de persulfato de amonio. El  $^3\text{H}$ -tRNA (50  $\mu\text{l}$ ) se colocó sobre el gel junto con 10  $\mu\text{l}$  de la solución Tris-EDTA-ácido bórico, 2  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol y 30  $\mu\text{l}$  de glicerol. La electroforesis se realizó con una intensidad de 4 mA/gel con refrigeración durante aproximadamente 4 horas empleando como solución tampón de corrida la solución B diluída 10 veces.

Una vez corrida, los geles se congelaron, se cortaron en trozos de 1,5 mm, se disolvieron en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % por incubación con agitación a  $50^\circ$  durante una noche y los trozos disueltos se cortaron en 10 ml de la solución descrita por Bray (105).

## FUENTE DE LOS MATERIALES

Acetato de potasio	Baker
ácido succínico	Baker
ácido tricloroacético	Merck
aminoácidos radiactivos	New England Nuclear
ATP	Sigma
Bio-Gel P-150	Bio-Rad
Bis-acrilamida	Sigma
cacodilato de sodio	Sigma
cloruro de amonio	Merck
cloruro de magnesio	Baker
cloruro de potasio	Baker
cloruro de sodio	Sigma
creatín fosfato	Sigma
creatín fosfoquinasa	Calbiochem
DEAE-celulosa	Sigma
DEAE-celulosa benzollada	Sigma
dimetil sulfóxido	Sigma
ditiotreitól	Sigma
EDTA-Na <sub>2</sub>	Sigma
extracto de levadura	Difco



fenol	May - Baker
filtros de nitrocelulosa	Millipore
filtros de lana de vidrio	Whatman
fosfocelulosa	Whatman
fosfolipasa A, C, D	Sigma
GDP, GTP	Sigma
GMP, GMP-PCP	Schwarz/Mann Research
glicerol	Sigma
glucosa	May - Baker
GSH	Schwarz/Mann Research
hidróxido de sodio	Baker
l-aminoácidos	Sigma o Calbiochem
2-mercaptoetanol	Sigma
N,N,N,N TEMED	Sigma
nucleótidos radiactivos	New England Nuclear
Omnifluor	New England Nuclear
persulfato de amonio	Sigma
poliacrilamida	Sigma
poli U	Sigma
sacarosa	Baker
Sephadex G-50, G-100, G-200	Pharmacia

Sepharosa 4 B	Pharmacia
Sulfato de amonio	Sigma
Tris (base)	Sigma
tRNA de levadura, de <u>E. coli</u>	Sigma
uracilo	Calbiochem
uracilo radiactivo	Calbiochem

Baker: Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.

Bio-Rad: Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.

Calbiochem: Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.

Difco: Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

May-Baker: May-Baker Ltd., Dagenham, Inglaterra

Merck: Merck, Darmstadt, Alemania

Millipore: Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.

New England Nuclear: New England Nuclear, Boston, Mass. U.S.A.

Pharmacia: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia

Schwarz/Mann Research: Schwarz/Mann Research, Orangeburg, N.Y.,  
U.S.A.

Sigma: Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.

Whatman: Whatman, W. and R. Balston Ltd., Inglaterra.



## RESULTADOS

### CAPITULO I

#### PROPIEDADES DEL FACTOR DE ELONGACION 1 DE GERMEN DE TRIGO

El factor de elongación 1 (EF1) tiene la propiedad de estimular la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas en una reacción que requiere GTP. A diferencia de los sistemas bacterianos, EF1 de trigo es un complejo proteico de alto peso molecular capaz de disociarse en presencia de GTP.

Por su función en la síntesis proteica, el factor de elongación 1 es una proteína que interactúa a la vez con GTP y con aminoacil-tRNA para posteriormente entregar el aminoacil-tRNA al complejo (ribosoma-mRNA) e hidrolizar el GTP a GDP y fosfato inorgánico. Es así como es posible medir la actividad de EF1 por su interacción con aminoacil-tRNA, por su unión con GTP (oGDP) o por su actividad de catalizar la transferencia de los aminoacil-tRNA a los ribosomas en presencia del triplete correspondiente. La formación del enlace peptídico y, por ende, la síntesis de un polipéptido requiere además de la presencia de mRNA y del factor de elongación 2 (EF2) o translocasa. Por ello, también es posible medir la actividad del factor EF1 por su capacidad de estimular la síntesis de un polipéptido o de una proteína en presencia de EF2, de los ribosomas y del RNA mensajero apropiado.

## 1. Determinación de actividad del factor de elongación I de trigo

### a) Por unión a GTP

La actividad de unir GTP se mide aprovechando la propiedad del factor de elongación I de quedar retenido cuantitativamente en filtros de nitrocelulosa (75). Empleando GTP radiactivo se puede medir la cantidad de EF1 presente por filtración del complejo (EF1 : GTP). La Tabla I muestra la retención del complejo binario (EF1 : GTP) en filtros de nitrocelulosa. Como se verá más adelante, la afinidad de EF1 por GDP es también alta, por lo que se puede medir su actividad por unión de GDP radiactivo a la proteína; en cambio, nucleótidos monofosfatos como GMP no interactúan con EF1.

### b) Por interacción con aminoacil-tRNA

Debido a que EF1 interactúa además con el aminoacil-tRNA, es posible medir su actividad por la unión con el tRNA acilado, en presencia de GTP; efectivamente la unión con el aa-tRNA requiere la interacción previa con GTP. En la Tabla II se observa la actividad de EF1 medida por su capacidad de unirse con el  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA<sub>m</sub> en presencia de  $^{14}\text{C}$ -GTP formando así un complejo ternario (EF1 : GTP : metionil-tRNA). En este caso se utiliza el ensayo de filtros de nitrocelulosa descrito en el capítulo de Métodos.



TABLA I

Ensayo de EF1 por formación de complejo binario con GTP o GDP

Sistema	(EF1 : $^{14}\text{C}$ -GTP) formado (pmoles)
Completo	1,02
-EF1	0,12
+EF1 calentado 5' a 50°	0,23
- $^{14}\text{C}$ -GTP + $^{14}\text{C}$ -GDP (12,6 pmoles)	2,33
- $^{14}\text{C}$ -GTP + $^{14}\text{C}$ -GMP (10,5 pmoles)	0,09

El sistema completo contiene Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ditioneitol 1 mM, 120 ug de EF1 parcialmente purificado y 9,6 pmoles de  $^{14}\text{C}$ -GTP (ae 174 mCi/mmol) en un volumen de 0,2 ml. El  $^{14}\text{C}$ -GDP tiene una ae de 27 mCi/mmol y el  $^{14}\text{C}$ -GMP de 54 mCi/mmol. Se incuba durante 5 minutos a 0°, se detiene por una dilución de 15 veces con una solución salina que contiene Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM y se filtra en filtros de nitrocelulosa (ver Métodos).

TABLA II

Actividad de EF1 medida por su interacción con aminoacil-tRNA: Formación de un complejo ternario (EF1 : GTP : metionil-tRNA<sub>m</sub>) en filtros de nitrocelulosa

<sup>3</sup> H-met-tRNA <sub>m</sub> agregado (pmoles)	<sup>14</sup> C-GTP retenido (pmoles)	(EF1: <sup>14</sup> C-GTP: <sup>3</sup> H-met-tRNA <sub>m</sub> ) formado	(pmoles)
0	18,0		0
7	11,4		6,6
14	8,5		9,5
21	0,6		17,4
28	0		18,0

La reacción contiene Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditioneitol 1 mM, <sup>14</sup>C-GTP (ae 174 mCi/mmol) 2,5 x 10<sup>-6</sup> M, aproximadamente 100 ug de EF1 parcialmente purificado y <sup>3</sup>H-metionil-tRNA<sub>m</sub> (ae 1000 mCi/mmol). Se incuba durante 5 minutos a 0<sup>o</sup> y se cuantifica por filtración en filtros de nitrocelulosa ya que la unión del aminoacil-tRNA modifica el complejo (EF1 : GTP) impidiendo su retención en nitrocelulosa. En ausencia de <sup>14</sup>C-GTP no se retiene el <sup>3</sup>H-met-tRNA.



c) Por estimulación de la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas

Una vez formado el complejo ternario, EFl entrega el aminoacil-tRNA a los ribosomas en presencia del triplete correspondiente al aminoácido que está esterificando al tRNA. Posteriormente es probable que se produzca la hidrólisis del GTP en GDP y Pi como ocurre en sistemas bacterianos. Mediante esta reacción se puede medir la actividad de EFl por su capacidad de entregar el aminoacil-tRNA a los ribosomas. La Tabla III muestra las condiciones necesarias para medir la actividad de EFl por su capacidad de estimular la unión de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA a ribosomas de trigo en presencia de ácido poliuridílico. La reacción requiere  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{NH}_4^+$ . En la tabla no se observa la dependencia de amonio debido a la presencia de este ión en la preparación enzimática, pero si se elimina el amonio de la fracción proteica que contiene EFl se provoca una gran inactivación del factor de elongación.

Como se puede observar, el requerimiento de GTP no es absoluto ya que se necesita una concentración muy baja de este nucleótido para catalizar la unión y puede estar presente como un contaminante de los ribosomas o de otros componentes de la mezcla.

TABLA III

Ensayo de EF1 por la capacidad de entregar aminoacil-tRNA a ribosomas

Sistema	$^{14}\text{C}$ - fen - tRNA unido (pmoles)
Completo	4,66
-EF1	1,02
-Mg <sup>++</sup>	0,58
-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4,28
-Poli U	0,45
-Ribosomas	0,09
-GTP	2,32

El sistema completo contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, DTT 10 mM, GTP 0,5 mM, 40 ug de poli U, 2 a 3 unidades A<sub>260</sub> de ribosomas de trigo, 10 a 15 pmoles de  $^{14}\text{C}$ -fen-tRNA y alrededor de 50 ug de EF1 parcialmente purificado en un volumen de 0,1 ml. La reacción en ausencia de enzima se realizó con una concentración de Mg<sup>++</sup> de 7,5 mM que es óptima para la reacción enzimática (95).



d) Por estimulación de la síntesis de un polipéptido

También es posible medir la actividad de EF1 por su capacidad para estimular la síntesis de un polipéptido en presencia de ribosomas y del factor complementario EF2. La Tabla IV muestra las condiciones en que se sintetiza polifenilalanina a partir de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA en presencia de EF1 y EF2, ribosomas de trigo y ácido poliuridílico. La reacción es totalmente dependiente de GTP (a diferencia de lo que se observa para la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas) ya que EF2 requiere una concentración más alta de GTP que EF1. La presencia de esparsomicina inhibe completamente la síntesis proteica.

TABLA IV

Ensayo de EFl por formación de polipéptidos

Sistema	pmoles de fenilalanina polimerizados
Completo	5,25
-Factores de elongación	0,87
-GTP	0,65
-Poli U	0,90
-Ribosomas	0,60
+Esparsomicina ( $1 \times 10^{-4}$ M)	0,11

El sistema completo contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM, ditiotretitol 1 mM, GTP 1 mM, 40 ug de ácido poliuridílico, 2,5  $\text{UA}_{260}$  de ribosomas de trigo lavados<sup>#</sup>, alrededor de 300 ug de una fracción proteica que contiene EFl y EF2 y 8 pmoles de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol) en un volumen final de 0,1 ml. La reacción se incuba durante 15 minutos a  $37^\circ$ , se detiene con TCA al 5 % y se filtra previa destrucción del exceso de  $^{14}\text{C}$ -fen-tRNA por calentamiento (ver Métodos).

<sup>#</sup> $\text{UA}_{260}$  se define como la cantidad de RNA que absorbe 1 unidad de densidad óptica a 260 nm.



## 2. Purificación del factor de elongación I de germen de trigo

Como se puede leer en el capítulo de Métodos, EFl se purificó mediante una cromatografía en DEAE-celulosa equilibrada con KCl 150 mM y una recromatografía en DEAE-celulosa eluyendo con una gradiente lineal de KCl entre 0 y 200 mM. De esta cromatografía se obtienen dos formas de EFl de distinto peso molecular. La forma liviana se purificó por cromatografía en fosfocelulosa y filtración en gel. Después de esta última etapa se efectuó una electroforesis en gel de poli-acrilamida en la que se observó una sola banda de proteína. Sin embargo, debido a la gran labilidad del factor, no fue posible recuperar la actividad del gel de poli-acrilamida.

En la Tabla V se observan las diversas etapas de purificación en las cuales se midió la actividad por la capacidad de retener  $^3\text{H}$ -GTP en filtros de nitrocelulosa, eliminando previamente el exceso de sulfato de amonio por diálisis o por filtración en Sephadex G-25 antes de efectuar las cromatografías en DEAE-celulosa o en fosfocelulosa. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Lowry (109). La purificación se comenzó a partir de 30 g de germen de trigo comercial. Sin embargo, debido a la labilidad de EFl se produce una inactivación de esta proteína a medida que avanza su purificación y no es posible medir su grado de purificación. Se puede proteger levemente su actividad efectuando la

TABLA V

Purificación del factor de elongación I de germen de trigo

Procedimiento	<sup>3</sup> H-GTP unido (pmoles)	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)
Centrifugación a 105.000 x g	157.000	1.460	100
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40-80 % de sat)	149.200	830	95
Cromatografía en DEAE-celulosa (KCl 150 mM)	24.080	493	15,3
Recromatografía en DEAE-celulosa (KCl 0-200 mM)	15.300	373	9,8
Fosfocelulosa	7.300	123	4,6
Bio-Gel P-150	2.580	49	1,6

La actividad de EF1 se midió por la capacidad de retener <sup>3</sup>H-GTP en filtros de nitrocelulosa, previa diálisis o filtración por Sephadex G-25 para eliminar el exceso de sulfato de amonio que inhibe la reacción.



purificación en presencia de glicerol al 10 %. Una vez que EF1 está puro no ha sido posible mantenerlo activo por más de 2 días aún guardándolo a  $-20^{\circ}$  en presencia de glicerol. Weissbach, al purificar EF1 de cerebro de ternera obtiene una preparación que contiene un 10 % de la actividad que debería obtener si el factor fuera estable (99).

La recromatografía en DEAE-celulosa utilizando elución con un gradiente lineal de KCl resulta en la separación de dos formas de EF1 que eluyen con distinta concentración salina (Figura 1). La primera fracción que eluye corresponde a EF1<sub>L</sub> (liviano) y la segunda a EF1<sub>H</sub> (pesado) como se comprobó posteriormente por centrifugación en un gradiente lineal de sacarosa.

Solamente se ha purificado la especie más liviana que eluye con una concentración de KCl de 0,05 M. La otra forma eluye con concentraciones de KCl mayores que 0,1 M.

Debido a la dificultad para mantener el EF1 activo una vez purificado, en la mayoría de los experimentos se empleó el factor parcialmente purificado que se obtiene después de la cromatografía en DEAE-celulosa.

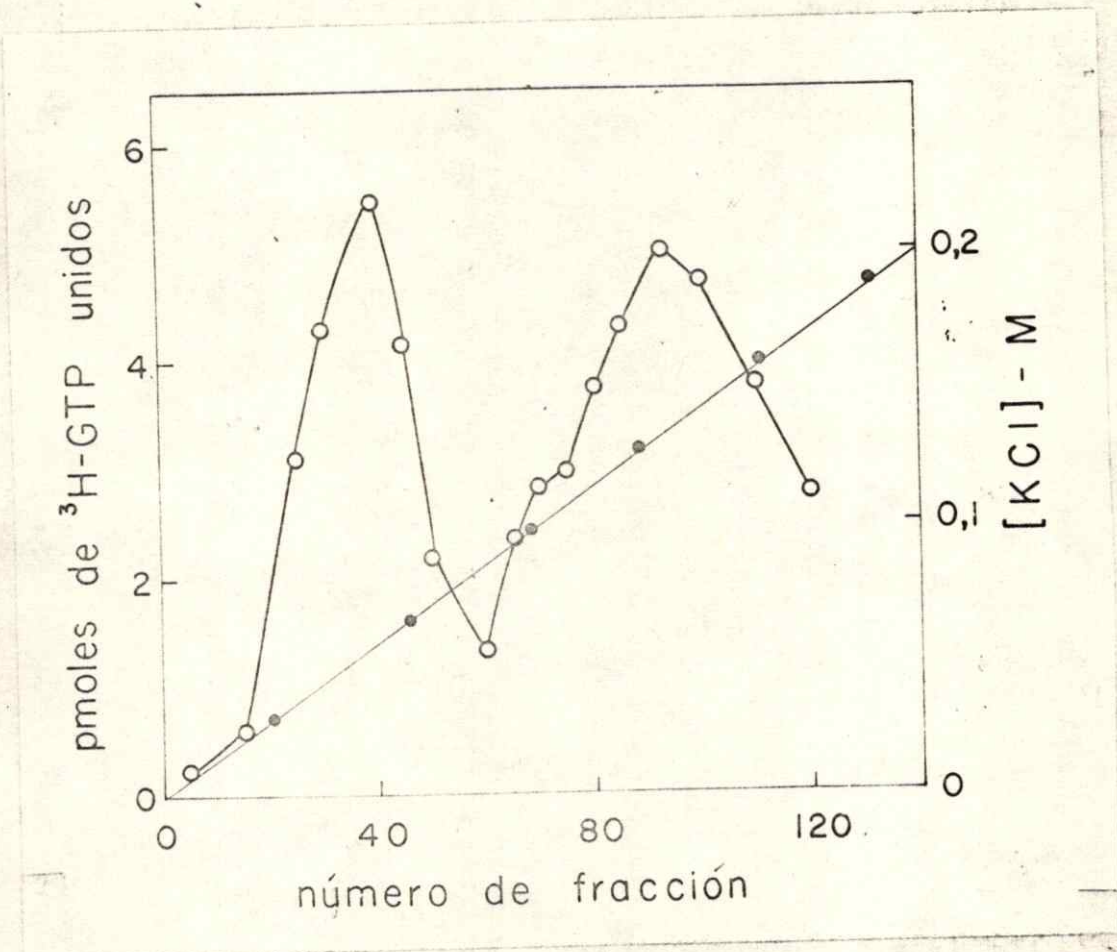


Figura 1



Figura 1. Separación de dos especies del factor de elongación I por cromatografía en DEAE-celulosa.

La columna (2,5 x 15 cm) se equilibra con Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. La fracción proteica de trigo que contiene aproximadamente 800 mg de proteína se dializa previamente durante la noche contra 2 litros de la solución empleada para equilibrar la columna. Se coloca la muestra en la columna, se lava con 100 ml de la misma solución y se eluye con una gradiente lineal de KCl entre 0 y 200 mM. Las fracciones con actividad de EF1 se analizan por su capacidad para retener <sup>3</sup>H-GTP en filtros de nitrocelulosa.

—○— unión a <sup>3</sup>H-GTP

—●— concentración molar de KCl

### 3. Perfil de elución del factor de elongación I en columnas de Sephadex G-200

La filtración de EF1 por columnas de Sephadex G-200 demuestra la existencia de varias formas de distinto peso molecular, todas ellas con capacidad para unir GTP (Figura 2); sin embargo, la interacción de las distintas especies con aminoacil-tRNA y la capacidad para catalizar la unión del aminoacil-tRNA a ribosomas son diferentes, como se verá más adelante.

En la Figura 2 se observa la existencia de una forma de peso molecular mayor que 200.000 daltones que eluye en el volumen vacío de la columna y una actividad más liviana que contiene por lo menos 3 formas moleculares distintas del factor de elongación.

Para determinar el peso molecular de estas especies de EF1, se efectuó una calibración de la columna con deshidrogenasa alcohólica, seroalbúmina de bovino, renina, tRNA y citocromo c y se determinó que las tres especies livianas tendrían un peso molecular de 83.000, 75.000 y 63.000 respectivamente (Figura 3). El fen-tRNA<sup>fen</sup> por el sobre enrollamiento de su estructura secundaria es un buen patrón para la determinación de pesos moleculares. La curva de calibración se graficó como lo describe Andrews (152).



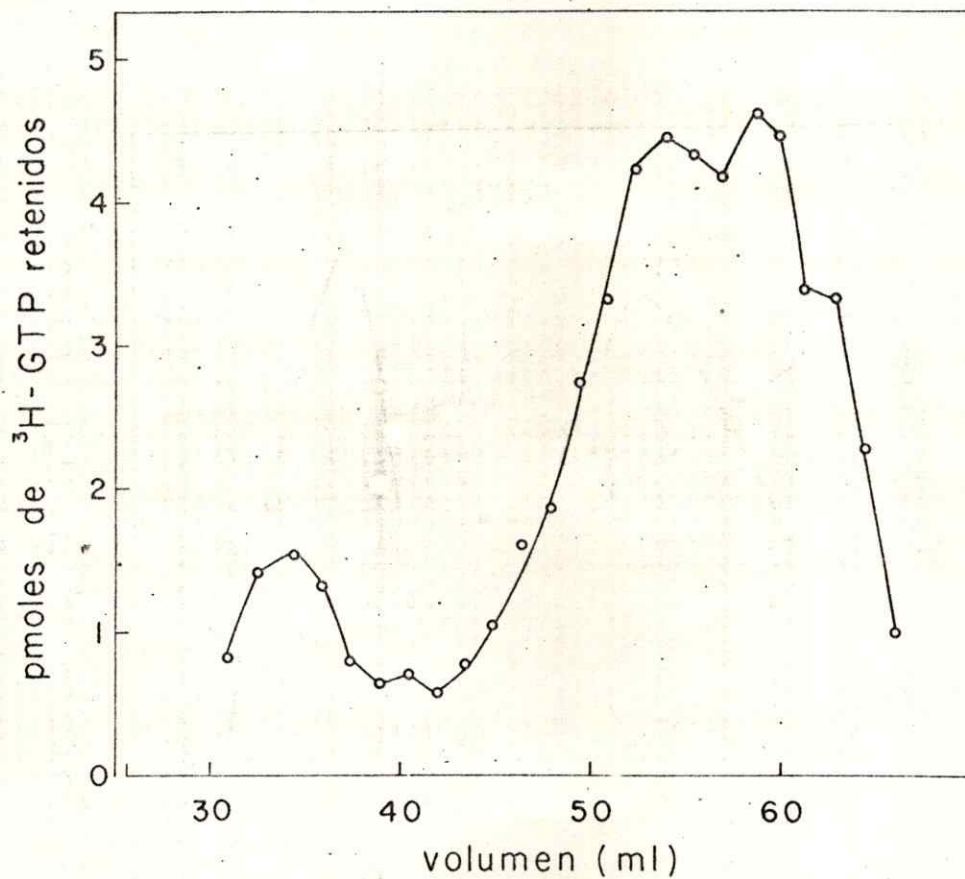


Figura 2

## Figura 2. Filtración de EF1 en Sephadex G-200

La columna de Sephadex G-200 (1,5 x 55 cm) se equilibra con Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. El factor de elongación (contenido en 30 mg de fracción sobrenadante de 105.000 x g precipitada entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio) se eluye con un flujo de 12 ml por hora. Se recogen fracciones de 1 ml y se determina su actividad por la capacidad de retener  $^3\text{H}$ -GTP en filtros de nitrocelulosa. En el volumen vacío de la columna (35 ml) eluye la fracción pesada de EF1 y las 3 formas de EF1<sub>L</sub> eluyen entre un volumen de 50 a 65 ml.



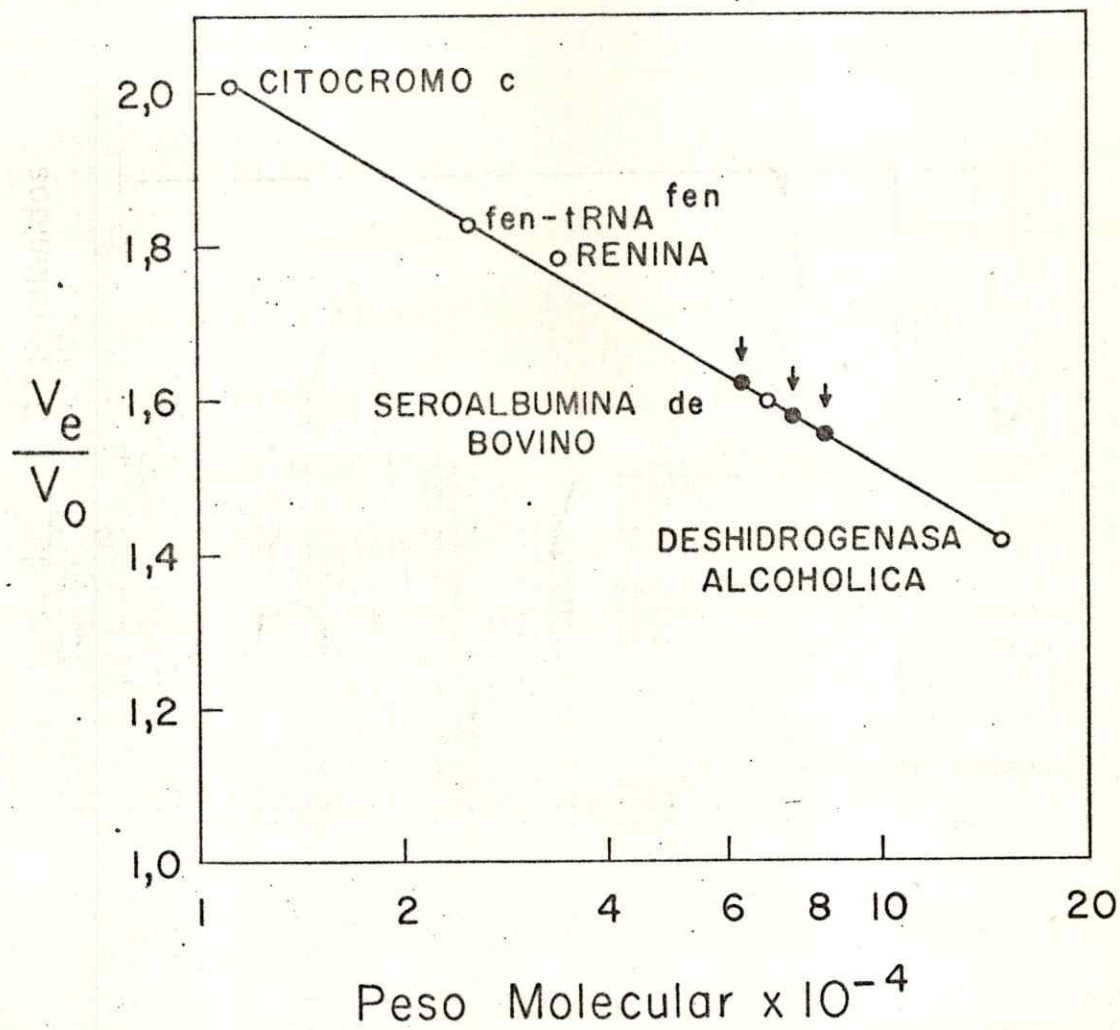


Figura 3

Figura 3. Determinación del peso molecular de  $EF1_L$  de trigo por filtración en gel.

Se emplea una columna de Sephadex G-200 (1,5 x 55 cm) equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $NH_4Cl$  50 mM,  $MgCl_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM. Las proteínas de referencia utilizadas son deshidrogenasa alcohólica (peso molecular 150.000), cuyo volumen de elución se determina midiendo la actividad de reducción del  $NAD^+$  (153), seroalbúmina de bovino (peso molecular 63.000) y renina (peso molecular 34.000), medidas por su absorbancia a 280 nm,  $^{14}C$ -fen-tRNA<sup>fen</sup> (peso molecular 25.000) cuyo volumen de elución se mide por la aparición de la radiactividad precipitada con TCA al 5 % y citocromo c (peso molecular 12.500) medido por su absorbancia a 395 nm.  $EF1_L$  de trigo parcialmente purificado en una columna de DEAE-celulosa, se mide por su capacidad de retener  $^3H$ -GTP en filtros de nitrocelulosa (ver Métodos).



#### 4. Estabilidad del sitio de unión de GTP y de aminoacil-tRNA

El aminoacil-tRNA es capaz de interactuar con EF1 sólo cuando éste se ha unido previamente al GTP. El aislamiento de un complejo (EF1:aa-tRNA) en ausencia de GTP no es posible, lo que indicaría que el factor de elongación sufre una modificación en su estructura después de la unión del GTP que permite la entrada del aminoacil-tRNA.

La estabilidad del sitio de unión de GTP se midió por la formación del complejo binario (EF1 : GTP) retenido en filtros de nitrocelulosa. La incubación de EF1 durante 2 minutos a 37° inhibe en aproximadamente un 20 % la formación del complejo binario (Tabla VI), lo que demuestra una relativa estabilidad de este sitio dada la labilidad del factor de elongación.

La presencia de GTP durante la incubación de EF1 a 37° protege totalmente el sitio de unión de GTP.

En cambio el sitio de unión del aminoacil-tRNA es muy inestable; la preincubación de EF1 durante 2 minutos a 37° inactiva en un 80 % la unión del aminoacil-tRNA. La estabilidad del sitio de unión del aminoacil-tRNA se midió por el ensayo en filtro de nitrocelulosa ya que a diferencia del complejo binario (EF1 : GTP), el ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA) no es retenido en estos filtros. La cantidad de complejo ternario formado se determinó por diferencia de los pmoles de (EF1 : <sup>3</sup>H-GTP) retenidos en el filtro al agregar el aminoacil-tRNA (Figura 4).

TABLA VI

Estabilidad del sitio de unión de GTP en el factor de elongación I de  
germen de trigo

Tratamiento de EFl	<sup>3</sup> H-GTP unido (pmoles)	Inactivación (%)
Ninguno	18,5	-
2' a 37°	14,4	22
2' a 37° con GTP	18,2	1,5

La reacción se realiza por incubación de 50 ng de EFl con <sup>3</sup>H-GTP durante 5 minutos a 0° en las condiciones descritas en Métodos.

La concentración de GTP empleada es de  $2,5 \times 10^{-6}$  M.



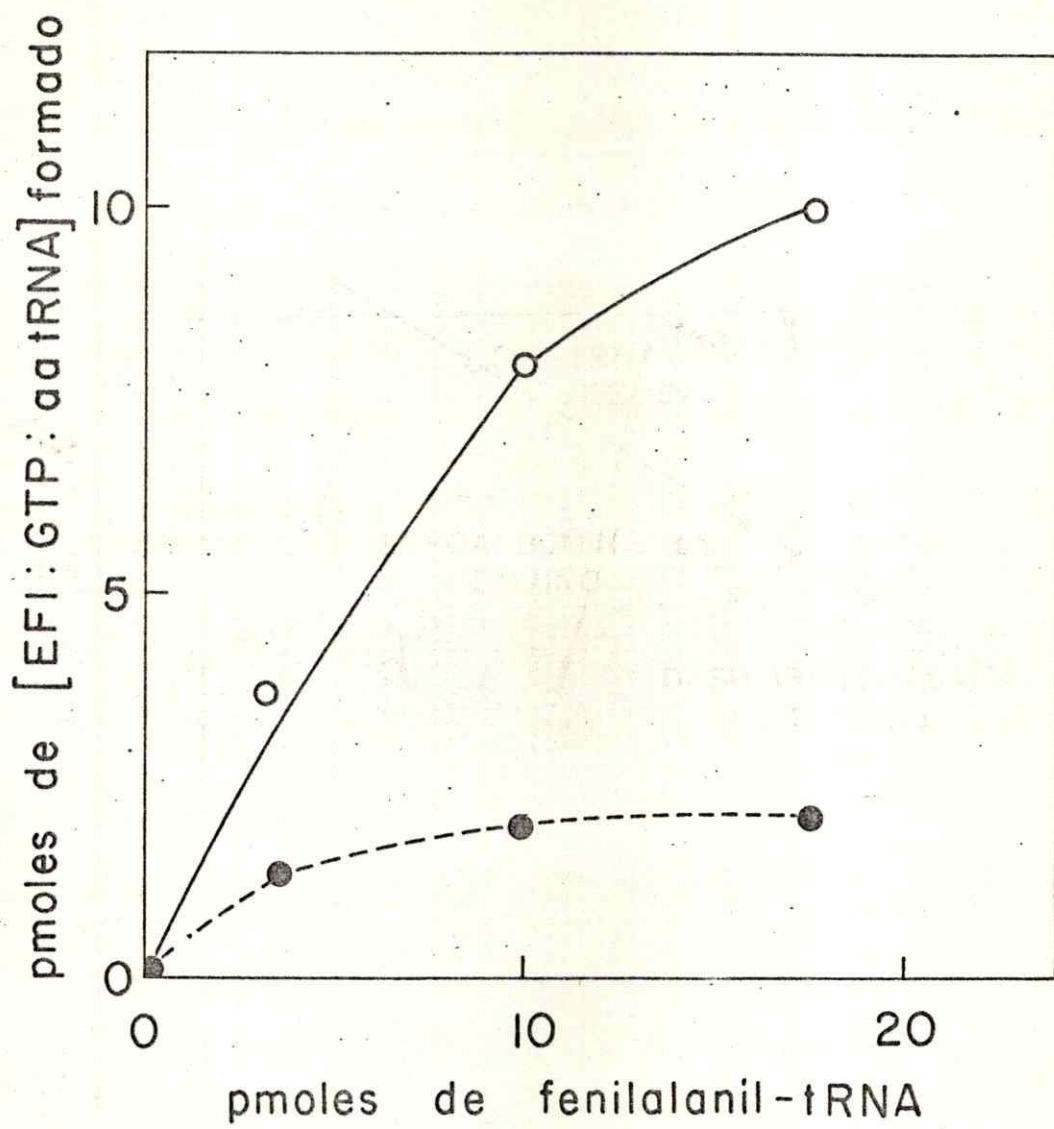


Figura 4

Figura 4. Estabilidad de EF1 en el sitio de interacción con aminoacil-tRNA por formación del complejo (EF1 : GTP : fenilalanil-tRNA).

Se incubó EF1 con  $^3\text{H}$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M y  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol) en las concentraciones indicadas en un volumen total de 0,2 ml (ver Métodos) durante 5 minutos a  $0^\circ$ .

○ — ○ (EF1 : GTP) sin preincubar

● - - - ● (EF1 : GTP) preincubado durante 2 minutos a  $37^\circ$ .



Para estudiar la estabilidad del sitio de unión del aminoacil-tRNA se preincubó EF1 durante 2 minutos a 37° en presencia de GTP (se agregó GTP ya que el complejo binario es más estable que EF1). La preincubación de EF1 sin GTP en las mismas condiciones inactiva parcialmente la unión de GTP, como se observó en la Tabla VI, por lo que no es posible estudiar la estabilidad de la unión del aminoacil-tRNA sin haber protegido previamente el sitio de unión de GTP.

##### 5. Centrifugación del factor de elongación EF1 en gradiente de sacarosa

La separación de dos especies de EF1 se puede observar también por centrifugación del factor en gradientes de concentración de sacarosa entre 5 y 20 % p/p según se ha descrito en el capítulo de Métodos.

En la Figura 5A se observan las dos formas presentes en una fracción del sobrenadante 105.000 x g que ha sido precipitada entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio; las mismas formas están presentes después de efectuar una cromatografía de la fracción precipitada con sulfato de amonio en DEAE-celulosa equilibrada y eluída con KCl 0,20 M (Figura 5B). Los picos de las figuras A y B no son coincidentes pues se analizaron en centrifugaciones separadas. La cromatografía de EF1 en una columna de fosfocelulosa retiene o provoca una inactivación de la forma pesada ya que sólo es posible eluir la especie más liviana, como se puede demostrar al analizar esta actividad en una gradiente de sacarosa (Fig.5C).

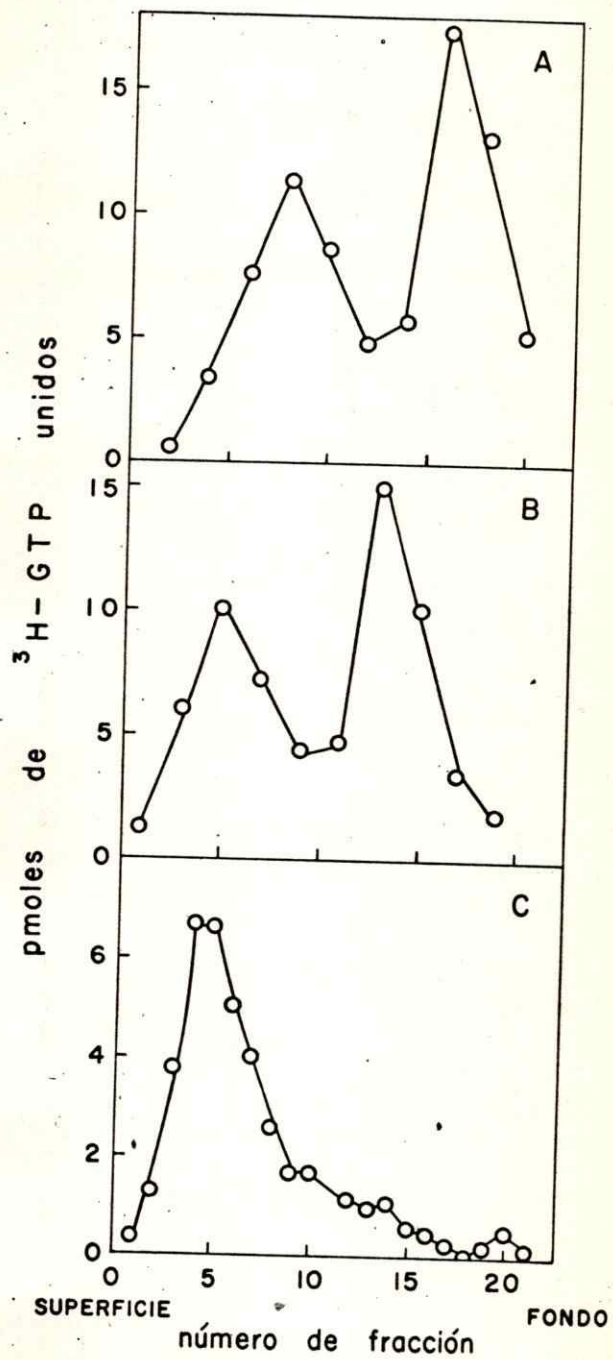


Figura 5



Figura 5. Separación de  $EF1_L$  y  $EF1_H$  por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa.

Se efectúa una separación de las dos formas del factor de elongación por centrifugación en gradiente de sacarosa entre 5 y 20 % p/p, centrifugando durante 18 horas a 37.000 rpm en un rotor SW 39 (ver Métodos).

Se recogen fracciones de 6 gotas cada una y la actividad de  $EF1$  se mide por su capacidad de retener  $^3H$ -GTP en filtros de nitrocelulosa.

A: centrifugación de una fracción del sobrenadante  $105.000 \times g$  precipitado previamente entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio.

B: centrifugación de una fracción proveniente de una cromatografía en DEAE-celulosa eluída con KCl 0,2 M.

C: centrifugación de una fracción proveniente de una cromatografía en fosfocelulosa eluída con KCl 0,15 M.

Se ha observado que la razón entre las actividades de la fracción liviana y la fracción pesada varía en las distintas preparaciones enzimáticas, dependiendo aparentemente del tiempo de almacenamiento a  $-20^{\circ}$  del factor de elongación. Con el envejecimiento de las preparaciones va disminuyendo  $EF1_H$  en relación a  $EF1_L$ .

6. Estabilidad de las formas  $EF1_H$  (de mayor peso molecular) y  $EF1_L$  (de menor peso molecular)

Las formas  $EF1_H$  y  $EF1_L$  aisladas presentan diferente estabilidad al ser incubadas a  $37^{\circ}$ , medidas ambas por su capacidad para unir  $^3H$ -GTP. Como se observa en la Figura 6, la incubación de  $EF1_L$  a  $37^{\circ}$  durante 10 minutos produce una inactivación de alrededor de un 75 % de la actividad del factor para unir  $^3H$ -GTP; en cambio la fracción de mayor peso molecular,  $EF1_H$ , al ser incubada en las mismas condiciones pierde sólo un 12 % de su actividad original. De esto se deduce que la fracción de bajo peso molecular presenta una estabilidad muy disminuída frente a  $EF1_H$ . En estos experimentos se utilizaron concentraciones proteicas similares de ambas formas de  $EF1$ .



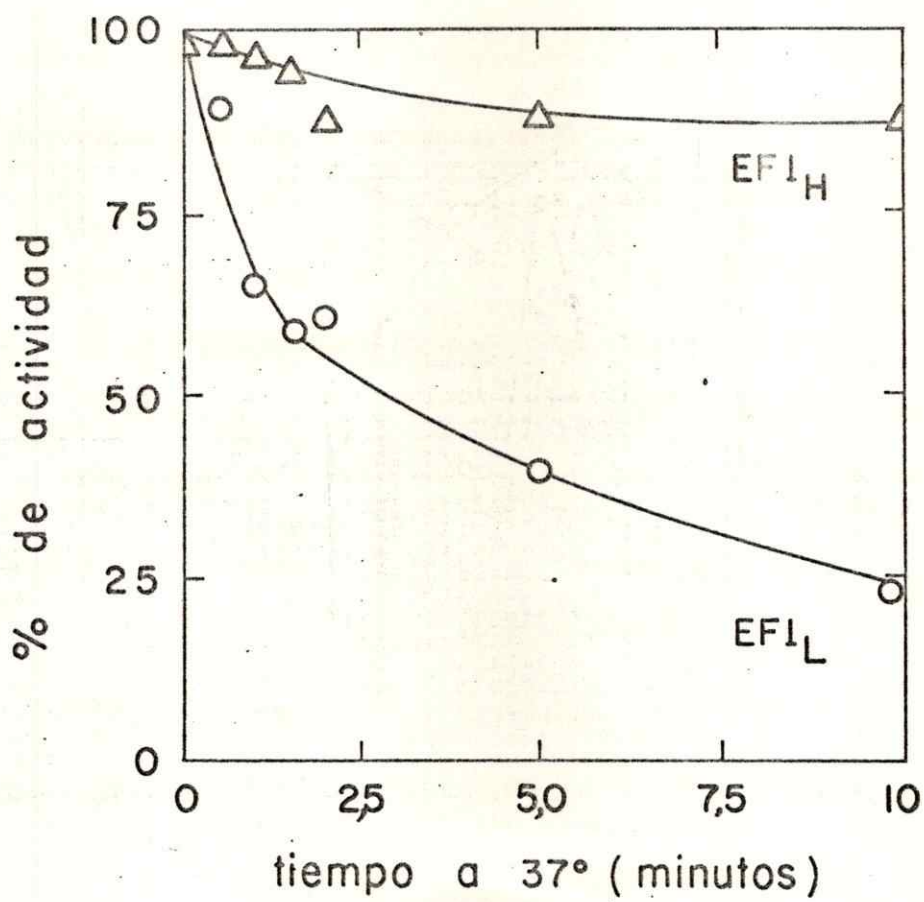


Figura 6

Figura 6. Estabilidad de  $EF1_H$  y  $EF1_L$  de germen de trigo

Se emplean concentraciones proteicas similares de  $EF1_H$  y  $EF1_L$ . Se mide la capacidad de ambas preparaciones para unir  $^3H$ -GTP (100 % corresponde aproximadamente a una capacidad para unir 8,5 pmoles de  $^3H$ -GTP en el caso de  $EF1_L$  y 10,4 pmoles para  $EF1_H$ ). Después de la incubación a  $37^\circ$  se mide la actividad remanente agregando  $^3H$ -GTP, incubando 5 minutos a  $0^\circ$  y filtrando el complejo en filtros de nitrocelulosa (ver Métodos).



## 7. Presencia de fosfolípidos en el factor de elongación EF1

En los últimos años se ha postulado repetidamente la idea de que gran parte de los complejos multienzimáticos existentes en las células mantendrían su estructura mediante la presencia de lípidos que interactuarían con los grupos apolares de las moléculas proteicas.

Weissbach y colaboradores observaron que en tejido de cerebro de ternera la fracción EF1 de alto peso molecular contiene colesterol y ésteres de colesterol mientras que la fracción liviana no los contiene (110).

En un intento por determinar la presencia de fosfolípidos en los factores de elongación y su influencia en la actividad, se estudió la capacidad de EF1 para unir GTP en presencia de diversas fosfolipasas. La fosfolipasa C hidroliza el enlace fosfoéster del fosfolípido y la fosfolipasa D hidroliza el enlace entre el fosfato y la base del fosfolípido (111).

Se preincubó el factor de elongación con distintas concentraciones de fosfolipasa C durante 15 minutos a 20<sup>o</sup> en presencia de CaCl<sub>2</sub> 2 mM y se centrifugó en una gradiente de sacarosa para analizar posteriormente la actividad de unión a GTP de las especies liviana y pesada separadas por la gradiente. En la figura 7 se observa el efecto de distintas concentraciones de fosfolipasa C sobre EF1. A diferencia de lo que se había encontrado en cerebro la fosfolipasa inactiva la fracción liviana del factor de elongación.





Figura 7. Efecto de fosfolipasa C sobre la actividad de las especies  $EF1_L$  y  $EF1_H$  separadas por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa y medida por su capacidad de retener  $^3H$ -GTP en filtros de nitrocelulosa.

Se centrifugan 5 mg de una fracción sobrenadante de  $105.000 \times g$  de germen de trigo precipitada entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio incubados previamente con fosfolipasa C, en un gradiente de sacarosa. Se recogen fracciones y se analizan en su actividad para unir GTP. Para ello se incuban 50  $\mu$ l de cada fracción con 1.000 pmoles de  $^3H$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol) durante 5 minutos a  $0^\circ$ .

A: sin fosfolipasa C

B: con 300  $\mu$ g de fosfolipasa C

C: con 700  $\mu$ g de fosfolipasa C

Aparentemente la fracción pesada es un complejo enzimático tan grande que la fosfolipasa es incapaz de inactivarlo. En cambio la fracción liviana que presenta varias formas, como se pudo ver por filtración en Sephadex G-200 (Figura 2), es inactivada ostensiblemente por la fosfolipasa C. Es muy probable que la fracción liviana conste de dímeros y monómeros de EF1 como lo ha descrito Legocki (97), en que los fosfolípidos juegan un papel importante en la mantención de la actividad del factor. La incubación de EF1<sub>L</sub> con la fosfolipasa C puede provocar una hidrólisis de los lípidos existentes en EF1, de modo de producir como consecuencia una inactivación de la fracción liviana del factor. Es posible que esto no ocurra con la fracción pesada ya que por su alto peso molecular y por la complejidad de la molécula es difícil que la fosfolipasa pueda llegar al fosfolípido y causar su hidrólisis.

En la Figura 7 se observa además que la cantidad de la fracción pesada se mantiene invariable (el área bajo las curvas de la fracción pesada son prácticamente iguales), lo que permitiría afirmar la ausencia de proteasas en la preparación de fosfolipasa C.

La fosfolipasa D tiene el mismo efecto de inactivar la fracción liviana de EF1 como se muestra en la Figura 8 en que el factor de elongación fue preincubado con fosfolipasa D y sus especies fueron separadas por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa. Se observa que



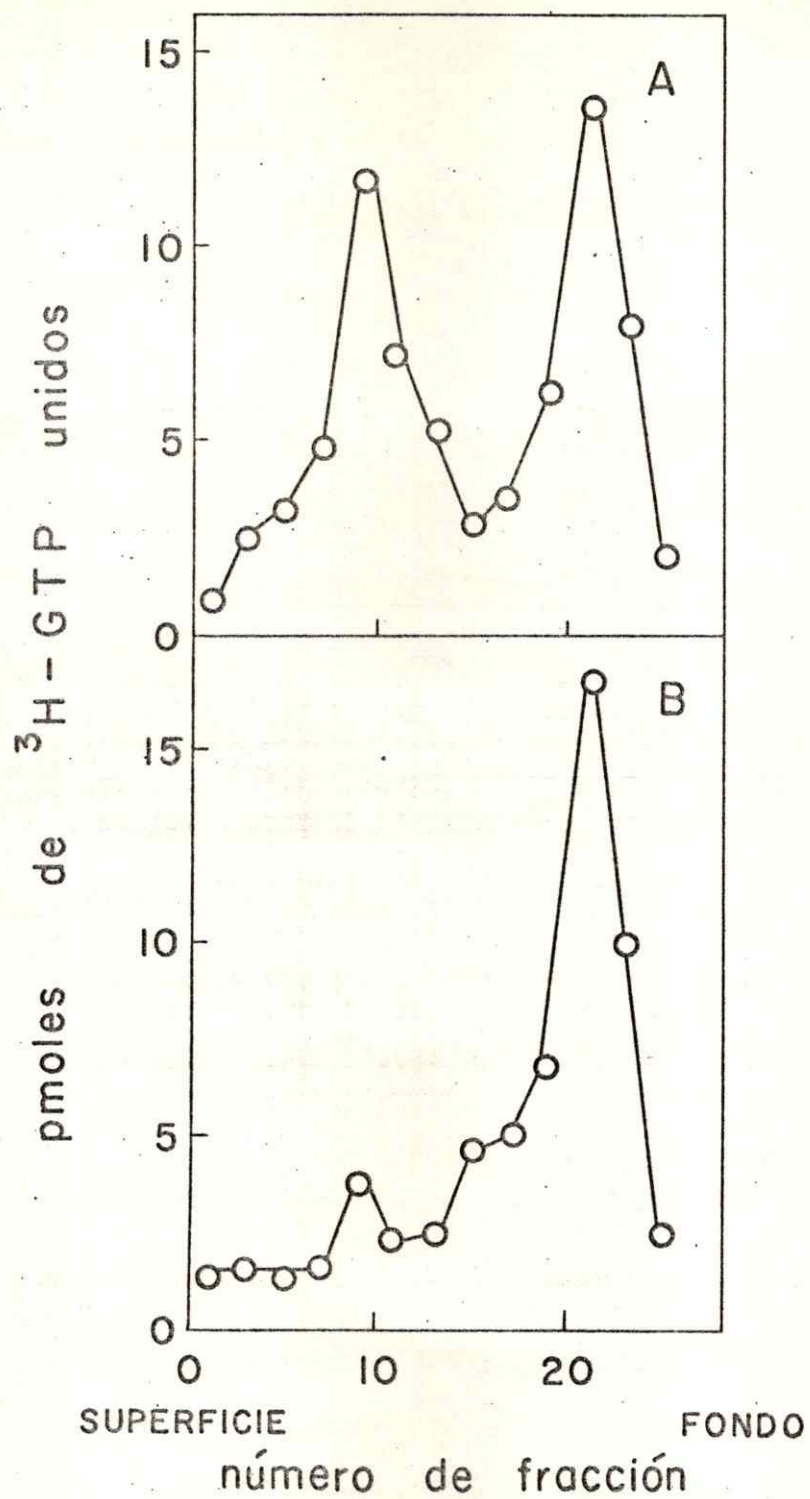


Figura. 8

Figura 8. Efecto de fosfolipasa D sobre la actividad de las dos formas de EF1 separadas por centrifugación en una gradiente lineal de sacarosa.

El factor de elongación proveniente de una fracción sobrenadante de una centrifugación a  $105.000 \times g$  y precipitado entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio, se preincuba con 300 ug de fosfolipasa D durante 15 minutos a  $20^{\circ}$  y se centrifuga en una gradiente de concentración de sacarosa entre 5 y 20 % p/p. Se recogen fracciones de 6 gotas y se analizan por su capacidad para retener  $^3H$ -GTP en filtros de nitrocelulosa.

A: sin tratamiento con fosfolipasa

B: preincubado con 300 ug de fosfolipasa D



bastan 300 ug de fosfolipasa D para inactivar casi totalmente EF1<sub>L</sub>.

El efecto de la fosfolipasa A sobre EF1 no se pudo medir debido a la gran cantidad de proteasas que contienen las preparaciones comerciales de esta enzima.

El análisis directo de lípidos por cromatografía en capa fina previa hidrólisis total de EF1 con HCl 6 N (ver Métodos) reveló la presencia de 3 manchas de distinto R<sub>f</sub> que se tifican con vapores de yodo. No se continuó la identificación de los lípidos por no contar con los patrones necesarios.

## CAPITULO II

### INTERACCION DE EF1 CON GTP Y ANALOGOS DE GTP

#### 1. Complejo (EF1 : GTP)

En el Capítulo I se vio que una de las formas de medir la actividad del factor de elongación es por su interacción con GTP. EF1 y GTP forman un complejo bastante estable a 0° que es retenido en filtros de nitrocelulosa. Empleando GTP radiactivo es posible cuantificar la actividad de EF1 ya que la unión de GTP a la proteína es estequiométrica.

La Figura 9 muestra la formación del complejo binario medido por su retención en filtros de nitrocelulosa. Se observa que con una concentración de alrededor de  $2,5 \times 10^{-6}$  M se obtiene una saturación del factor de elongación. La cantidad de complejo binario formado es directamente proporcional a la concentración de EF1 presente como se muestra en la Figura 10.

La formación del complejo binario es muy rápida y la reacción se completa totalmente en menos de 5 minutos de incubación a 0°, por lo que las mediciones efectuadas se refieren a reacciones en el equilibrio y no a velocidades iniciales.



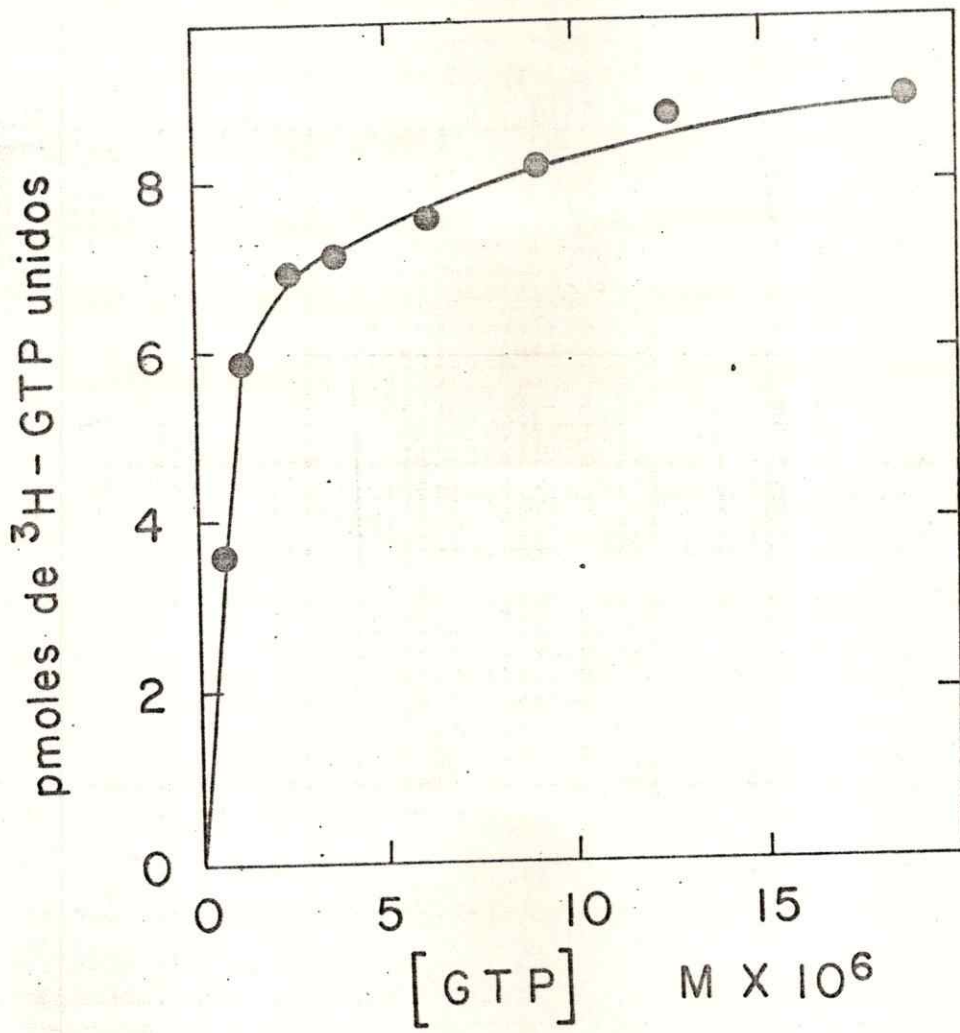


Figura 9

Figura 9. Formación del complejo binario (EF1 : GTP)

La cuantificación del complejo binario se efectúa incubando EF1 parcialmente purificada con  $^3\text{H}$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol) en las condiciones salinas habituales durante 10 minutos a  $0^\circ$ . La reacción se detiene diluyendo 15 veces el volumen de incubación con solución salina (ver Métodos) y el complejo (EF1 : GTP) formado se mide por retención en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en un sistema de centelleo.



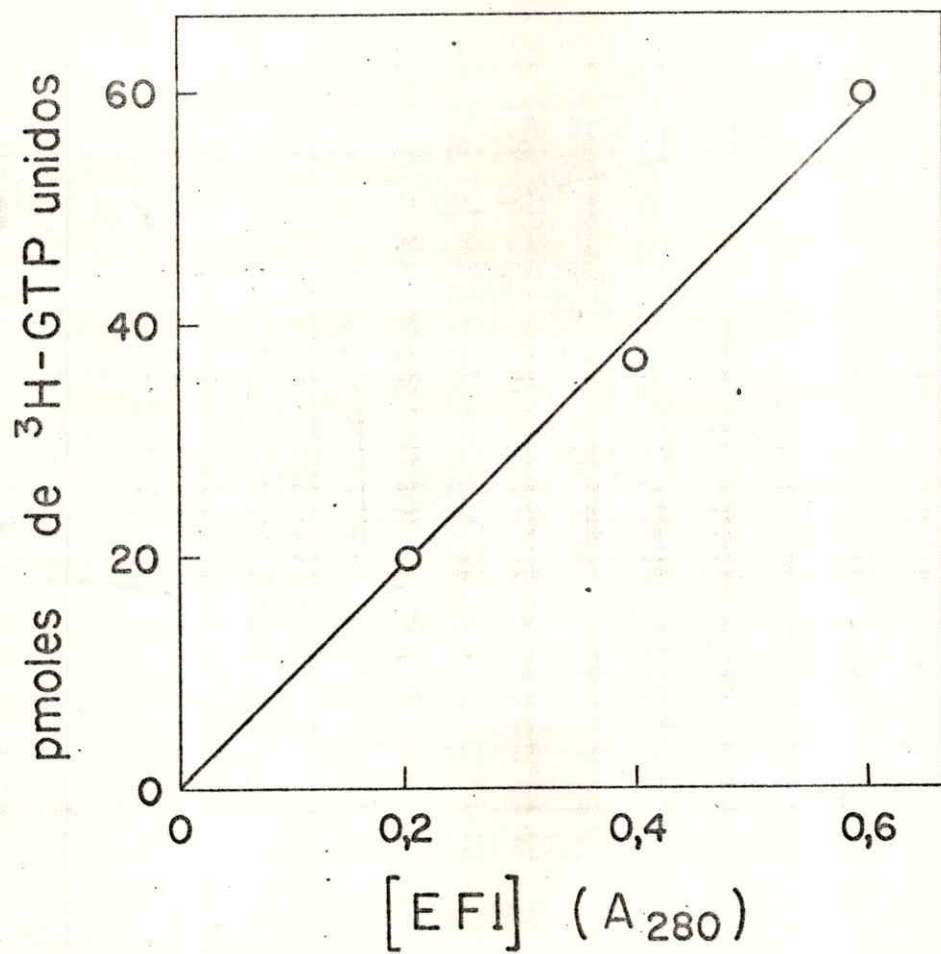


Figura 10

Figura 10. Formación del complejo binario (EF1 : GTP) en función de la concentración de EF1.

La reacción se efectúa por incubación en 0,2 ml de distintas concentraciones de una preparación enzimática que contiene EF1 (la cantidad de proteína se varió de 0 a 600 ug aproximadamente) y  $^3\text{H-GTP}$   $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$  (ae 1000 mCi/mmol) en las condiciones habituales. La incubación se efectúa a  $0^{\circ}$  durante 5 minutos; se detiene por una dilución de 15 veces y se filtra en filtros de nitrocelulosa.



## 2. Estabilidad del complejo (EF1 : GTP)

El complejo binario es estable por más de 1 hora a 0° cuando hay un exceso de GTP en el medio de incubación. Es decir, que existe un equilibrio entre el GTP unido al factor y el GTP libre. En ausencia de GTP, lo que se logra por dilución del medio de reacción, disminuye levemente la estabilidad del complejo binario. En 20 minutos se observa una degradación menor que un 10 % (Tabla VII).

## 3. Constantes de disociación del complejo binario (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP)

El factor de elongación interactúa con gran afinidad no solo con el guanosín trifosfato (GTP) sino también con el GDP y ambos nucleótidos se unen en el mismo sitio del factor. Es probable que en el momento en que EF1 entrega el aminoacil-tRNA a los ribosomas se produzca concomitantemente la hidrólisis de GTP a GDP y Pi liberándose por lo tanto EF1 unido a GDP, como ocurre en E. coli.

Las constantes de disociación de los complejos (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP) se midieron en soluciones diluidas de EF1 y GTP o GDP respectivamente y el equilibrio se estableció diluyendo una mezcla de (EF1 : GTP) y GTP o (EF1 : GDP) y GDP con solución salina. La cantidad de nucleótido unido a EF1 se midió empleando <sup>14</sup>C-GTP o <sup>14</sup>C-GDP respectivamente, según el esquema de Miller y Weissbach (71).

TABLA VII

Estabilidad del complejo binario (EF1 : GTP)

Tiempo a 0° (minutos)	pmoles de (EF1 : GTP)
0	15,2
5	14,3
10	13,8
15	14,5
20	14,2

El complejo binario (EF1 : GTP) se forma por incubación de EF1 y  $^3\text{H-GTP } 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  (ae 1000 mCi/mmol) durante 5 minutos a 0° en las condiciones habituales. La reacción se detiene por una dilución de 15 veces del volumen de reacción y se mide la estabilidad del complejo después de mantenerlo diluido durante distintos tiempos.



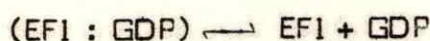
Las constantes de disociación se calcularon según la ecuación



en el equilibrio se tiene:

$$K_d = \frac{(EF1 - (EF1 : GTP)) (GTP - (EF1 : GTP))}{(EF1 : GTP)}$$

Para el caso de GDP:



en el equilibrio se tiene:

$$K_d = \frac{(EF1 - (EF1 : GDP)) (GDP - (EF1 : GDP))}{(EF1 : GDP)}$$

Las constantes de disociación se midieron a varias concentraciones de GTP o de GDP y con concentraciones limitantes de EF1.

### 3a) Constante de disociación del complejo (EF1 : GTP)

La constante de disociación del complejo (EF1 : GTP) se midió en presencia de ácido fosfoenol pirúvico ( $4 \times 10^{-3}$  M) y 10 ug de fosfoenol pirúvico quinasa para evitar una posible hidrólisis espontánea del GTP. Se determinó la concentración máxima de enzima de modo que estuviera limitante y que no hubiera inhibición de la reacción por sulfato de amonio; no es conveniente eliminar el sulfato de amonio por diálisis o por filtración en gel ya que ello provoca una gran inactivación de EF1. Se empleó una concentración de EF1 capaz de unir 12,9 pmoles de GTP/ml. Se midió

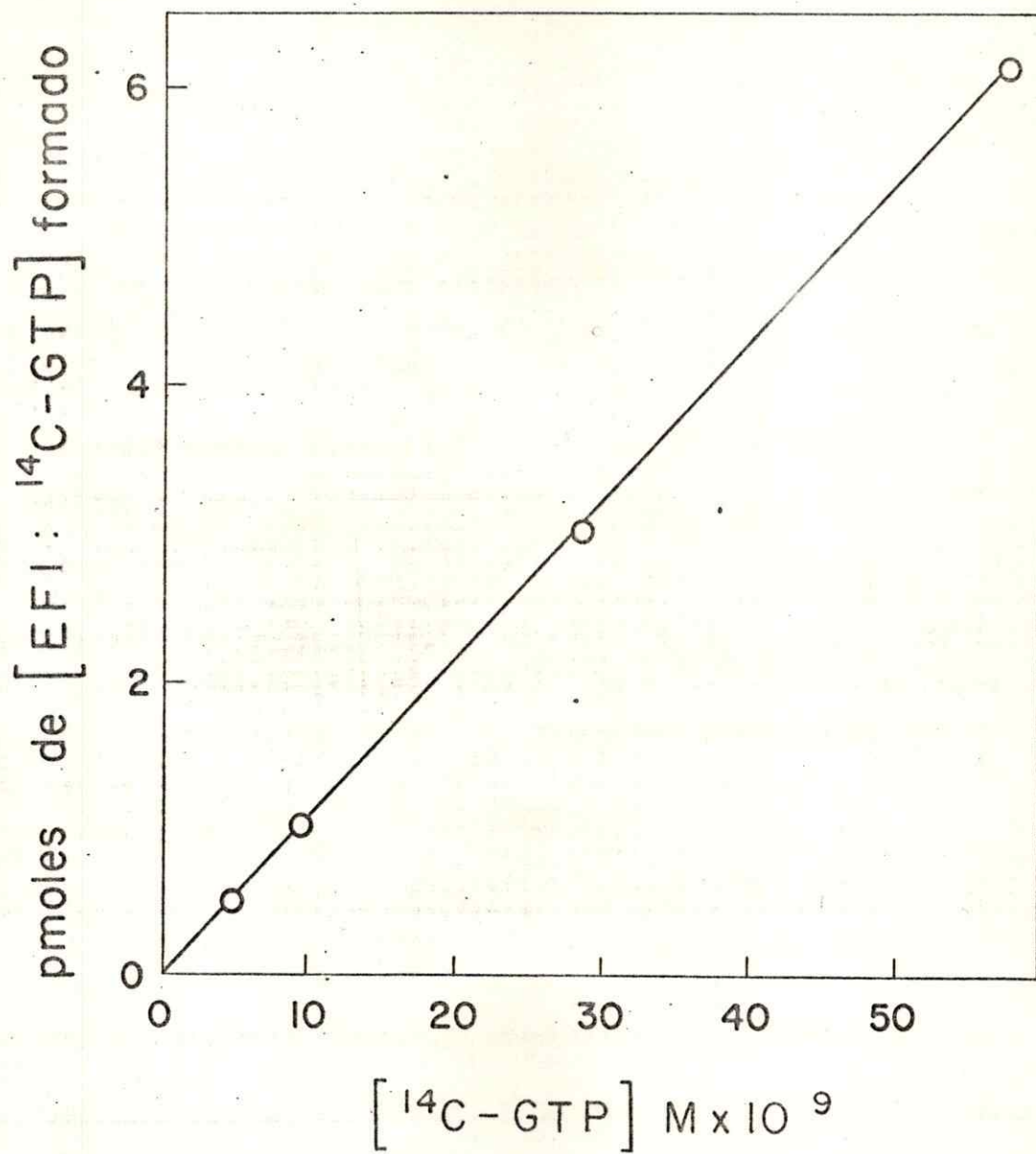


Figura 11



la formación del complejo (EF1 : GTP) variando la concentración de  $^{14}\text{C}$ -GTP desde 0 hasta 60 pmoles/ml (Figura 11). De los valores de la curva se obtuvo un valor de  $K_d = 1 \times 10^{-7}$  M.

Figura 11. Determinación de la constante de disociación del complejo  
(EF1 : GTP)

La reacción se efectúa por incubación de 12,9 pmoles de EF1 (medido por su actividad para unir GTP) con cantidades variables de  $^{14}\text{C}$ -GTP (ae 174 mCi/mmol), Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM, ditioneitol 0,5 mM, 100 ug de seroalbúmina de bovino,  $4 \times 10^{-3}$  M de fosfoenol pirúvico y 10 ug de fosfoenol pirúvico quinasa, en un volumen final de 1,0 ml durante 15 minutos a  $0^\circ$ .

De cada ensayo (1 ml) se tomaron 3 alícuotas de 0,3 ml cada una y se filtraron separadamente por lo que cada punto de la curva es un promedio de 3 determinaciones. Cada alícuota se agregó directamente sobre los filtros que se lavan con 10 ml de solución salina, se secan y cuentan en un sistema de centelleo.

### 3 b) Constante de disociación del complejo (EF1 : GDP)

El complejo con GDP se efectuó por incubación de EF1 con  $^{14}\text{C}$ -GDP en presencia de 50  $\mu\text{g}$  de seroalbúmina de bovino. Se empleó una cantidad de enzima capaz de unir 7,4 pmoles de GDP/ml. La constante de disociación del complejo, calculada usando varias concentraciones de GDP fue de  $2,5 \times 10^{-8}$  M (Figura 12).

En las mismas condiciones descritas anteriormente se determinaron las constantes de disociación de los complejos (EFTu : GTP) y (EFTu : GDP) de E. coli. La Tabla VIII muestra los valores de las constantes de disociación obtenidos para los sistemas de trigo y de E. coli. Se observa que en el sistema de trigo el factor EF1 tiene una afinidad 4 veces mayor por GDP que por GTP; en cambio en el sistema bacteriano la afinidad por GDP es aproximadamente 23 veces mayor que por GTP.

El hecho de que en E. coli la afinidad por GDP sea mucho mayor que por GTP explica la necesidad de que exista un factor EFTs capaz de actuar catalíticamente disociando el complejo (EFTu : GDP) y regenerar EFTu libre o unido a GTP. En cambio en trigo, la afinidad de EF1 por GDP es sólo 4 veces mayor que por GTP; es posible que por este hecho no sea necesaria la existencia de un factor semejante a Ts para disociar el complejo (EF1 : GDP). Se han efectuado numerosos intentos para detectar una actividad semejante a Ts en diversos sistemas de eucariontes y no se



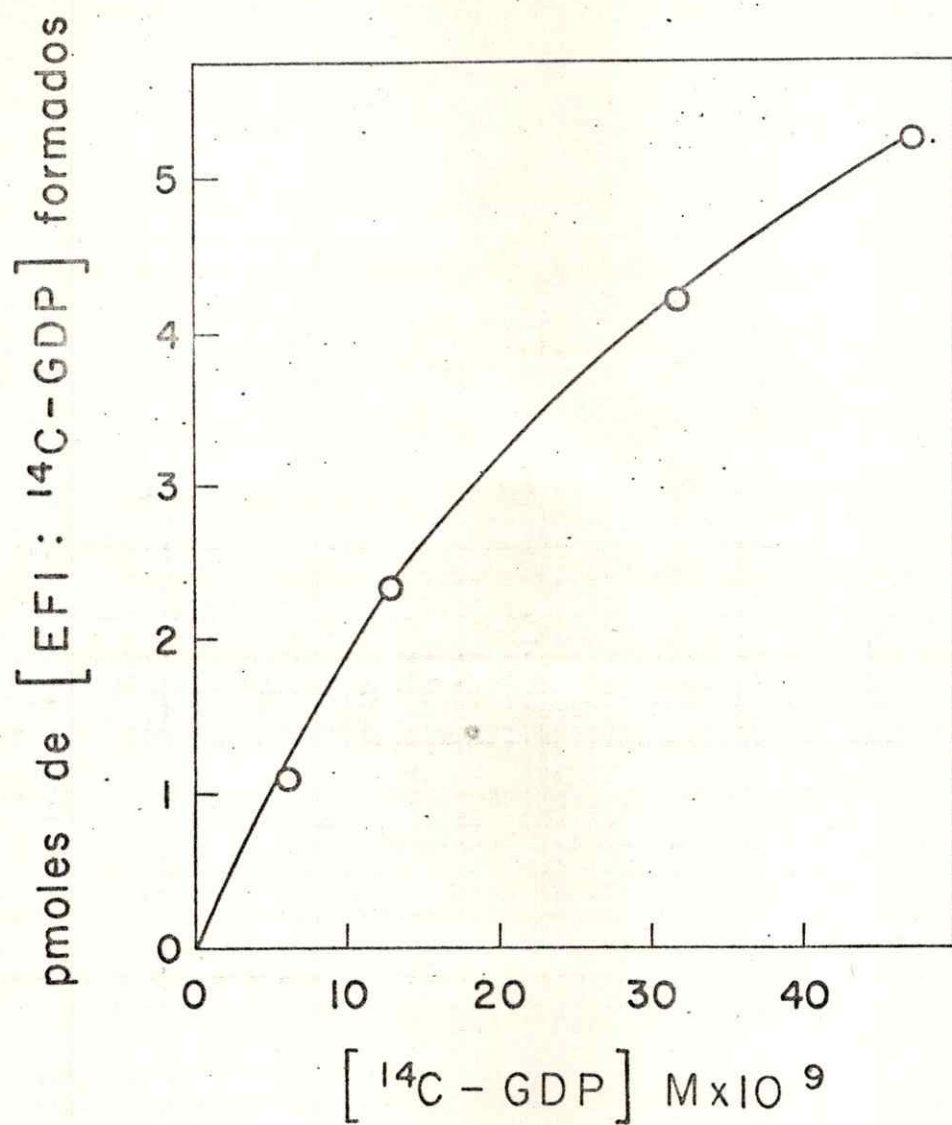


Figura 12

Figura 12. Determinación de la constante de disociación del complejo  
(EF1 : GDP)

El ensayo de reacción contiene en 1 ml, Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $MgCl_2$  10 mM,  $NH_4Cl$  50 mM, ditioneitol 0,5 mM, 100 ug de seroalbúmina de bovino,  $^{14}C$ -GDP (ae 27 mCi/mmol) en cantidades variables y 7,4 pmoles de EF1 (medido por su actividad para unir GDP). La reacción se incuba durante 15 minutos a  $0^\circ$  en las condiciones habituales; se toman 3 alícuotas de 0,3 ml que se colocan directamente en filtros de nitrocelulosa, se lavan con 10 ml de solución salina (ver Métodos) y se cuentan en un sistema de centelleo.



ha encontrado dicha actividad. La existencia de dos formas de EF1 de distinto peso molecular parecía indicar que una de ellas tuviera otra actividad unida a EF1 pero no ha sido posible detectarla.

Weissbach (99) describe la existencia de dos formas de EF1 de distinto peso molecular en cerebro de ternera,  $EF1_A$  y  $EF1_B$  interconvertibles entre sí mediante la acción de GTP y aminoacil-tRNA y plantea la posibilidad de que una de ellas contuviera una actividad semejante a EFTs. Lo mismo propone Kaziro (112) trabajando con los factores de elongación de hígado de cerdo en donde encuentra dos factores,  $EF1_\alpha$  y  $EF1_\beta$ , cuya acción se complementa al estimular la unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas.

#### 4. Interacción de EF1 con ppGpp

Desde el aislamiento del ppGpp en E. coli (guanosín 5'-difosfato, 3' (o 2')-difosfato) por Cashel y sus colaboradores (113-115), se han efectuado numerosos estudios para determinar la importancia de este compuesto en la regulación de la síntesis proteica. Se ha observado que el ppGpp se sintetiza por transferencia de un pirofosfato desde el ATP a GDP (116) (o GTP en el caso de sintetizarse pppGpp), en una reacción estimulada por un factor restrictivo que está asociado a los ribosomas de cepas restrictivas de E. coli (117). En estas cepas se detiene la síntesis de RNA al privarlas de un aminoácido para el cual son auxotróficas y conjuntamente con este hecho se produce la síntesis de ppGpp y pppGpp (118).

TABLA VIII

Constantes de disociación de (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP) de trigo y de E. coli

	Constante de disociación de:		$\frac{K_a(\text{EF:GDP})}{K_a(\text{EF:GTP})}$
	(EF1 : GDP)	(EF1 : GTP)	
EF1 de trigo	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-8} \text{ M}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-7} \text{ M}$	4
EFTu de <u>E. coli</u>	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8} \text{ M}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ M}$	23

El factor de elongación de E. coli se prepara como lo describen Ravel y colaboradores (131). Las constantes de disociación de los complejos (EFTu : GTP) y (EFTu : GDP) se determinan igual que las constantes de disociación de los complejos binarios (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP).



La analogía estructural del ppGpp con el GDP llevó a Blumenthal y colaboradores a estudiar la posible interacción de EFTu de E. coli con este nucleótido (83).

A pesar de la importancia de este compuesto y su análogo el guanosín pentafofato (pppGpp) en la regulación de la síntesis de RNA en sistemas bacterianos, en general no ha sido posible detectarlo en sistemas superiores. Sólo Klein (119) ha encontrado que en determinadas etapas de la diferenciación del hongo mucoso Dictyostellium discoideum se sintetiza ppGpp, pero es el único caso de células eucarióticas en que se ha podido detectar.

Sin embargo, por su estructura semejante al GDP, hemos probado su interacción con el factor de elongación I de trigo y hemos visto que es capaz de unirse a EF1 y competir eficientemente con el GTP (120).

La Figura 13 muestra la inhibición de la unión de  $^3\text{H}$ -GTP a EF1 por el ppGpp. La presencia de dos pendientes en la curva podría indicar que existen dos formas de EF1 en que la afinidad del ppGpp es diferente para cada una; en este caso se tendría una mayor afinidad del nucleótido por la forma que existe a baja concentración de nucleótido ya que la pendiente es mayor. Si suponemos que en estas concentraciones bajas de nucleótido la mayor parte de EF1 está como su forma de mayor peso molecular ( $\text{EF1}_H$ ) y que al aumentar la concentración de nucleótidos

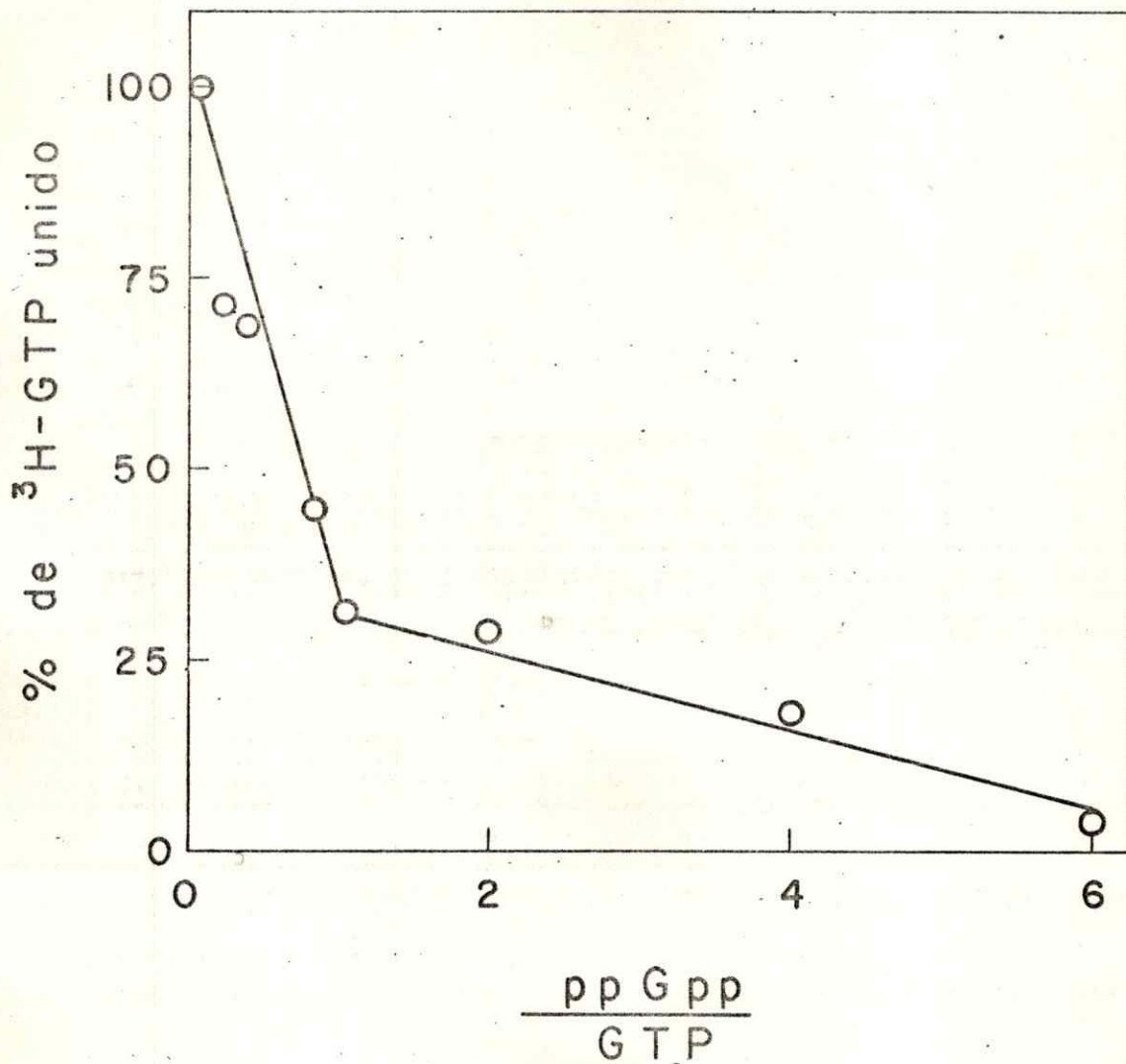


Figura 13



Figura 13. Competencia entre ppGpp y GTP por unirse a EF1

Se incuban 90 ug de EF1 de trigo parcialmente purificado y  $^3\text{H}$ -GTP en concentración de 2,5 uM, durante 5 minutos a  $0^\circ$  en las condiciones salinas habituales. El valor de 100 % (cuando no se agrega ppGpp) corresponde a 18 pmoles de  $^3\text{H}$ -GTP retenidos por EF1. No se efectuó estudio estadístico para trazar la curva.

La unión de  $^3\text{H}$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol) a EF1 fue hecha por el ensayo en filtros de nitrocelulosa en presencia de concentraciones crecientes de ppGpp.

El ppGpp (donación del Dr. M. Cashel) se disolvió en Tris-HCl 2,5 mM pH 7,5 y EDTA 0,1 mM en una concentración de 10 mM y se guardó congelado a  $-20^\circ$ . En estas condiciones no sufre degradación.

sobre  $7,5 \times 10^{-6}$  M, éstas se disocian, podríamos concluir que el ppGpp tiene una mayor afinidad por la forma H que por la forma L. La concentración de nucleótido de  $7,5 \times 10^{-6}$  M es la que se tiene cuando la razón ppGpp/GTP es 2. De hecho como se verá más adelante (Tabla X), a esta concentración de  $7,5 \times 10^{-6}$  M sólo queda aproximadamente un 25 % de la forma pesada de EF1.

##### 5. Inhibición de la unión de GDP a EF1 por ppGpp

Ya que GDP se une con mayor afinidad a EF1 que GTP, se midió la competencia en la unión de GDP a EF1 por el análogo ppGpp. Para ello se empleó  $^3\text{H}$ -GDP de  $ae$  1370 mCi/mmol y en una concentración final de  $2,9 \times 10^{-6}$  M. La Figura 14 muestra que al medir la unión de  $^3\text{H}$ -GDP a EF1 en presencia de ppGpp, se tiene casi un 50 % de inhibición cuando la concentración de ppGpp es prácticamente igual que la de GDP lo que indica que la afinidad de ambos nucleótidos por EF1 es muy semejante.

La adición de la misma cantidad de ppGpp hidrolizado (por tratamiento con KOH 0,3 N durante 18 horas a  $37^\circ$ ) no produjo inhibición de la unión de GDP a EF1.

Como la afinidad de GDP por EF1 es 4 veces mayor que la de GTP, y GDP compite con ppGpp con igual afinidad, se puede suponer que ppGpp deberá unirse a EF1 con una afinidad 4 veces mayor que GTP.



En la Figura 13 se puede observar que efectivamente la afinidad de ppGpp por EF1 es mayor que la de GTP en aproximadamente 4 veces. Es decir, a una razón ppGpp/GTP de 1 la inhibición es de aproximadamente un 70 %, bastante mayor que lo que se tendría si las afinidades fueran iguales; en este caso la inhibición sería de un 50 %.

La inhibición teórica en caso que la afinidad de ppGpp por EF1 fuera 4 veces mayor que por GTP sería de un 80 %.

#### 6. Interacción del dinucleótido pppGpC y análogos de éste con EF1

Los resultados descritos en la sección anterior demuestran que una sustitución en la posición 3' de la ribosa del GDP no influye en la interacción de EF1 con el nucleótido. Este hecho y la presencia de la estructura 7 me GpppGp.... en el extremo 5' de varios RNA (121,122) nos indujo a estudiar la posible interacción de EF1 con compuestos análogos a la estructura terminal 5' de los RNA. De hecho, el grupo de Blumenthal (83) encontró que una de las subunidades de la replicasa del fago Q $\beta$  (fago que contiene RNA como material genético) es el factor de elongación de E. coli EFTu. Además recientemente, Zimmern (123) demostró que el nucleótido del extremo terminal 5' del RNA del virus TYMV es GTP.

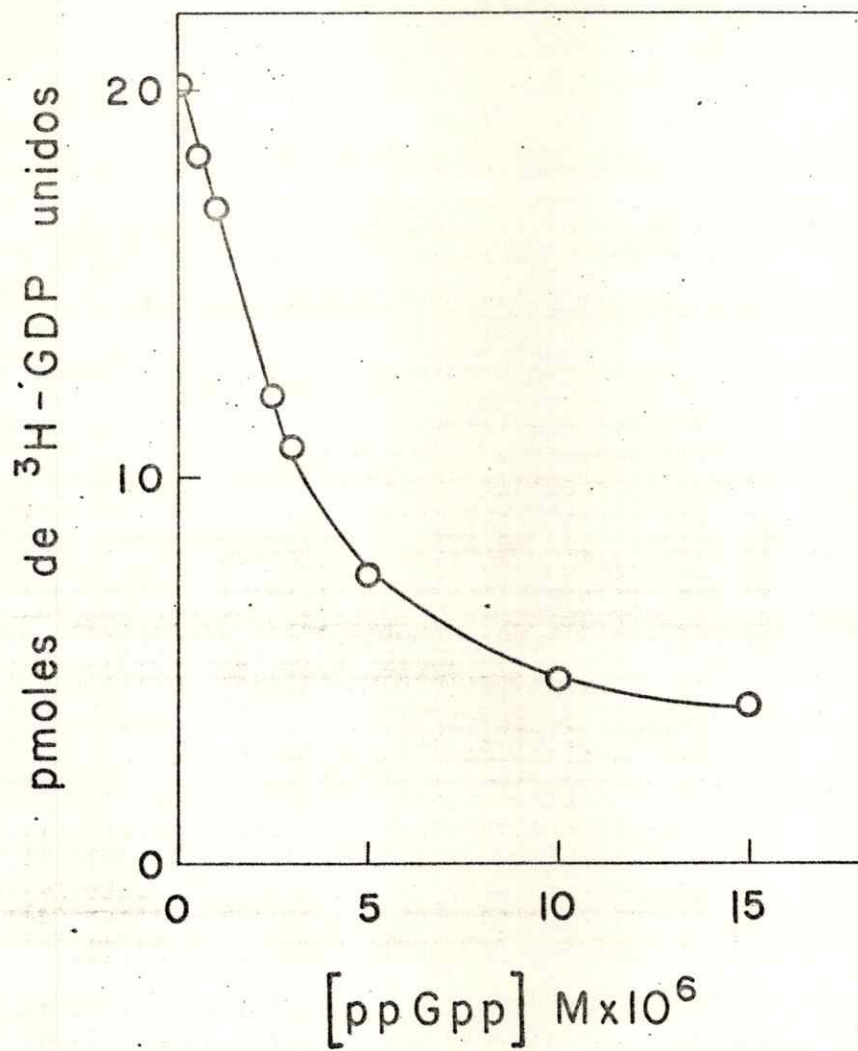


Figura 14



Figura 14. Competencia de GDP y ppGpp por unirse a EF1

La unión de  $^3\text{H-GDP}$  (ae 1370 mCi/mmol) a EF1 se mide por la cantidad del nucleótido retenido en filtros de nitrocelulosa después de incubar aproximadamente 100 ug de EF1 con  $^3\text{H-GDP}$  ( $2,5 \times 10^{-6}$  M) y distintas concentraciones de ppGpp durante 5 minutos a  $0^\circ$  en las condiciones habituales usadas para la determinación del complejo binario.

La reacción, en un volumen de 0,2 ml, se detiene por dilución de 15 veces con Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM, se filtra en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en un sistema de centelleo.

Como análogo del extremo terminal 5' de los RNA se empleó el dinucleótido pppGpC. La síntesis de este compuesto y de sus análogos ppGpC, pGpC y pppGp, fue efectuada por Simoncsits y Tomasz, en Hungría, mediante el uso de la enzima ribonucleasa  $T_1$  en condiciones en que la enzima actúa en la reacción inversa a la hidrólisis del RNA (124).

En la Tabla IX se analiza la interacción de estos dinucleótidos con el factor de elongación EF1 de trigo. Se puede observar que tanto el pppGpC como el pppGp son capaces de inhibir la unión de GTP a EF1. Lo mismo ocurre con el dinucleótido difosfato ppGpC; no así con el dinucleótido monofosfato pGpC o el GpC. Es decir, aquellos compuestos que tienen 2 ó 3 fosfatos en el carbono 5' de la ribosa de la guanosina interactúan con EF1 sin importar qué sustituyente haya en el carbono 3' de la ribosa.

#### 7. Efecto de GTP y nucleótidos análogos sobre la estructura del factor de elongación I

Como se vio en la sección anterior, la centrifugación del factor EF1 en gradientes de concentración de sacarosa permite observar la existencia de dos formas del factor de elongación capaces de unirse a GTP. Lo mismo se logra al someter EF1 a una filtración en columnas de Sephadex G-200.

TABLA IX

Efecto de dinucleótidos análogos al GTP en la unión de  $^3\text{H-GTP}$  a EF1

Exp.	Adición	$^3\text{H-GTP}$ retenidos (pmoles)	Inhibición (%)
1	-	15,85	0
	GTP	0	100
	pppGpC	0,81	95
	pppGp	1,55	90
	pGpC	16,50	0
2	-	18,03	0
	ppGpC (12,5 $\mu\text{M}$ )	6,05	66
	ppGpC	1,20	93
	GpC	17,50	3

Se incuban 80  $\mu\text{g}$  de EF1 con  $^3\text{H-GTP}$  (ae 1000 mCi/mmol),  $2,5 \times 10^{-6}$  M en presencia de los distintos dinucleótidos en concentración de 125  $\mu\text{M}$  (excepto donde se indica otra concentración). La incubación se efectúa durante 5 minutos a  $0^\circ$ , se detiene por dilución de 15 veces del volumen de reacción, se filtra y se cuenta en un sistema de centelleo.



Estudios de la separación de EFl en sus dos formas, después de incubar el factor con nucleótidos como GTP y GDP, dieron como resultado la desaparición de la forma pesada de EFl como se observa al centrifugar EFl en gradiente de concentración de sacarosa en presencia de los nucleótidos (Figura 15). La concentración de nucleótido empleada en la preincubación del factor fue de  $5 \times 10^{-4}$  M y se centrifugó en un gradiente de sacarosa que contenía una concentración de nucleótido de  $5 \times 10^{-5}$  M además del medio salino habitual. Mediante este método se probó el efecto de GTP, GDP, GMP, ATP y el nucleótido tetrafosfato ppGpp (guanosín-5'-difosfato 3' (o 2')-difosfato). Como se observa en la Figura 15, el efecto de desaparición de la forma pesada es bastante específico ya que no ocurre en presencia de GMP o ATP. La preincubación con ppGpp también produjo el mismo efecto como se puede observar en la Figura 16. Este hecho ratifica la idea de que EFl interactúa básicamente con guanosinas que tengan un radical pirofosfato o trifosfato unido a la posición 5' de la ribosa.

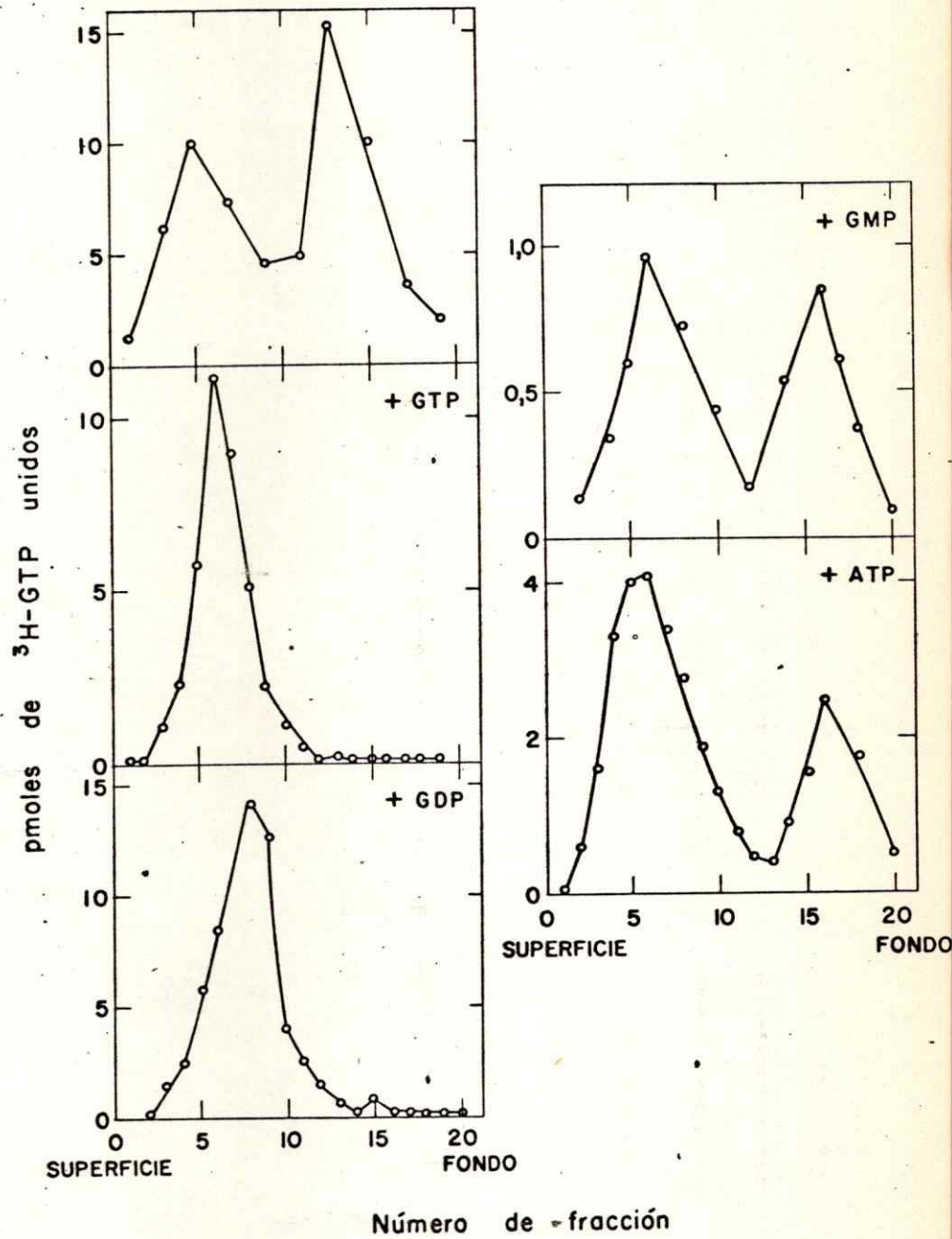


Figura 15

Figura 15. Efecto de nucleótidos análogos del GTP sobre la estructura de EF1

Se centrifugan 60 ug de EF1 en gradientes de concentración de sacarosa (5 - 20 % p/p) durante 18 horas a 37.000 rpm en un rotor SW 39 (ver Métodos) después de haber sido incubados durante 10 minutos a 0° en presencia del nucleótido correspondiente. Se recogen fracciones de 6 gotas cada una y se analiza la capacidad de retener <sup>3</sup>H-GTP en filtros de nitrocelulosa por incubación de 0,1 ml de cada fracción con <sup>3</sup>H-GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M durante 5 minutos a 0°. En los casos en que la gradiente contenía GTP o GDP se consideró la dilución causada por el nucleótido frío.

El control empleado para medir el efecto de GMP y ATP es distinto que el usado al medir el efecto de GTP y GDP. En los casos en que se midió el efecto de GMP y ATP no hubo disociación respecto a los controles.

La reacción se detiene por dilución de 15 veces del volumen de reacción con una solución salina, se filtra en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en un sistema de centelleo.



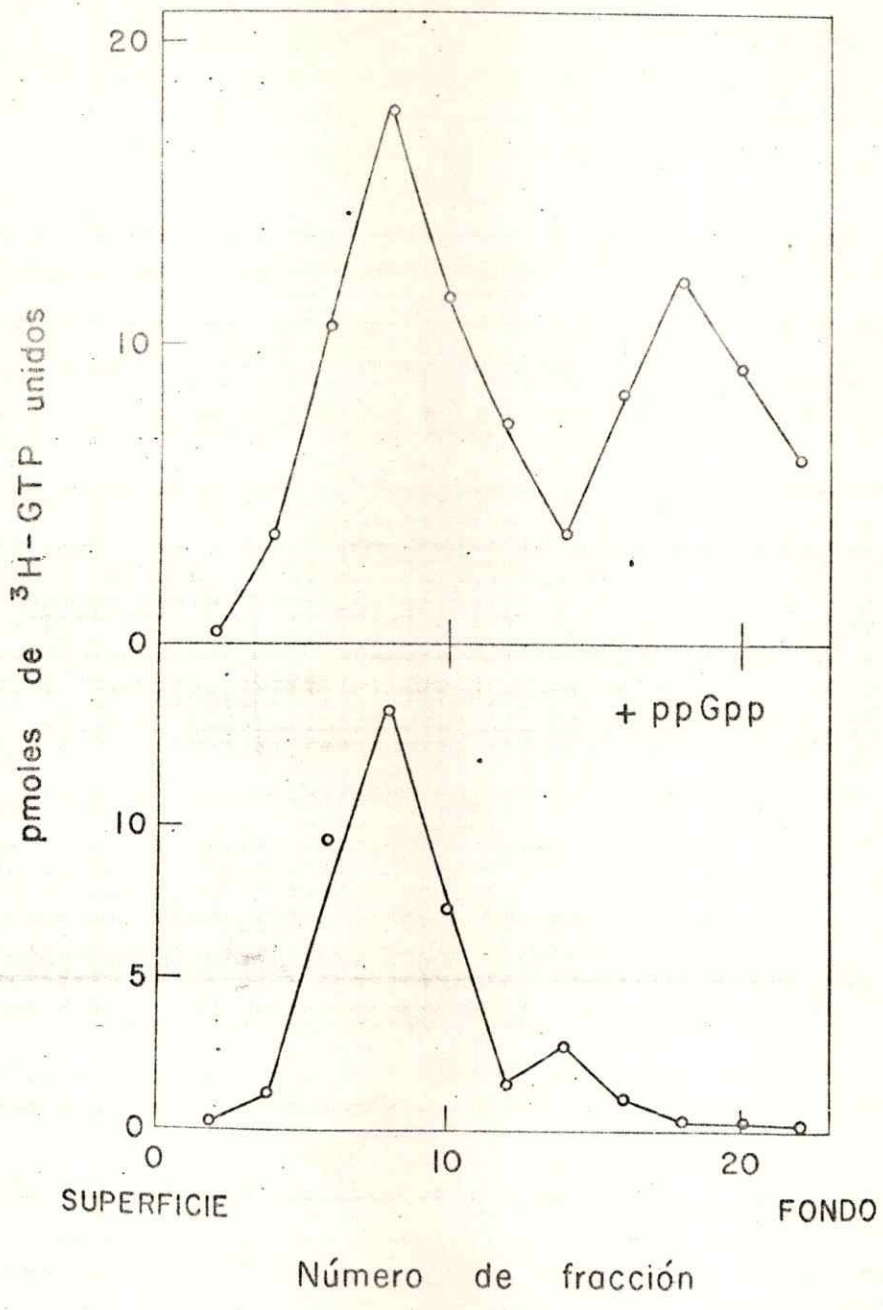


Figura 16

Figura 16. Disociación de EF1 en presencia de ppGpp: análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa.

Se preincuban 60 ug de EF1 con ppGpp ( $5 \times 10^{-4}$  M) durante 10 minutos a  $0^{\circ}$  y el volumen de reacción se centrifuga durante 18 horas a 37.000 rpm en un rotor SW-39 en una gradiente de concentración de sacarosa (5 - 20 % p/p) (ver Métodos) que contiene ppGpp a lo largo de toda la gradiente en una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M. Se recogen fracciones de 6 gotas y se analiza la presencia de EF1 por la actividad de retener  $^3\text{H}$ -GTP en filtros de nitrocelulosa, incubando 0,1 ml de cada fracción con  $^3\text{H}$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M durante 5 minutos a  $0^{\circ}$ . La reacción se detiene por dilución de 15 veces del volumen de reacción con una solución salina, se filtra en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en un sistema de centelleo.

El cálculo de los pmoles de GTP retenidos considera la dilución causada por el ppGpp que, como se vio, interactúa también con EF1.

## 8. Transformación de la especie EF1 pesada en liviana

Se aisló la especie EF1 pesada libre de la liviana mediante un gradiente de concentración de sacarosa (5 - 20 % p/p) preparativa (de 25 ml, empleando un rotor SW-25). La recentrifugación de esta forma en las mismas condiciones demostró que estaba libre de la especie liviana (Figura 17 A); la incubación y centrifugación de esta fracción en presencia de GTP en concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M provocó una disociación de la forma pesada en liviana, como se observa en la Figura 17 B. Esto demuestra que la desaparición de la forma pesada no se debe a una inactivación por GTP sino que a una transformación en la forma liviana. Sin embargo, como se observa en la Figura 17, esta conversión no es total como ocurre al preincubar una fracción que contiene  $EF1_L$  y  $EF1_H$  juntos con GTP, lo que podría deberse a la necesidad de que esté presente el factor más liviano o de que algún factor de bajo peso molecular estimule esta conversión.

## 9. Efecto de la concentración de GTP en la disociación de la forma pesada de EF1

Se efectuaron centrifugaciones de EF1 en gradientes de concentración de sacarosa con distintas concentraciones de GTP y se midió la cantidad relativa de EF1 pesado que se disocia.



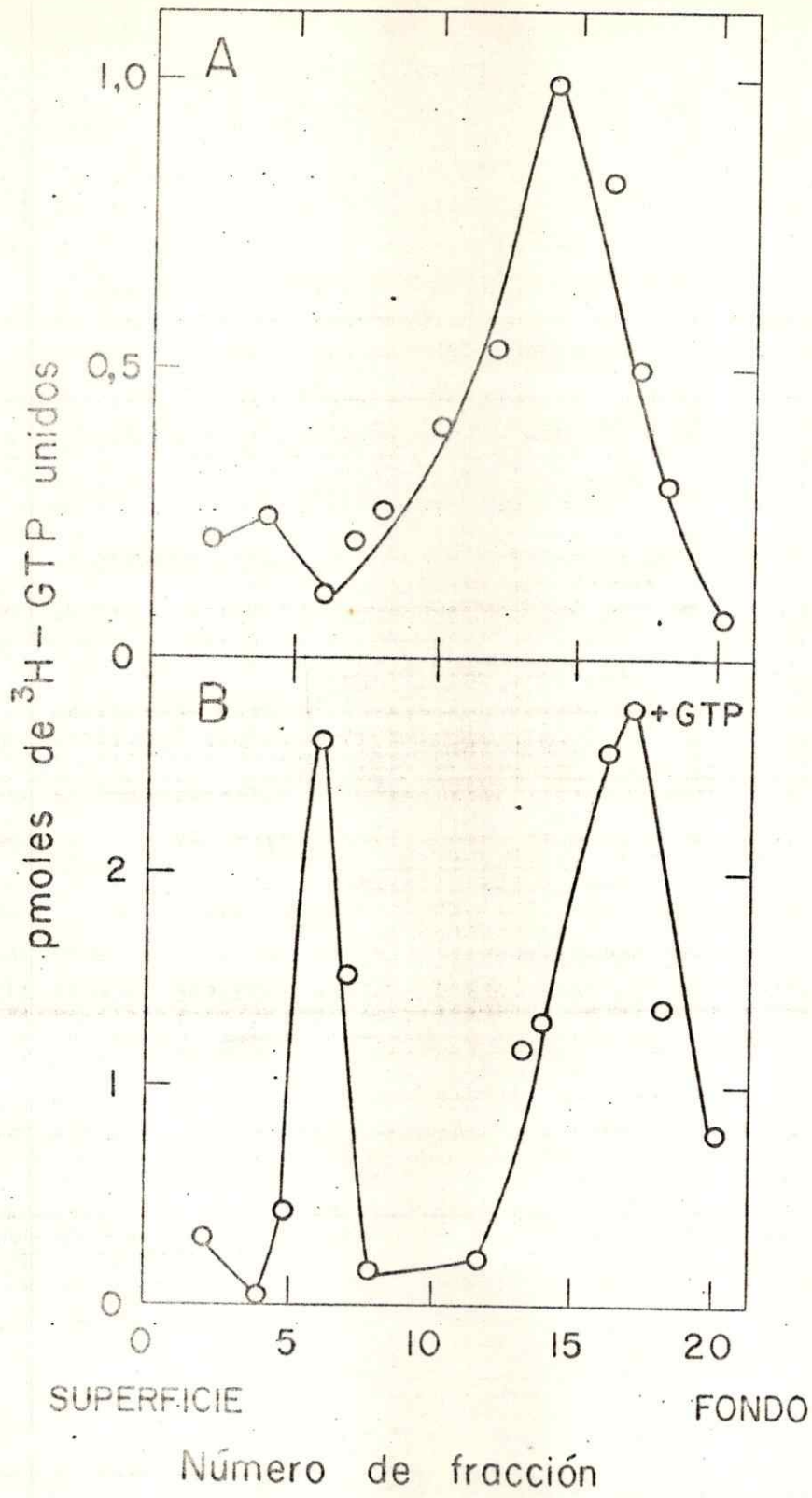


Figura 17

Figura 17. Disociación por GTP de EF1<sub>H</sub> aislado

EF1<sub>H</sub> se aísla mediante un gradiente preparativo de concentración de sacarosa (5 - 20 % p/p) que se centrifuga en un rotor SW-25 durante 24 horas a 24.000 rpm. Las fracciones que contienen actividad de EF1<sub>H</sub> se juntan y se precipitan entre 0 y 80 % de saturación con sulfato de amonio. 100 ug de esta fracción se centrifugaron nuevamente en un gradiente entre 5 y 20 % de concentración de sacarosa durante 18 horas a 37.000 rpm en un rotor SW-39 en ausencia de GTP (Figura 17 A) y en presencia de  $5 \times 10^{-5}$  M de GTP (Figura 17 B); en este caso EF1<sub>H</sub> se preincuba durante 10 minutos a 0° con GTP  $5 \times 10^{-4}$  M.

Se recogen fracciones de 6 gotas cada una y se analiza la actividad de EF1 por su capacidad para retener <sup>3</sup>H-GTP incubando 0,1 ml de cada fracción con <sup>3</sup>H-GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M durante 5 minutos a 0°.

La Tabla X muestra la cantidad de  $EF1_H$  remanente al preincubar  $EF1$  con concentraciones crecientes de GTP considerando un 100 % la suma de  $EF1_L + EF1_H$  existente en cada caso. La forma pesada se disocia en un 80 % sólo con concentraciones de GTP mayores que  $1 \times 10^{-5}$  M aún cuando la concentración de GTP necesaria para unirse al factor es de  $2,5 \times 10^{-6}$  M (Figura 9). Es decir, se requiere una menor concentración de GTP para unirse a  $EF1$  que para disociar  $EF1$ . Este hecho se comprobó preincubando  $EF1$  con  $^3H$ -GTP en una concentración de  $2,5 \times 10^{-6}$  M y centrifugándolo en una gradiente de sacarosa que contenía  $^3H$ -GTP en la misma concentración a lo largo de toda la gradiente. Las fracciones de la gradiente se filtraron directamente en filtros de nitrocelulosa. En la Figura 18 se observa que a esta concentración de GTP aparecen las dos formas de  $EF1$ ; es decir que la unión de GTP por sí sola no es capaz de disociar el factor de elongación ya que hay moléculas de  $EF1_H$  que sedimentan como tales y sin embargo tienen GTP unido a ellas.



TABLA X

Efecto de la concentración de GTP en la disociación de EF1

(GTP) x 10 <sup>5</sup> M	EF1 <sub>H</sub> remanente (%)
0	52
0,05	53
0,25	45
1,0	23
5,0	0

El factor EF1 (50 ug) se incubó con concentraciones crecientes de GTP y se analiza su disociación por centrifugación en gradientes de concentración de sacarosa, entre 5 y 20 % (p/p) en las condiciones descritas en Métodos.

La cantidad de EF1<sub>H</sub> presente después de la centrifugación en el gradiente de concentración de sacarosa se mide como porcentaje del total de actividad de unión a GTP (100 % corresponde a la cantidad de GTP unida por EF1<sub>L</sub> + EF1<sub>H</sub> en presencia de las distintas concentraciones de GTP). La actividad de las dos especies de EF1 se mide por la capacidad de las fracciones de la gradiente de sacarosa para retener <sup>3</sup>H-GTP en filtros de nitrocelulosa.

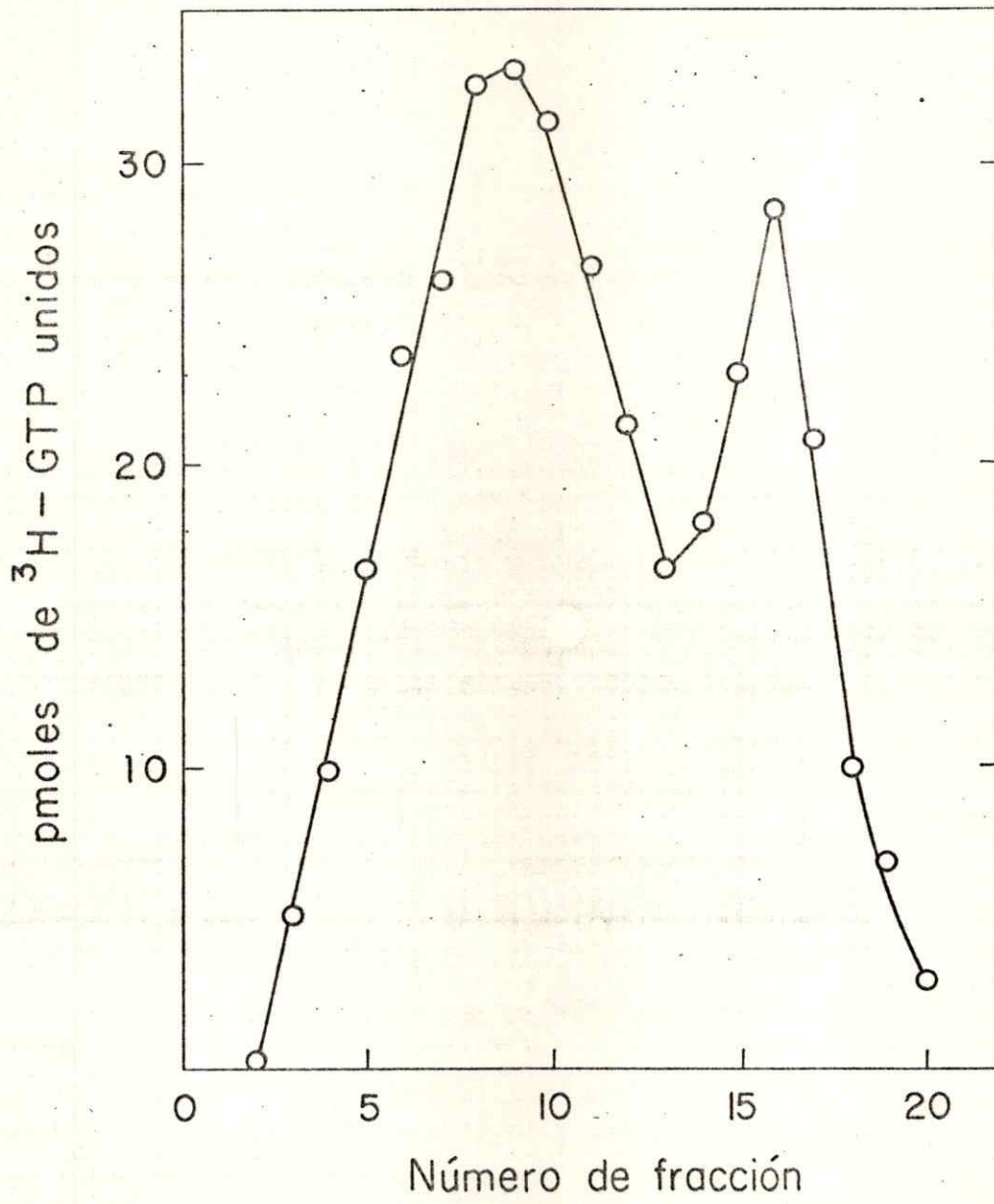


Figura 18

Figura 18. Existencia de las dos formas de EF1 en concentraciones bajas de GTP

Se incuban 100 ug de EF1 con  $^3\text{H}$ -GTP a una concentración de  $2,5 \times 10^{-6}$  M durante 10 minutos a  $0^\circ$  y se centrifugan en una gradiente de concentración de sacarosa (5 - 20 % p/p en solución salina) durante 18 horas a 37.000 rpm en un rotor SW-39 que tiene la misma concentración de  $^3\text{H}$ -GTP a lo largo del tubo. Se recogen fracciones de 6 gotas, se diluyen con 3 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y se filtran directamente en filtros de nitrocelulosa.



## CAPITULO III

### INTERACCION DE EF1 CON AMINOACIL-tRNA EN PRESENCIA DE GTP

#### 1. Aislamiento y cuantificación del complejo ternario

1a) Cuantificación del complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA). La interacción del factor de elongación I con aminoacil-tRNA requiere la unión previa del factor proteico a GTP formando el complejo binario (EF1 : GTP). Sin embargo, el complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA), a diferencia del binario, no es retenido en filtros de nitrocelulosa por lo que su cuantificación se puede realizar midiendo la disminución de radiactividad de  $^3\text{H}$ -GTP proveniente del complejo binario retenido en el filtro (Figura 19). Como se observa en la Figura, la unión de GTP y de fenilalanil-tRNA al factor EF1 es estequiométrica ya que una molécula de  $^{14}\text{C}$ -fen-tRNA titula a una molécula del complejo (EF1 :  $^3\text{H}$ -GTP). El  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA solo o con EF1 no es retenido en el filtro. Se emplea aa-tRNA radiactivo para cuantificar la cantidad agregada. Como el  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA libre y el complejo (EF1 :  $^3\text{H}$ -GTP :  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA) no son retenidos en el filtro de nitrocelulosa, no es necesario contar la doble marca; sólo se mide el  $^3\text{H}$ -GTP que forma parte del complejo binario. Al emplear tRNA proveniente de fenilalanil-tRNA no se forma complejo ternario lo que corrobora datos de Ravel (62)

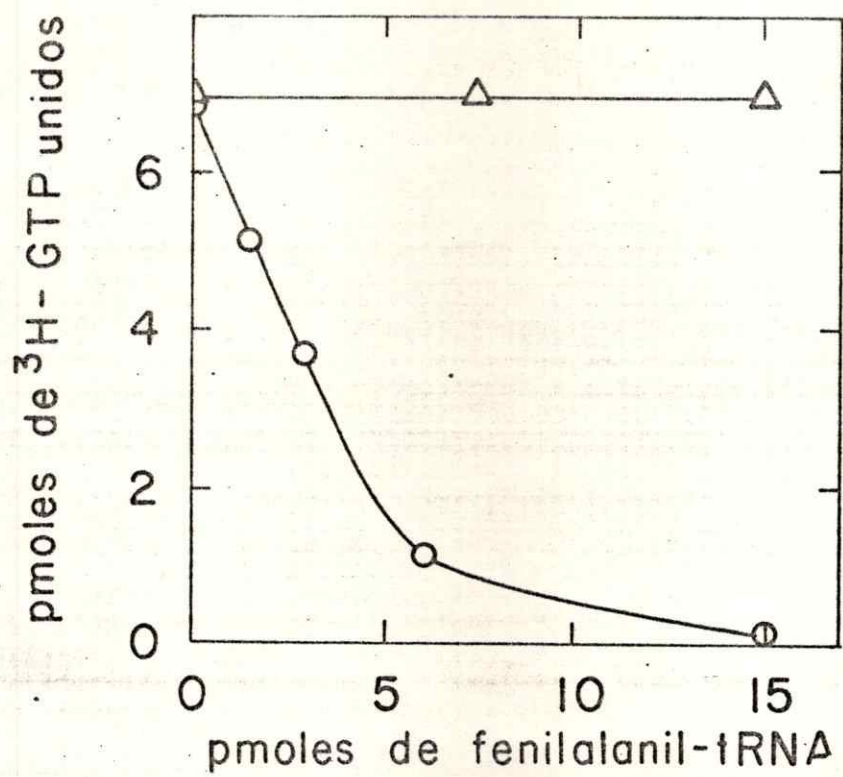


Figura 19

Figura 19. Cuantificación del complejo (EF1 : GTP : fenilalanil-tRNA) en filtro de nitrocelulosa.

La formación del complejo ternario se efectúa por incubación de  $^3\text{H}$ -GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M,  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol) y aproximadamente 80 ug de EF1 durante 5 minutos a  $0^\circ$ . La reacción se detiene por dilución de 15 veces del volumen de reacción con solución Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM, se filtra rápidamente en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en un sistema de centelleo.

□ ————— □ con  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA  
△ ————— △ con tRNA desacilado



y Górdon (67) en E. coli y de Jerez y colaboradores (75) en trigo.

1b) Aislamiento del complejo (EF1 : GTP : aa-tRNA) por columnas

de filtración molecular. El complejo (EF1 : GTP :  $^3\text{H}$ -fenilalanil-tRNA) se aisló por filtración en columnas de Sephadex G-200 ya que la unión del tRNA al factor de elongación produce un complejo con un peso molecular aproximado de 95.000 lo que permite que eluya antes que el aminoacil-tRNA libre (peso molecular 25.000). La Figura 20 muestra que al incubar EF1 con GTP y  $^3\text{H}$ -fenilalanil-tRNA y aislar el complejo ternario, éste eluye antes que el fenilalanil-tRNA libre cuyo volumen de elución está indicado por la flecha (gráfico inferior). Cuando el aminoacil-tRNA, en cambio, se incuba con EF1 en ausencia de GTP no se forma el complejo ternario y el  $^3\text{H}$ -fenilalanil-tRNA eluye en la misma posición que el tRNA libre (parte superior de la Figura 20).

2. Actividad de las dos formas de EF1 en la formación del complejo ternario

Las formas liviana y pesada del factor de elongación difieren enormemente en su reactividad frente al aminoacil-tRNA y GTP para formar el complejo ternario. En la Figura 21 se puede observar que  $\text{EF1}_L$  tiene una mayor capacidad que  $\text{EF1}_H$  para interactuar con fenilalanil-tRNA en presencia de GTP.  $\text{EF1}_L$  une GTP y aminoacil-tRNA en forma estequiométrica;

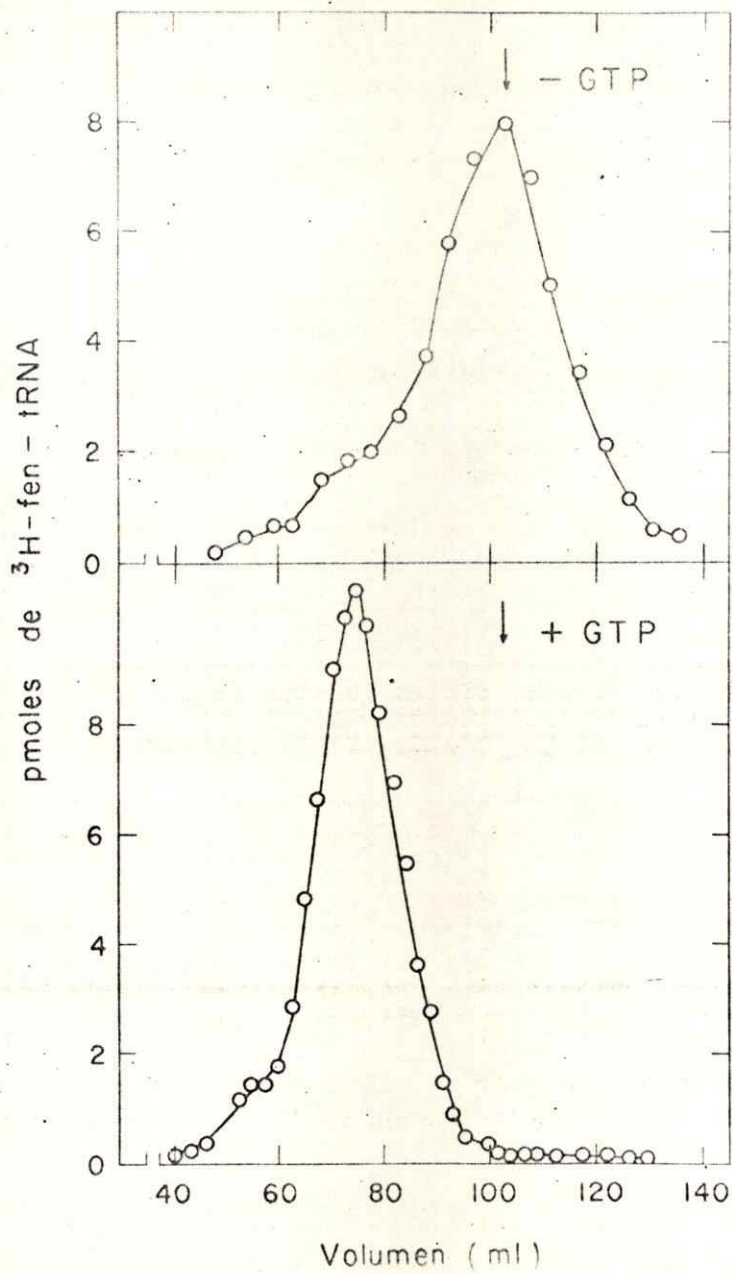


Figura 20

Figura 20. Aislamiento del complejo ternario (EFl : GTP : fenilalanil-tRNA) en columnas de Sephadex G-200

El factor de elongación se incuba con  $^3\text{H}$ -fenilalanil-tRNA y GTP y se aísla en Sephadex G-200 como se describe en Métodos. Cuando se incubaba con GTP, se agrega además el nucleótido en la solución de elución de la columna en concentración de  $7,5 \times 10^{-5}$  M.

Se recogen fracciones de 1 ml con un flujo de 36 ml/hora.

El complejo ternario y el fenilalanil-tRNA libre se miden por precipitación con TCA frío al 5 %, se filtra en filtros de fibra de vidrio y se cuenta la radiactividad proveniente del  $^3\text{H}$ -fenilalanil-tRNA.

La flecha indica el volumen de elución del tRNA libre.



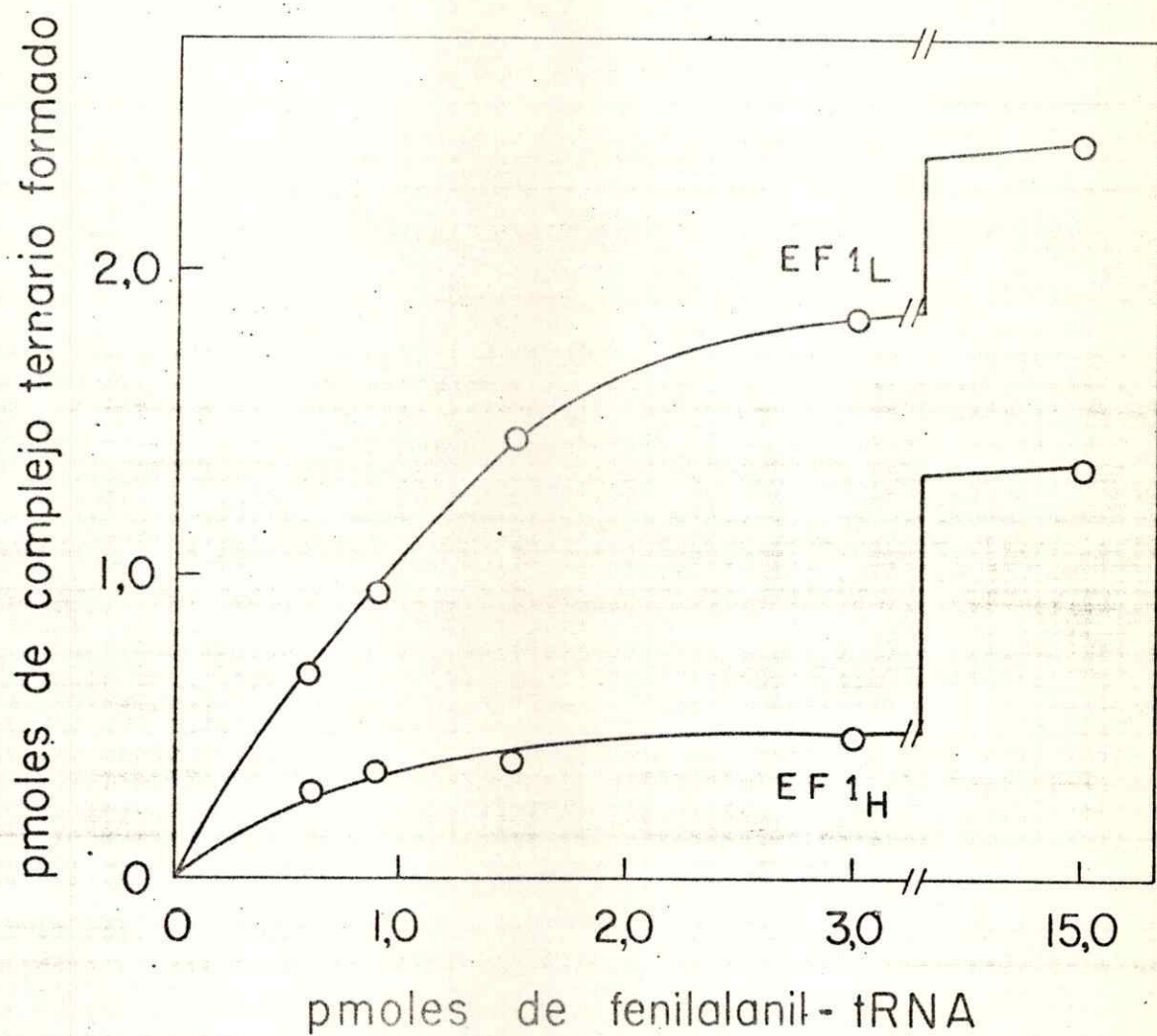


Figura 21

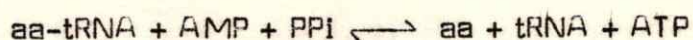
Figura 21. Capacidad de las dos fracciones de EF1 para formar complejo ternario

Las dos formas de EF1 se separan por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa (ver Métodos); las fracciones con actividad de EF1<sub>L</sub> y EF1<sub>H</sub> se precipitan entre 0 y 80 % de saturación con sulfato de amonio. Se analizó una misma cantidad de EF1<sub>L</sub> y EF1<sub>H</sub> (capaz de unir 2,6 pmoles de <sup>3</sup>H-GTP cada una) en su capacidad para formar el complejo ternario, incubándolas con <sup>3</sup>H-GTP (ae 1000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M y <sup>14</sup>C-fen-tRNA; el ensayo se mide por filtración en filtros de nitrocelulosa. La cantidad de complejo ternario se mide por la diferencia de pmoles de <sup>3</sup>H-GTP retenidos en el filtro al no agregar fen-tRNA y al agregar distintas concentraciones del aminoacil-tRNA.

no así  $EF1_H$  cuya afinidad por el aminoacil-tRNA es mucho menor.

### 3. Protección de la desacilación del aminoacil-tRNA al formar parte del complejo ternario

La incubación del aminoacil-tRNA en presencia de la aminoacil-tRNA sintetasa respectiva estimula la desacilación del aa-tRNA según la reacción



Según este esquema, por lo tanto, la desacilación catalizada por estas enzimas debe estimularse por la adición de pirofosfato.

Se midió la desacilación de  $^{14}\text{C}$ -treonil-tRNA por incubación con treonil tRNA sintetasa durante 15 minutos a  $30^\circ$ . La presencia de la sintetasa provoca una desacilación de más de un 40 % del treonil-tRNA; sin embargo, si el treonil-tRNA está formando parte del complejo ternario ( $EF1 : \text{GTP} : \text{treo-tRNA}$ ), no se produce desacilación del aa-tRNA (Tabla XI). Se observa una pequeña desacilación del treonil-tRNA en presencia de  $EF1$ , sin GTP, debido probablemente a contaminación del factor de elongación con algo de treonil tRNA sintetasa.

La adición de  $EF1$  solo o de GTP solo, no protegen la desacilación por la sintetasa.



TABLA XI

Desacilación de treonil-tRNA por acción de treonil-tRNA sintetasa

Exp.	Adición	<sup>14</sup> C-treonil-tRNA remanente (pmoles)	Desacila- ción (%)
1	Ninguna	3,7	0
	EF1	3,3	9,5
	EF1 + GTP	3,9	0
	tre-tRNA sintetasa	2,1	44
	tre-tRNA sintetasa + EF1	2,1	44
	tre-tRNA sintetasa + EF1 + GTP	3,7	0
2	Ninguna	4,4	0
	tre-tRNA sintetasa	2,5	43
	tre-tRNA sintetasa + GTP	2,5	43

La incubación del <sup>14</sup>C-treonil-tRNA se realiza en presencia de Tris-HCl 80 mM pH 7,2, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, AMP 1 mM, PPI 1 mM y en los casos indicados, GTP 0,1 mM, 10 ug de treonil-tRNA sintetasa purificada de hígado de rata, preparada como se describe en Allende y colaboradores (125) y 450 ug de EF1 de trigo parcialmente purificado. En experimento 1 se incuba 15 minutos a 30° y en experimento 2, 30 minutos a 30°.

#### 4. Propiedades de un metionil-tRNA como iniciador de la síntesis proteica.

En sistemas bacterianos la síntesis proteica se inicia por la unión con el ribosoma de un metionil-tRNA que tiene el grupo amino formado (126).

En células eucarióticas se encontraron dos especies citoplasmáticas de metionil-tRNA que reconocen el mismo triplete AUG, y se pensó que una de ellas podría actuar como iniciador de la síntesis proteica.

Para estudiar esta posibilidad se preparó met-tRNA de trigo y se separaron las dos formas del metionil-tRNA en una columna de DEAE-celulosa benzoilada (104). En la Figura 22 se observa el fraccionamiento del metionil-tRNA en sus 2 especies que inicialmente fueron llamadas met-tRNA<sub>1</sub> y met-tRNA<sub>2</sub> y que como se verá más adelante corresponderían al met-tRNA iniciador y met-tRNA<sub>m</sub> respectivamente.

El primer pico de radiactividad que eluye muy temprano en la columna corresponde a <sup>3</sup>H-metionina libre proveniente de la desacilación del <sup>3</sup>H-met-tRNA. El tRNA se eluyó con una gradiente lineal de NaCl entre 0,4 y 1 M y las dos especies de metionil-tRNA eluyeron con concentraciones de NaCl de 0,7 y 0,9 M respectivamente.

Cuando se aminoaciló el tRNA de trigo con metionina y se empleó como fuente de sintetasa una fracción enzimática de E. coli sólo se cargó una de las especies de tRNA de trigo con metionina. Para analizar

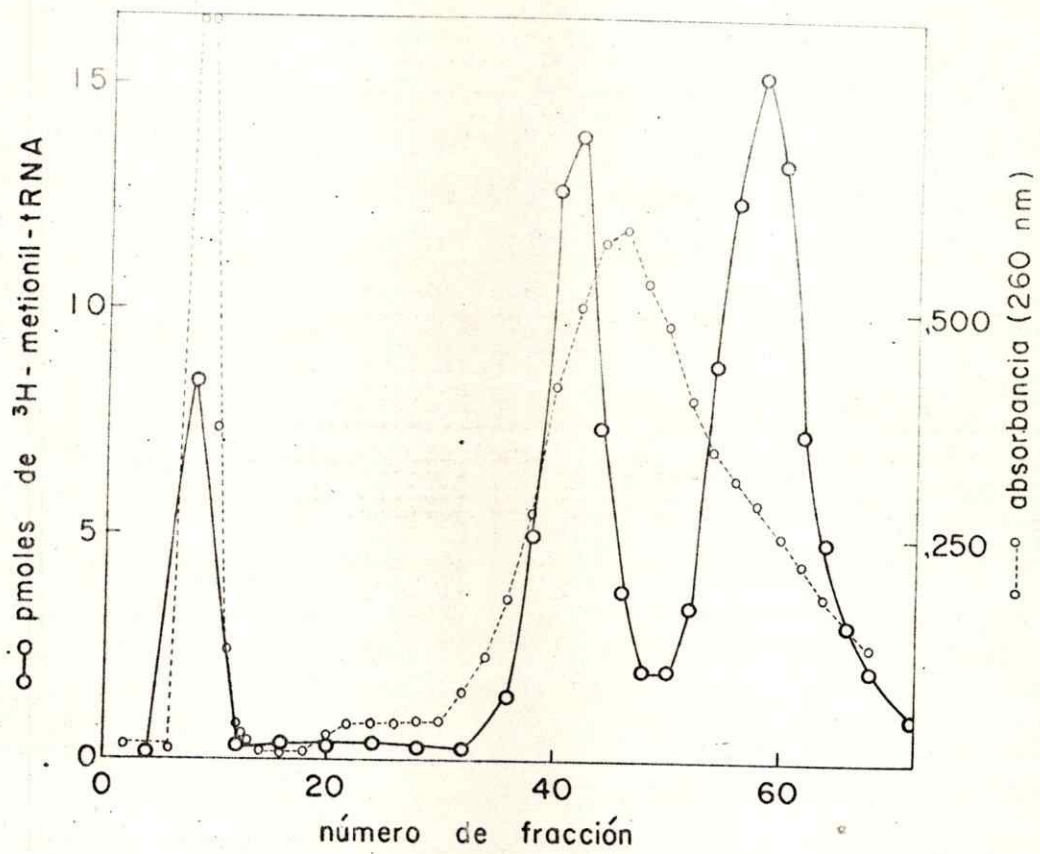


Figura 22



Figura 22. Fraccionamiento de  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA de trigo por cromatografía en columna de DEAE-celulosa benzoilada.

La columna de DEAE-celulosa benzoilada (1,5 x 35 cm) se equilibra con solución de NaCl 0,4 M,  $\text{MgCl}_2$  0,01 M, acetato de potasio 0,01 M pH 5,2 y 2-mercaptoetanol 0,005 M. El  $^3\text{H}$ -met-tRNA aminoacilado como se describe en Métodos se coloca en la columna y se eluye con una gradiente lineal de NaCl entre 0,4 y 1,0 M en la misma solución, (400 ml de cada una). Se recogen fracciones de 10 ml y se analizan alícuotas de 0,1 ml contándolas directamente en 5 ml de solución de Bray (105).

este hecho se cargó tRNA de trigo con  $^{14}\text{C}$ -metionina y con sintetetasas de E. coli y se fraccionó en una columna de DEAE-celulosa benzoilada conjuntamente con un  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA de trigo cargado con sintetetasas de trigo y que, por lo tanto, contiene las dos formas del met-tRNA esterificadas con metionina. En la Figura 23 se observa el fraccionamiento en DEAE-celulosa benzoilada del  $^3\text{H}$ -met-tRNA y  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA cargados con sintetetasas de trigo y de E. coli respectivamente; como se puede ver en la figura, la radiactividad del  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA aparece sólo en el primer pico que corresponde al met-tRNA<sub>1</sub>, lo que indicaría que existe una gran especificidad en las aminoacil-tRNA sintetetasas de E. coli para reconocer los tRNA de trigo.

##### 5. Formilación de las dos especies de metionil-tRNA de trigo

Para estudiar el posible rol iniciador de alguna de las dos formas de metionil-tRNA de trigo se intentó formilarlas enzimáticamente ya que era probable que la especie iniciadora uniera el grupo formilo, como sucede en sistemas bacterianos. Para la reacción de formilación se empleó  $\text{N}^{5,10}$ -metenil- $^{14}\text{C}$ -tetrahidrofolato y una enzima transformilasa presente en un sobrenadante de una centrifugación a  $105.000 \times g$  proveniente de E. coli ya que la fracción citoplasmática de germen de trigo no contiene esta enzima.

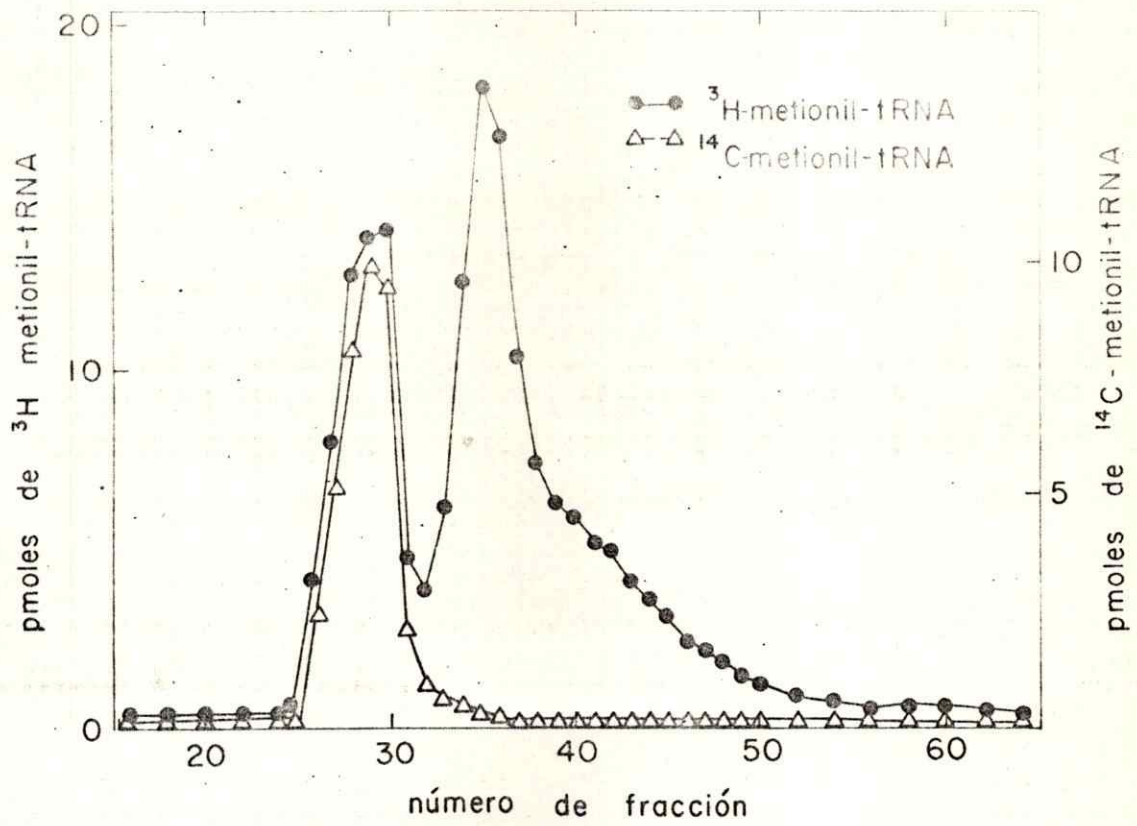


Figura 23



Figura 23. Fraccionamiento de  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA de trigo (aminoacilado con sintetasa de trigo) y  $^{14}\text{C}$ -metionil-tRNA de trigo (aminoacilado con sintetasa de E. coli) en una columna de DEAE-celulosa benzilada.

Los  $^3\text{H}$ -met-tRNA (ae 1000 mCi/mmol) y  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA (ae 100 mCi/mmol) se mezclan y se cargan en una columna de DEAE-celulosa benzilada (1,2 x 20 cm) equilibrada y eluida en las mismas condiciones descritas en la Figura 22. Se recogen fracciones de 5 ml y se analizan alícuotas de 0,1 ml directamente en 5 ml de solución de Bray con el contador calibrado para detectar la doble marca radiactiva.

La formilación se mide por la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -formilo en el grupo amino libre de la metionina a partir de  $\text{N}^{5,10}$ -metenil- $^{14}\text{C}$ -tetrahidrofolato. Como se observa en la Tabla XII, ninguna de las dos especies de met-tRNA de germen de trigo incorporó  $^{14}\text{C}$ -formilo. Sólo el met-tRNA<sub>f</sub> de E. coli y el met-tRNA no fraccionado de E. coli se formilaron.

#### 6. Interacción entre EF1, GTP y metionil-tRNA de trigo

Así como el factor de elongación EFTu de E. coli es incapaz de formar un complejo ternario con el metionil-tRNA<sub>f</sub> (la especie iniciadora que se formila)(63), se postuló que la especie iniciadora de la síntesis proteica en eucariontes tampoco podría formar un complejo estable con EF1 y GTP. Es así como, a pesar de que ninguna de las dos especies de met-tRNA de trigo se puede formilar, se pensó que una de ellas podría actuar como iniciador de la síntesis proteica. Para analizar esta posibilidad, se determinó si había interacción de cada una de las especies de metionil-tRNA de trigo con EF1 y GTP.

Se incubó met-tRNA<sub>1</sub> y met-tRNA<sub>2</sub> (o met-tRNA<sub>i</sub> y met-tRNA<sub>m</sub>) con EF1 y GTP en las condiciones descritas en Métodos y se separaron los posibles complejos ternarios por filtración en Sephadex G-100. En la Figura 24 se observan los perfiles de elución de los distintos experimentos en que se empleó met-tRNA<sub>i</sub> o met-tRNA<sub>m</sub>.

TABLA XII

Formilación de met-tRNA con transformilasa de E. coli

Exp.	tRNA empleado	<sup>14</sup> C-formilo incorporado (cpm)
1	met-tRNA <sub>f</sub> de <u>E. coli</u> (8 pmoles)	320
	met-tRNA <sub>m</sub> de <u>E. coli</u> (9,2 pmoles)	59
	tRNA total desacilado de <u>E. coli</u> (2 UA <sub>260</sub> )	5
2	met-tRNA no fraccionado de <u>E. coli</u> (20 pmoles)	304
	met-tRNA no fraccionado de trigo (23 pmoles)	25
	met-tRNA <sub>i</sub> de trigo (24 pmoles)	32
	met-tRNA <sub>m</sub> de trigo (22 pmoles)	31
	sin tRNA	42

La reacción se efectúa como se describe en Métodos, con una incubación de 30 minutos a 37<sup>o</sup>, se detiene por precipitación con TCA frío al 5 %, se filtra en filtros de nitrocelulosa y se cuenta en su sistema de centelleo.



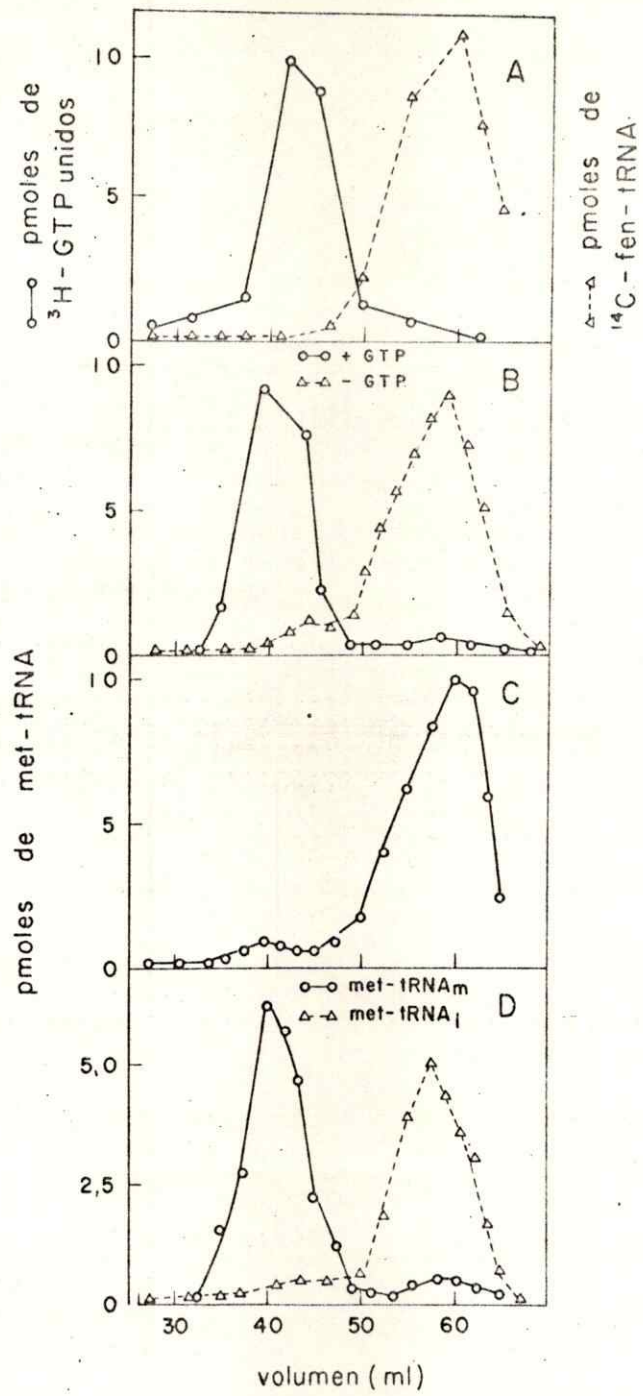


Figura 24

Figura 24. Aislamiento del complejo ternario (EF1 : met-tRNA : GTP) por filtración en gel.

Este complejo se filtra en una columna de Sephadex G-100 (1,45 x 55 cm) equilibrada con cacodilato de sodio 50 mM pH 7,0,  $MgCl_2$  10 mM,  $NH_4Cl$  150 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y GTP 75  $\mu$ M que se lava con esta misma solución salina (Flujo 10,8 ml/hora). El complejo ternario se forma por incubación durante 10 minutos a 0° de 100  $\mu$ g de EF1, 40 a 100 pmoles de met-tRNA, GTP 150  $\mu$ M, cacodilato de sodio 50 mM pH 7,0,  $MgCl_2$  10 mM,  $NH_4Cl$  150 mM, ditiotretitol 1 mM en un volumen total de 1 ml. Se toman alícuotas de 1 ml y se precipitan con TCA al 5%, se filtran en filtros de fibra de vidrio y se cuentan en un sistema de centelleo.

A: volumen de elución de EF1 medido por su capacidad de unión a  $^3H$ -GTP

o-----o y volumen de elución del tRNA libre determinado por filtración de  $^{14}C$ -fen-tRNA,  $\Delta$ ----- $\Delta$

B: incubación de EF1 con  $^3H$ -met-tRNA<sub>m</sub> en presencia (o-----o) o ausencia ( $\Delta$ ----- $\Delta$ ) de GTP, medido por precipitación con TCA al 5%.

C: incubación de EF1 con GTP y met-tRNA<sub>i</sub>

D: incubación de EF1 con GTP, con 50 pmoles de  $^{14}C$ -met-tRNA<sub>i</sub> y con 50 pmoles de  $^3H$ -met-tRNA<sub>m</sub> a la vez. Las alícuotas de 0,1 ml se precipitan con TCA al 5% y se cuenta la doble marca en un sistema de centelleo.



La Figura 24 A es una normalización de la columna; se observa que el factor EF1 medido por su capacidad de unir  $^3\text{H}$ -GTP eluye bastante antes que el tRNA libre, el cual se midió por precipitación de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA con TCA frío al 5 %. La Figura 24 B muestra el complejo formado entre met-tRNA<sub>m</sub>, GTP y EF1. En ausencia de GTP no hay interacción entre EF1 y el met-tRNA<sub>m</sub>. En cambio, el met-tRNA<sub>i</sub> no forma complejo ternario con el factor de elongación y GTP (Figura 24 C) y toda la radiactividad eluye en el volumen correspondiente al tRNA libre. Cuando se incubó met-tRNA<sub>i</sub> marcado con  $^{14}\text{C}$  y met-tRNA<sub>m</sub> marcado con  $^3\text{H}$ , con EF1 en exceso y GTP, y se analizaron en un mismo experimento, se observó claramente que sólo el met-tRNA<sub>m</sub> es capaz de formar el complejo ternario (Figura 24 D).

Estos resultados demuestran que no hay formación de un complejo estable (EF1 : GTP : met-tRNA<sub>i</sub>) por lo que es probable que, por analogía con lo que ocurre con E. coli, el met-tRNA<sub>i</sub> tenga propiedades de iniciador de la síntesis de proteínas (127). En E. coli el met-tRNA<sub>f</sub> no interactúa con los factores de elongación pero sí lo hace con los factores de iniciación de la síntesis proteica (128).

Sin embargo, un estudio hecho por Richter y Lipmann (129) sobre la formación del complejo ternario con EF1 de levadura, GTP y los met-tRNA de levadura en que midieron la formación de los complejos por



filtración en columnas de Sephadex G-50 demostró que ambas formas de met-tRNA son capaces de interactuar con EF1. Este hecho nos llevó a estudiar la estabilidad de los complejos (EF1 : GTP : met-tRNA<sub>i</sub>) y (EF1 : GTP : met-tRNA<sub>m</sub>) de trigo pues era probable que el complejo con met-tRNA<sub>i</sub> se formara pero no fuera posible aislarlo por su baja estabilidad ya que la filtración en columnas de Sephadex G-100 demora alrededor de 5 horas.

Para estudiar la formación de ambos complejos se empleó el método de cuantificación del complejo ternario en filtros de nitrocelulosa, que por ser un método rápido de análisis, permite detectar los complejos de baja estabilidad. Con este tipo de ensayo se observó que ambas especies de met-tRNA forman el complejo ternario con EF1 y GTP lo que parecería indicar que difieren en estabilidad y que en columnas de Sephadex G-100 el complejo con el met-tRNA iniciador se degradaría y no es posible aislarlo (130).

En la Figura 25 se observa la formación de ambos complejos detectados en filtros de nitrocelulosa. Como se puede ver, las pendientes son: 1,0 para el met-tRNA<sub>m</sub> y 0,59 para el met-tRNA<sub>i</sub>, lo que indica que los complejos difieren en estabilidad o posiblemente podrían tener distinta afinidad por el factor EF1 ya que la unión del met-tRNA<sub>i</sub> y de GTP al factor no es estequiométrica.

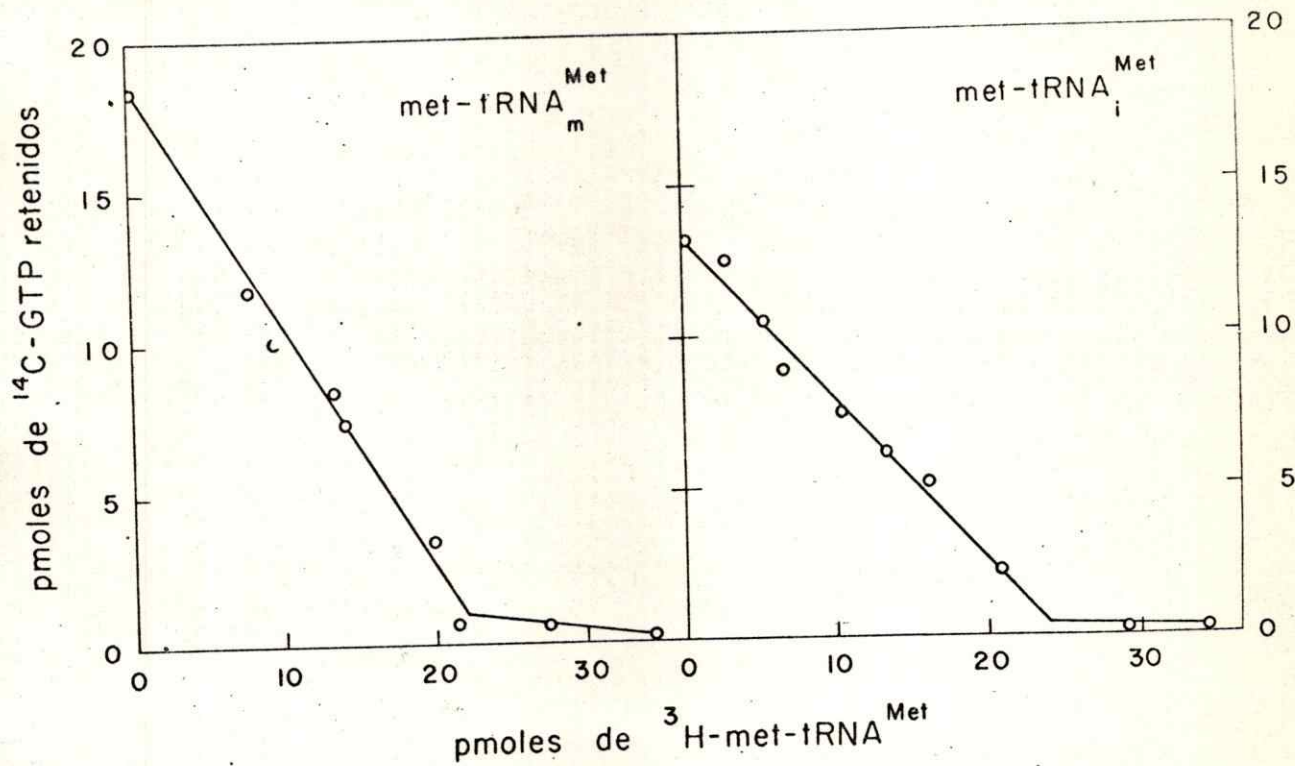


Figura 25

Figura 25. Interacción de las dos especies de met-tRNA<sup>met</sup> con EF1 y GTP medido por retención en filtros de nitrocelulosa.

Se forma el complejo binario por preincubación en 0,2 ml de 20 ug de EF1 y <sup>14</sup>C-GTP (ae 374 mCi/mmol) 3 uM, en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 50 mM durante 5 minutos a 0°, después de lo cual se agrega <sup>3</sup>H-met-tRNA<sub>m</sub> o <sup>3</sup>H-met-tRNA<sub>i</sub> (ae 3470 mCi/mmol) y se incuba 5 minutos a 0°. La reacción se detiene en la forma habitual y la radiactividad de <sup>14</sup>C-GTP retenido se cuenta en un sistema de centelleo.



7. Especificidad de EFl de trigo para interactuar con met-tRNA heterólogos

Se estudió la especificidad de EFl de trigo para interactuar con otros met-tRNA analizando la capacidad de formar complejo ternario con las dos especies de met-tRNA de E. coli en presencia de GTP. Para ello se incubó EFl de trigo con GTP y  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>m</sub> de E. coli o con  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>f</sub> de E. coli, este último sin formilar y se analizó la formación de complejo ternario por filtración en Sephadex G-100. En la Figura 26 se observa que EFl puede formar complejo ternario con ambos met-tRNA de E. coli lo que indicaría que la proteína EFl de eucariontes no es capaz de distinguir las diferencias estructurales de los tRNA heterólogos.

8. Especificidad de EFTu de E. coli para interactuar con met-tRNA homólogos y heterólogos

Así como el factor EFl de células eucarióticas no tiene capacidad para distinguir entre dos especies de met-tRNA de E. coli, el factor de elongación EFTu de E. coli puede distinguir entre las dos formas de met-tRNA de eucariontes y por ello, sólo forma complejo ternario con el met-tRNA<sub>m</sub> de trigo.

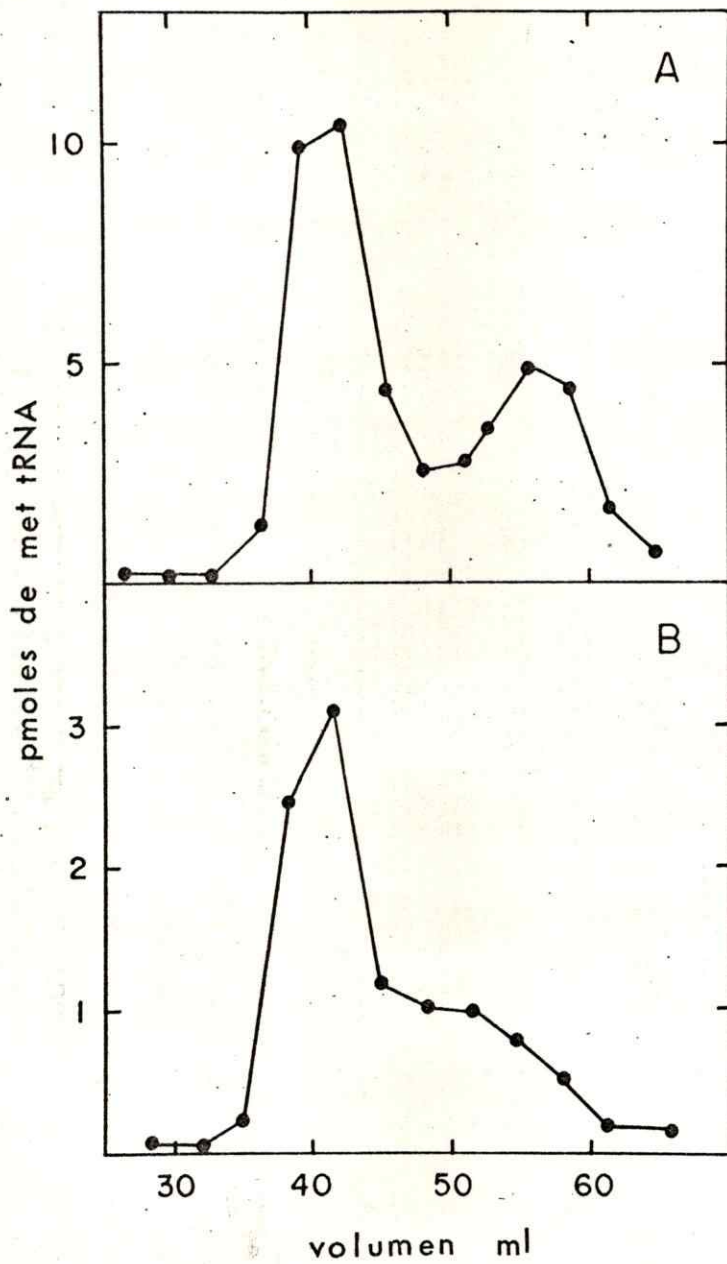


Figura 26

Figura 26. Formación de complejo ternario con EF1 de trigo y las dos especies de met-tRNA de E. coli

Se incuban 80 ug de EF1 de trigo con GTP y met-tRNA de E. coli y se analiza la formación de complejo ternario por filtración en Sephadex G-200 en las condiciones habituales. Las características de la columna son las mismas que las descritas en la Figura 25. La formación del complejo ternario se mide por precipitación de las fracciones de la columna con TCA al 5 %.

A: incubación con 120 pmoles de  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>m</sub> de E. coli

B: incubación con 40 pmoles de  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>f</sub> de E. coli



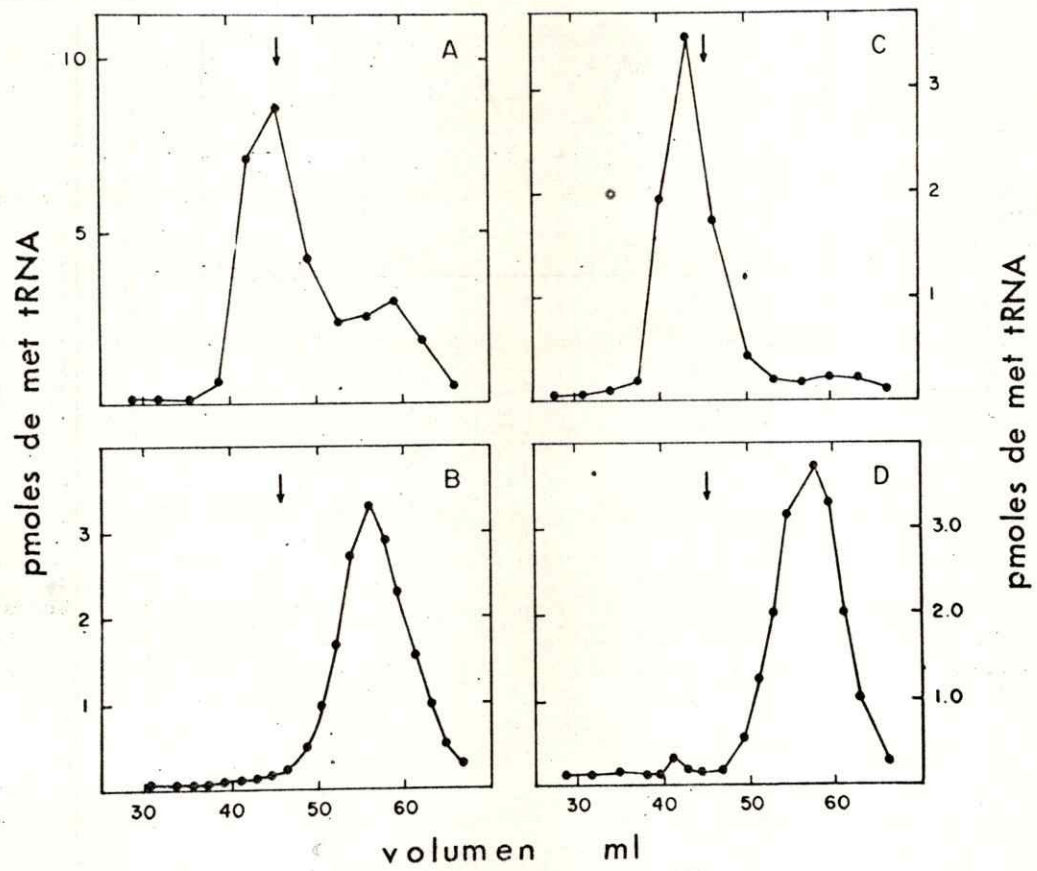


Figura 27

Figura 27. Interacción de EFTu de E. coli con distintas especies de met-tRNA medida por la capacidad de formar complejo ternario.

Se mide la especificidad de EFTu por su capacidad para formar complejo ternario con los met-tRNA homólogos y met-tRNA heterólogos por filtración en Sephadex G-100 (ver condiciones en la Figura 25), por incubación de 40 ug de EFTu de E. coli con GTP (150 uM).

A:  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>m</sub> de E. coli (100 pmoles)

B:  $^3\text{H}$ -met-tRNA<sub>f</sub> de E. coli (50 pmoles)

C:  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>m</sub> de trigo (50 pmoles)

D:  $^{14}\text{C}$ -met-tRNA<sub>i</sub> de trigo (50 pmoles)

Las flechas indican el volumen de elución de EFTu de E. coli

Para estudiar esta especificidad del factor de elongación de E. coli, se preparó EFTu según la técnica de Ravel y colaboradores (131) y se midió la interacción del factor con las dos especies de met-tRNA de E. coli y de trigo por formación de complejo ternario en Sephadex; como era de esperar, EFTu distingue entre el met-tRNA<sub>m</sub> y met-tRNA<sub>f</sub> homólogo y no forma complejo ternario con la especie iniciadora (Figura 27 A y 27 B). Pero además se observó que también es capaz de distinguir entre el met-tRNA<sub>m</sub> y el met-tRNA<sub>i</sub> de trigo y sólo forma complejo ternario con el primero de éstos (Figura 27 C y 27 D).

El hecho de que EFTu de E. coli puede distinguir entre los met-tRNA de células eucarióticas y el factor EF1 de trigo no sea capaz de diferenciar entre las formas de met-tRNA de procariontes puede deberse a que EFTu tenga una mayor especificidad por sus sustratos que EF1. Sin embargo, como normalmente una de las especies de met-tRNA de E. coli actúa en la síntesis proteica con su grupo amino formilado y no así las dos formas de met-tRNA de trigo, se puede pensar que existe una mayor diferencia estructural entre el met-tRNA<sub>m</sub> y el met-tRNA<sub>i</sub> de trigo y que ésta sea la razón del reconocimiento diferencial de EF1 y EFTu.



#### 9. Unión de metionil-tRNA a ribosomas en presencia del triplete AUG

Para corroborar la propiedad de iniciador del metionil-tRNA<sub>i</sub> se estudió la interacción de ambas formas de met-tRNA de trigo con ribosomas de trigo en presencia del triplete ApUpG. El trinucleótido AUG se preparó partiendo de un dímero y agregando otros nucleótidos, empleando la polinucleótido fosforilasa, según el método de Thach (132); la unión de los met-tRNA a los ribosomas se efectuó en las mismas condiciones que la unión no enzimática fen-tRNA a ribosomas en presencia de poli U, es decir, a una concentración de Mg<sup>++</sup> alta (20 mM) (ver Métodos).

La unión de los met-tRNA a ribosomas demostró que efectivamente existe una mayor afinidad de la especie iniciadora por los ribosomas que la que presenta el met-tRNA<sub>m</sub> (Tabla XIII).

Estudios posteriores efectuados por Richter y Lipmann (129) de la unión de las dos especies de met-tRNA a ribosomas en presencia de AUG catalizada por el factor de elongación demostraron que en estas condiciones se estimula la unión de la especie no iniciadora, met-tRNA<sub>m</sub>.

#### 10. Especificidad de la interacción de EFl y GTP con los distintos aminoacil-tRNA

En contraste con el hecho de que existe una aminoacil-tRNA sintetasa para cada aminoácido, el factor de elongación es el mismo para todos los aminoacil-tRNA. Sin embargo, hemos observado que hay

TABLA XIII

Unión de los diferentes metionil-tRNA de trigo a ribosomas de trigo  
en presencia del triplete AUG

Sistema	pmoles de met-tRNA unidos	
	met-tRNA <sub>i</sub>	met-tRNA <sub>m</sub>
Completo	0,42	0,11
- AUG	0,08	0,07
- ribosomas	0,04	0,05

La reacción se efectúa tal como se describe en Métodos. Se emplea <sup>3</sup>H-met-tRNA (ae 1000 mCi/mmol) separado en dos fracciones por cromatografía en DEAE-celulosa benzoilada.

Se emplean 2,5 UA<sub>260</sub> de ribosomas y 1,3 pmoles de cada especie de met-tRNA por ensayo. La reacción se realizó con una concentración de Mg<sup>++</sup> de 20 mM para medir específicamente la unión no enzimática del metionil-tRNA a los ribosomas (94).



diferencias en la afinidad de EF1 para los diferentes aminoacil-tRNA.

Para estudiar este fenómeno hemos analizado la interacción de 2 aminoacil-tRNA (empleando aminoácidos marcados con isótopos diferentes) con EF1 y GTP de modo de medir la afinidad relativa de ellos por el factor de elongación. Para ello se incubaron dos aminoacil-tRNA en igual concentración con una cantidad limitante de EF1 y con GTP durante 5 minutos a  $0^{\circ}$  y se midió la cantidad de ambos complejos ternarios formados, por aislamiento en columnas de Bio-Gel P-150. El complejo (EF1 : GTP : aminoacil-tRNA) eluye antes que el aminoacil-tRNA libre. La Figura 28 muestra los perfiles de elución de distintos pares de aminoacil-tRNA al ser incubados con EF1 y GTP.

En la Figura 28A se incubó  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA y  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA<sub>i</sub> (100 pmoles de cada uno) con EF1 y GTP. El met-tRNA<sub>i</sub> es el aa-tRNA iniciador de la síntesis proteica y no interactúa con EF1 en presencia de GTP, por lo que la mayor parte de la radiactividad proveniente del  $^3\text{H}$ -met-tRNA<sub>i</sub> eluye como aminoacil-tRNA. El pequeño pico que se observa en la zona de elución del complejo ternario se debe probablemente a una contaminación del met-tRNA<sub>i</sub> con la otra especie no iniciadora, met-tRNA<sub>m</sub>.

La Figura 28B muestra la competencia entre  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA y  $^3\text{H}$ -met-tRNA<sub>m</sub> por unirse a EF1 y GTP. Se observa que la razón



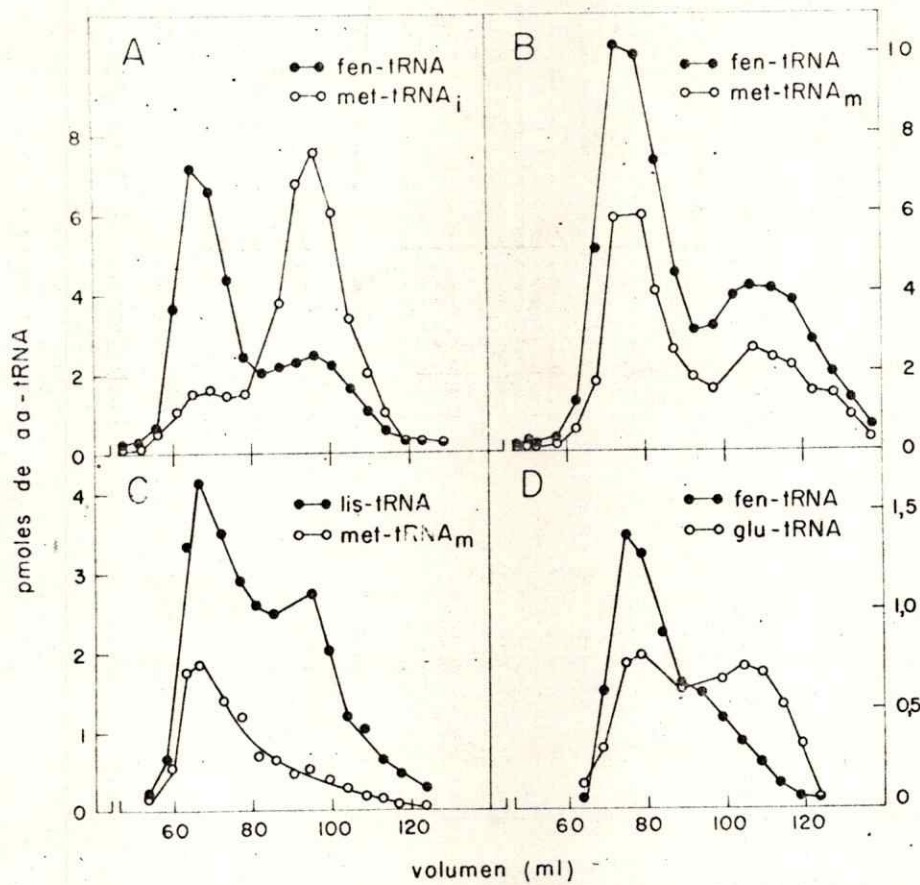


Figura 28

Figura 28. Estudio comparativo de la afinidad de EF1 por distintos aminoacil-tRNAs medidos por la formación de complejo ternario, aislado por filtración en gel.

Los diferentes complejos ternarios se filtraron en una columna de Bio-Gel P-150 (1,5 x 60 cm) equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y GTP 75  $\mu$ M.

El tRNA de trigo se aminoacila con los distintos aminoácidos radiactivos empleando como fuente de sintetasa una fracción parcialmente purificada de trigo.

En cada caso se agrega EF1 de trigo en cantidades limitantes (suficiente para unir 100 pmoles de GTP) con GTP 150  $\mu$ M y dos aminoacil-tRNA (100 pmoles de cada uno) marcados con distinto isótopo. La columna se eluye con la misma solución empleada para equilibrar la columna y se recogen fracciones de 1 ml.

Las fracciones se analizan por precipitación con TCA al 5 %, se filtran y se cuentan con el contador calibrado para detectar la doble marca de radiactividad.

$^{14}\text{C}/^3\text{H}$  es constante a lo largo de toda la columna, lo que refleja que existe la misma capacidad de EF1 para interactuar con ambos aa-tRNA.

Al comparar la afinidad de  $^{14}\text{C}$ -lisil-tRNA y  $^3\text{H}$ -metionil-tRNA<sub>m</sub> (Figura 28C) se observa que el lisil-tRNA forma mejor el complejo ternario que el met-tRNA<sub>m</sub> a pesar de que existe la posibilidad que el met-tRNA<sub>m</sub> se desacile en mayor grado que el lisil-tRNA (no hay met-tRNA libre eluyendo en la zona del tRNA y hay menor cantidad de met-tRNA unido a EF1 y GTP).

En la Figura 28D se demuestra que la afinidad de EF1 por  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA es mayor que por  $^3\text{H}$ -glutamil-tRNA ya que todo el fenilalanil-tRNA forma complejo ternario con EF1 y GTP; en cambio, sólo un 50 % del glu-tRNA se ha unido a (EF1 : GTP).

Sin embargo, un análisis comparativo de este tipo tiene limitaciones ya que además de medir las afinidades relativas hay que considerar la estabilidad del complejo ternario. Se ha observado que la estabilidad de estos complejos es baja y como su aislamiento en columnas es lento (de 4 a 5 horas), es probable que parte de ellos se degraden durante la filtración molecular. Es decir, que sería necesario determinar previamente la estabilidad de cada uno de los complejos a medida que eluyen a lo largo de la columna y la estabilidad de los aminoacil-tRNA que no han interactuado con EF1 y que eluyen libremente, sin protección por parte del complejo ternario.



## 11. Interacción entre EF1, GTP y RNA virales que se aminoacilan en su extremo 3'

Desde hace unos años se ha descrito el hecho de que ciertos RNA de virus vegetales pueden reaccionar con un aminoácido formando un enlace éster entre el grupo carboxilo del aminoácido y la ribosa 3' terminal del RNA en forma similar a la unión de los aminoácidos con el tRNA (107,133). Estudios de secuencia del extremo 3' de estos RNA demostraron la existencia de una secuencia -CpCpA igual que la de los tRNA (134) y se ha postulado la posibilidad de que en el extremo 3' haya una estructura semejante a un tRNA completo.

Se ha estudiado la especificidad de carga de los RNA de TMV, TYMV, BMV entre otros y se ha determinado que unen histidina, valina y tirosina respectivamente (133, 135-137).

Es interesante estudiar el posible rol fisiológico de estos RNA virales que se pueden aminoacilar. Se podría pensar que la estructura semejante a un aa-tRNA en el extremo terminal podría inducir al RNA viral a actuar como un mensajero facilitándole la interacción con los ribosomas y dirigiendo la síntesis de las proteínas virales o bien servir como templado para la replicasa viral. De hecho, se ha encontrado que el factor de elongación EFTu de E. coli, que interactúa fuertemente con los aminoacil-tRNA, forma parte de la estructura de la enzima que

replica el RNA del fago Q $\beta$ , como una subunidad de ella (83).

Este hecho nos llevó a estudiar la afinidad del factor de elongación de trigo, EF1, por estos aminoacil-RNA virales y la posibilidad de que formen un complejo ternario en presencia de GTP.

La formación del complejo entre (EF1 : GTP) y aminoacil-RNA viral se midió por el ensayo del filtro de nitrocelulosa en las mismas condiciones en que se midió el complejo ternario (EF1 : GTP : aa-tRNA).

Se cargó RNA del virus TYMV con <sup>14</sup>C-valina empleando como fuente de la valil-tRNA sintetasa una fracción parcialmente purificada de levadura (133). El valil-RNA se purificó por extracción fenólica y precipitación en etanol.

En la Figura 29 se observa la formación de un complejo entre EF1, GTP y valil-RNA de TYMV y EF1, GTP e histidil-RNA de TMV medido por la desaparición de cuentas de (EF1 : <sup>3</sup>H-GTP) en filtros de nitrocelulosa. Como se ve, la unión de GTP y del aminoacil-RNA viral a EF1 parece ser estequiométrica, lo mismo que sucede con la unión del EF1 con GTP y el aminoacil-tRNA. Cuando se empleó RNA viral desacilado, no se formó complejo ternario.

Se pensó que existía la posibilidad de que el RNA viral se degradara y sólo una parte de él interactuara con EF1; sin embargo, estudios realizados para determinar el tamaño del RNA viral después de haberse

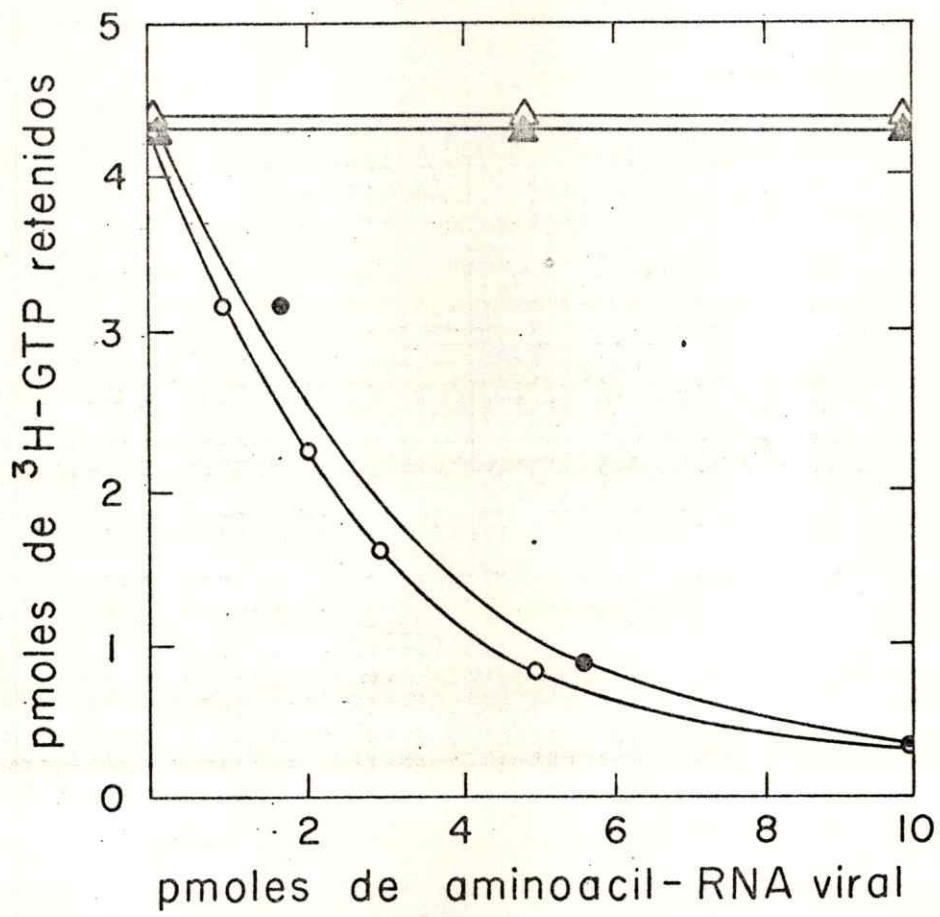


Figura 29



Figura 29. Interacción de valil-RNA del virus TYMV e histidil-RNA del virus TMV con EF1 de trigo y GTP.

La formación del complejo ternario con estos dos aminoacil-RNA virales se mide por el ensayo de retención en filtros de nitrocelulosa. En un volumen de 0,2 ml se incubaron 6 ug de EF1 parcialmente purificado,  $^3\text{H}$ -GTP 2 uM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,5 con cada uno de los aa-RNA virales en las cantidades indicadas en la Figura. La reacción se incubó durante 10 minutos a  $0^\circ$  y se detiene y determina la radiactividad en la forma habitual.

- — ■  $^3\text{H}$ -histidil-RNA del virus TMV
- — □  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA del virus TYMV
- ▲ — ▲ RNA del virus TMV obtenido por desacilación del  $^3\text{H}$ -his-RNA de TMV
- △ — △ RNA del virus TYMV obtenido por desacilación del  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA de TYMV

unido al factor demuestran que no hay hidrólisis del RNA y su tamaño es igual que el del RNA nativo.

Este estudio se efectuó aislando el RNA viral del complejo (EF1 : GTP : valil-RNA) (ver Métodos) y analizándolo por filtración en Sephadex G-100; para una mejor recuperación del valil-RNA por precipitación etanólica, se agregó tRNA total de E. coli como coprecipitante. Como se observa en la Figura 30, todo el  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA viral proveniente del complejo ternario eluye en el volumen vacío de la columna a diferencia del tRNA de E. coli que queda retenido en la columna.

## 12. Aislamiento del complejo (EF1 : GTP : aminoacil-RNA viral) por filtración molecular

El complejo (EF1 : GTP : aminoacil-RNA viral) formado por incubación de EF1 con  $^3\text{H}$ -GTP y  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA del virus TYMV en las mismas condiciones que para formar el complejo con aminoacil-tRNA se aisló por filtración en columnas de Sepharosa 4B que retiene compuestos de un peso molecular bajo  $20 \times 10^6$  daltones. El complejo ternario se midió tanto por la radiactividad del GTP como por la del  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA. Al incubar EF1 de trigo con  $^3\text{H}$ -GTP y filtrarlo en Sepharosa se observa la aparición de 2 picos de radiactividad correspondientes a las dos formas del factor de elongación  $\text{EF1}_\text{H}$  y  $\text{EF1}_\text{L}$  ya que ambas formas son retenidas por esta resina (Figura 31A). La adición de  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA de TYMV al medio de



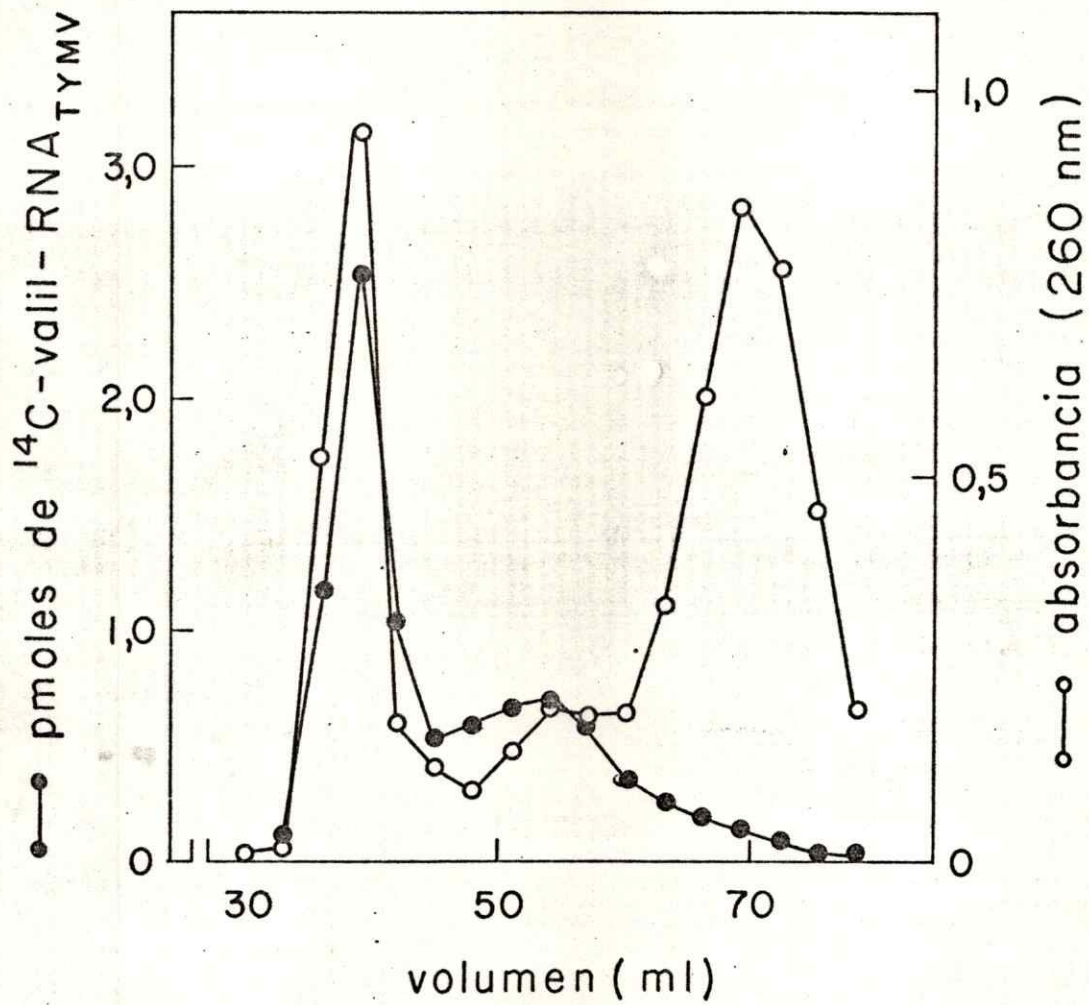


Figura 30



Figura 30. Análisis del peso molecular del RNA viral después de haber formado complejo ternario con EF1 y GTP.

El valil-RNA<sub>TYMV</sub> se recupera del complejo ternario por precipitación con etanol y se analiza por filtración en columna de Sephadex G-100 (2 x 70 cm) (ver Métodos). El <sup>14</sup>C-valil-RNA se analiza por precipitación con TCA al 5 % y el tRNA por absorbancia a 260 nm.

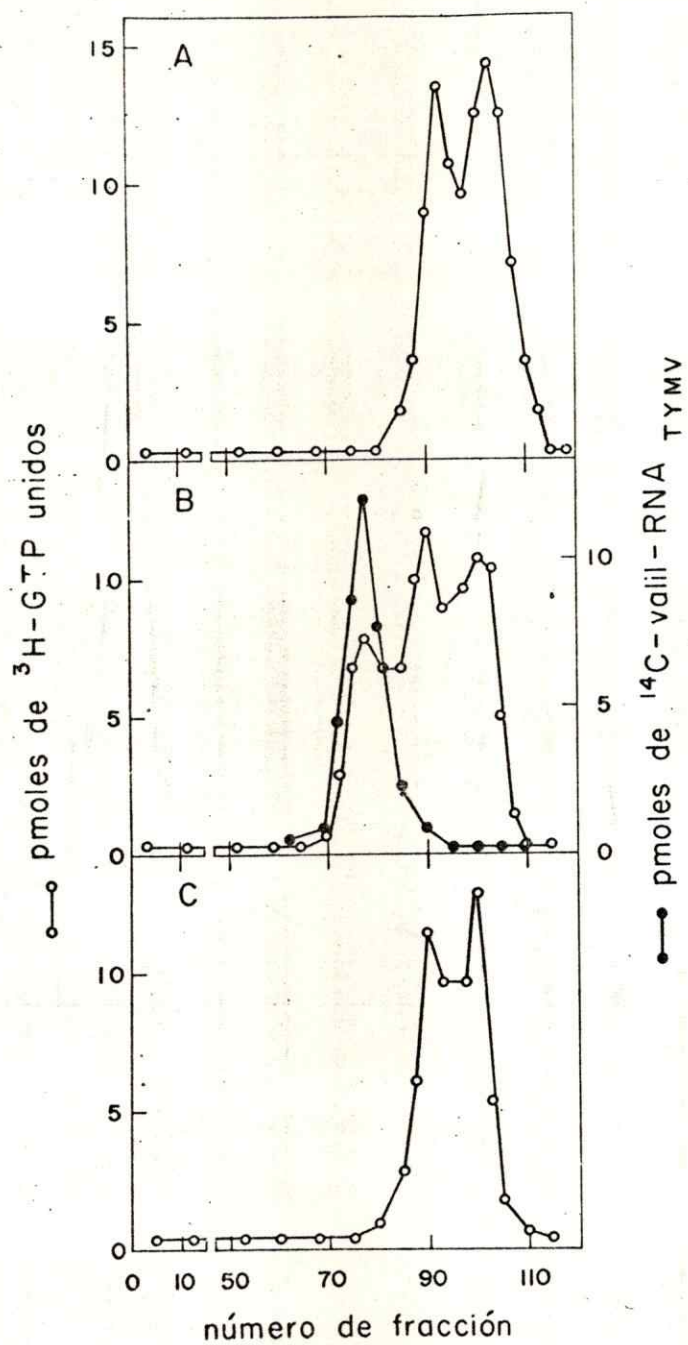


Figura 31

Figura 31. Aislamiento del complejo ternario (EF1 :  $^3\text{H-GTP}$  :  $^{14}\text{C-valil-RNA}_{\text{TYMV}}$ ) por filtración en gel.

Se emplea una columna de Sepharosa 4B (2,5 x 80 cm) equilibrada en cacodilato de sodio 10 mM pH 7,0,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. El complejo se forma por incubación durante 10 minutos a  $0^\circ$  de 150  $\mu\text{g}$  de EF1 de trigo parcialmente purificado,  $^3\text{H-GTP}$  (ae 5000 mCi/mmol)  $2,5 \times 10^{-6}$  M y  $^{14}\text{C-valil-RNA}_{\text{TYMV}}$  (ae 100 mCi/mmol) 40 pmoles y la misma concentración de sales que se emplea para equilibrar la columna en un volumen total de 0,5 ml. Se analizan alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de cada fracción contándolas directamente en solución de Bray (105).

A: EF1 y  $^3\text{H-GTP}$  incubados solos.

B: EF1 con  $^3\text{H-GTP}$  y  $^{14}\text{C-valil-RNA}_{\text{TYMV}}$ . Se cuenta con doble marca.

C: EF1 con  $^3\text{H-GTP}$  y  $\text{RNA}_{\text{TYMV}}$  proveniente de la desacilación de  $^{14}\text{C-valil-RNA}_{\text{TYMV}}$ .



incubación produce un complejo ternario que eluye bastante antes que las dos formas del factor de elongación; este pico contiene la radiactividad proveniente del  $^3\text{H}$ -GTP y del  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA (Figura 31B). En cambio, la adición de RNA de TYMV desacilado (obtenido por incubación del  $^{14}\text{C}$ -valil-RNA durante 15 minutos a  $37^\circ$  a pH 8,5), no produce complejo ternario en forma semejante a lo que ocurre con el tRNA desacilado (Figura 31C).

### 13. Interacción de EF1 y GTP con el valil-RNA acetilado

El bloqueo del grupo amino libre del aminoacil-tRNA impide la interacción con EF1 y GTP. Es así como el N-acetil-fenilalanil-tRNA, con una estructura análoga a la de un peptidil-tRNA no forma complejo ternario con EF1 y GTP (75), lo que indicaría que se requiere el grupo amino libre para que se ejerza el reconocimiento por el factor de elongación.

En forma análoga a estos estudios se modificó el grupo amino libre del valil-RNA viral por acetilación con anhídrido acético como se describe en Métodos y se analizó la formación de un complejo ternario con EF1 y GTP por el ensayo en filtro de nitrocelulosa. En la Figura 32 se observa que a diferencia del valil-RNA, el N-acetil-valil-RNA no es capaz de interactuar con el factor de elongación y GTP para formar un complejo ternario, lo que corrobora la necesidad de tener un grupo amino libre en el aminoácido que esterifica al RNA para que interactúe con

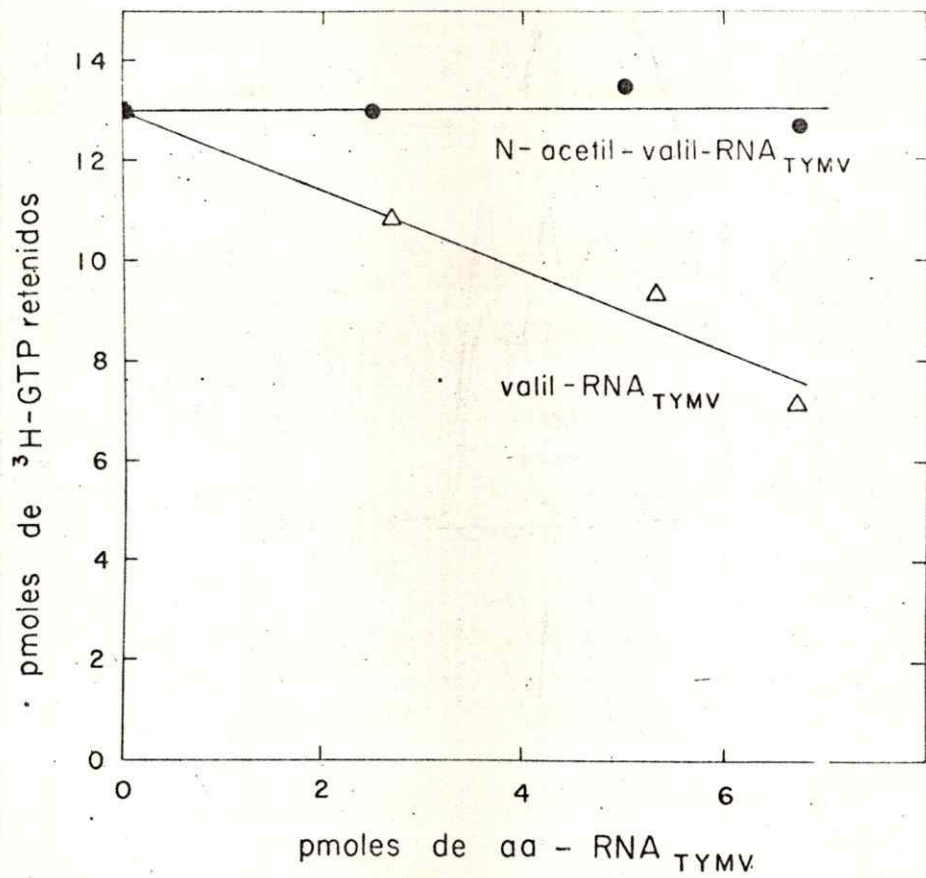


Figura 32

Figura 32. Interacción de EF1 con GTP y N-acetil-valil-RNA<sub>TYMV</sub>.

El complejo ternario se forma por incubación de EF1 con <sup>3</sup>H-GTP y N-acetil-<sup>14</sup>C-valil-RNA<sub>TYMV</sub> en las mismas condiciones que las empleadas para formar el complejo ternario con aminoacil-tRNA. Se incubó 5 minutos a 0°, se detiene la reacción por dilución con solución salina y se filtra en filtros de nitrocelulosa.



el factor de elongación.

14. Utilidad del complejo ternario como un medio para determinar el estado de aminoacilación de tRNA in vivo

Aprovechando el hecho de que el factor de elongación y GTP interactúan con el tRNA solo cuando éste está esterificado con un aminoácido, se empleó el método de formación del complejo ternario para medir el grado de aminoacilación del tRNA in vivo.

Al microinyectar tRNA en oocitos de Xenopus laevis, se produce una aminoacilación in vivo del tRNA inyectado empleándose las sintetetasas y el ATP endógeno de las células.

Para medir la aminoacilación del tRNA inyectado se debe inyectar  $^3\text{H}$ -tRNA para diferenciarlo del tRNA endógeno. Este  $^3\text{H}$ -tRNA de levadura se marca con  $^3\text{H}$ -uridina de alta actividad específica que permite detectar pequeñas cantidades de tRNA inyectado. Si se emplea aminoácidos radiactivos marcados con  $^{14}\text{C}$  para medir la aminoacilación in vivo, es difícil determinar con exactitud la pequeña cantidad de  $^{14}\text{C}$  unido al  $^3\text{H}$ -tRNA. Es por esto que para determinar la carga del  $^3\text{H}$ -tRNA inyectado se analizó su capacidad para formar complejo ternario con EF1 y GTP aprovechando el hecho de que sólo el tRNA aminoacilado es capaz de formar complejo ternario (75).

Se microinyectaron 100 ng de  $^3\text{H}$ -tRNA de levadura en oocitos de rana y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente; el tRNA se recuperó de los oocitos y se purificó por extracción fenólica y por precipitación etanólica.

Se analizó el  $^3\text{H}$ -tRNA recuperado de los oocitos después de su inyección por electroforesis en geles de poliacrilamida y dio una migración idéntica a la del  $^3\text{H}$ -tRNA utilizado para la microinyección, lo que indica que aparentemente el tRNA no sufre modificaciones en el citoplasma del oocito (Figura 33).

La aminoacilación in vivo del tRNA inyectado se analizó por su capacidad para formar el complejo ternario con EF1 y GTP. El análisis de formación del complejo ternario se efectuó en una columna de Sephadex G-200 en las condiciones descritas en Métodos. En la Figura 34 se observa la formación de un complejo ternario por interacción de EF1 de trigo, GTP y aminoacil- $^3\text{H}$ -tRNA ( $^3\text{H}$ -tRNA de levadura esterificado in vitro con una mezcla de aminoácidos fríos y sintetadas de trigo). La Figura 34 B muestra la formación del complejo ternario (EF1 : GTP : aa- $^3\text{H}$ -tRNA<sub>lev</sub>); se observa que alrededor de un 40 % del  $^3\text{H}$ -tRNA se esterificó con aminoácidos y formó el complejo ternario. Empleando  $^3\text{H}$ -tRNA desacilado, no se observa interacción entre EF1, GTP y el  $^3\text{H}$ -tRNA, como se puede ver en la Figura 34 A.



ORIGEN

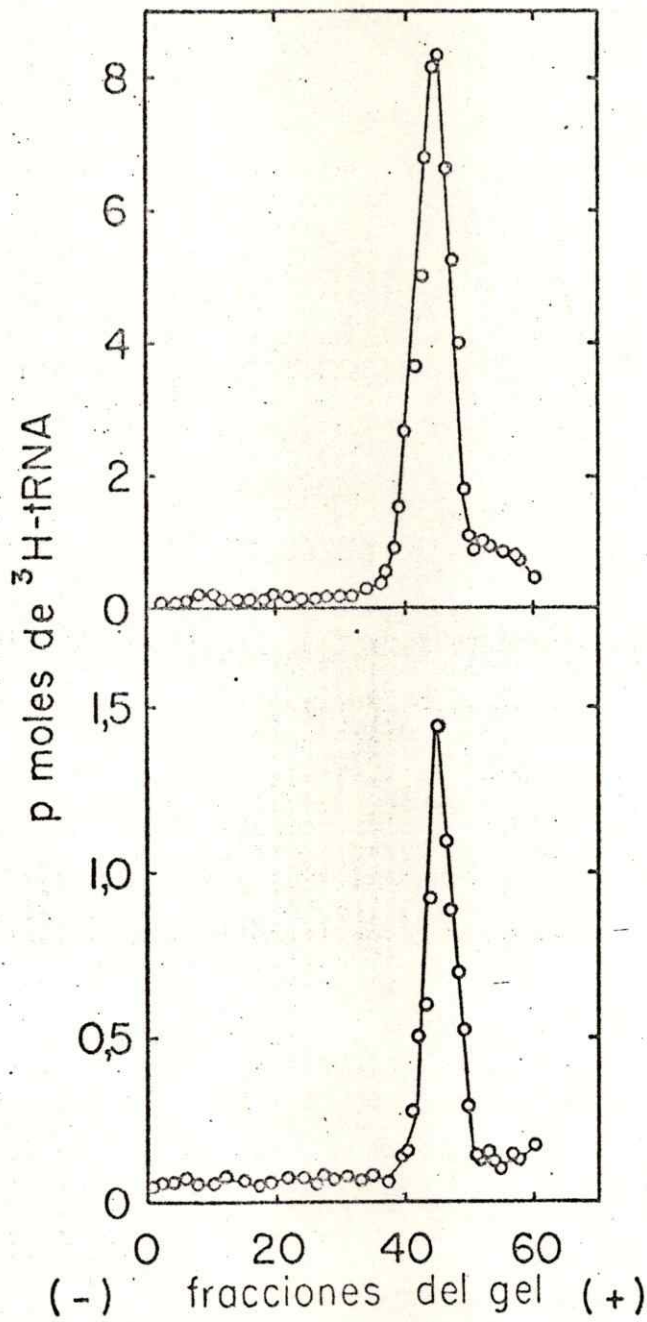


Figura 33



Figura 33. Análisis del  $^3\text{H}$ -tRNA de levadura por electroforesis en gel de poliacrilamida.

El análisis en gel se realiza como se describe en Métodos.

En la parte superior de la figura se observa la migración del  $^3\text{H}$ -tRNA de levadura y en el gráfico interior, la migración del  $^3\text{H}$ -tRNA inyectado en los oocitos y recuperado por extracción fenólica y precipitación con etanol.

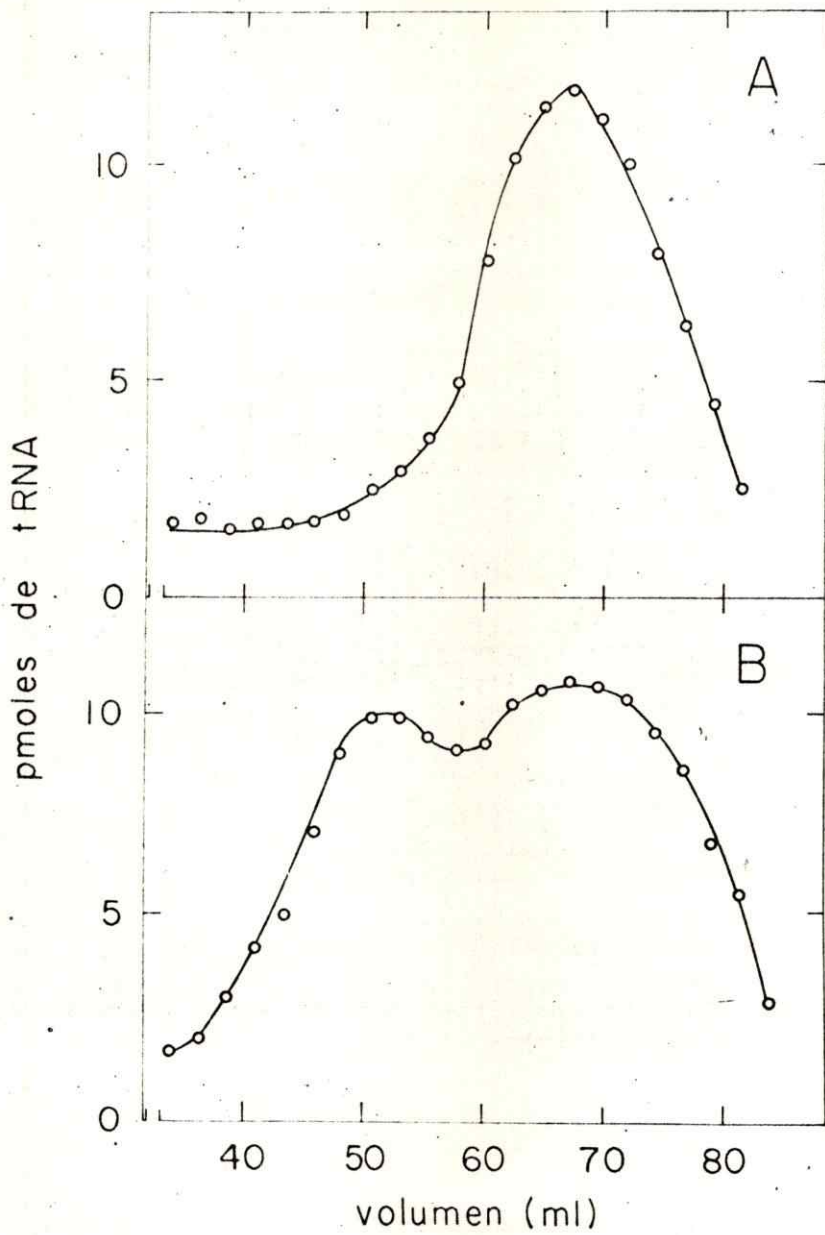


Figura 34

Figura 34. Aminoacilación in vivo de tRNA inyectado en oocitos.

Se emplea una columna de Sephadex G-200 (1,5 x 35 cm) equilibrada en las condiciones habituales. Las fracciones se analizan por precipitación con igual volumen de TCA al 10% y se cuentan en un sistema de centelleo.

A: se incuba EF1 (aproximadamente 100 ug) con  $^3\text{H}$ -tRNA desacilado (80.000 cpm) y GTP 75  $\mu\text{M}$ . La radiactividad corresponde al volumen de elución del  $^3\text{H}$ -tRNA libre.

B: se incuba EF1 con GTP 75  $\mu\text{M}$  y aminoacil- $^3\text{H}$ -tRNA (54.000 cpm) en la solución salina habitual. El  $^3\text{H}$ -tRNA de levadura (alrededor de 30 ug) se carga con una mezcla de 20 aa fríos, cada uno en concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M empleando sintetetasas de trigo. Se hace en las mismas condiciones que un control en que se carga tRNA de levadura con  $^{14}\text{C}$ -fenilalanina.



En la Figura 35 se observa la formación de complejo ternario empleando el  $^3\text{H}$ -tRNA microinyectado y aminoacilado in vivo. Como se puede observar, más de un 80 % del tRNA inyectado se aminoaciló y fue capaz de interactuar con EFl y GTP para formar el complejo ternario. La cantidad de tRNA de levadura inyectado en cada oocito es de 100 ng, es decir, 2,5 veces superior al tRNA endógeno presente en el oocito en el momento de la microinyección. De estos datos se concluye que la capacidad de aminoacilación del tRNA que tiene el oocito es enorme en relación con la cantidad de tRNA existente en el citoplasma.

El aminoacil- $^3\text{H}$ -tRNA cargado in vivo proveniente del complejo ternario se aisló por extracción fenólica y se desaciló por tratamiento a pH 8,5; la incubación de este tRNA descargado, con EFl y GTP no produjo complejo ternario como se demuestra por análisis en Sephadex G-200 y toda la radiactividad eluye en forma de tRNA libre (Figura 35B).

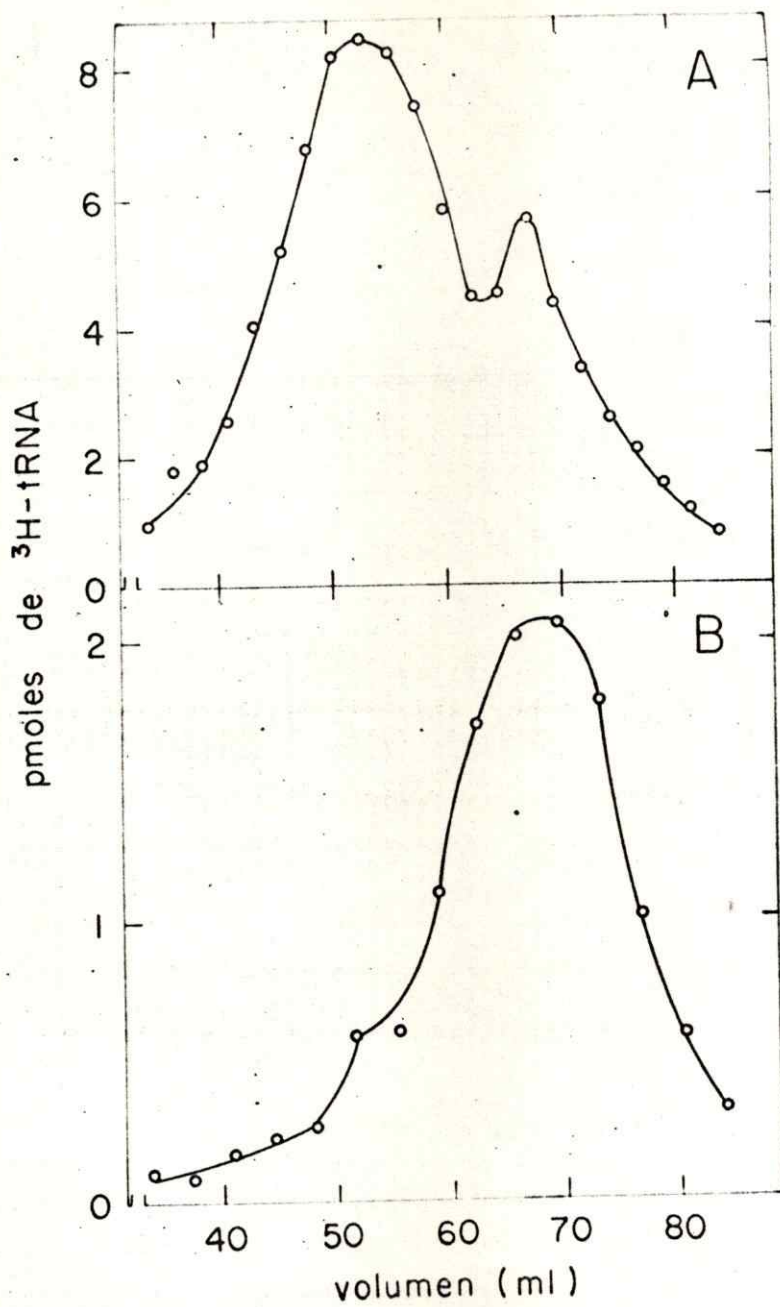


Figura 35

Figura 35. Determinación de la aminoacilación de tRNA microinyectado en oocitos por su capacidad de formar complejo ternario.

El aa-<sup>3</sup>H-tRNA recuperado de los oocitos (ver Métodos) se incuba con alrededor de 100 ug de EF1 de trigo y GTP 150 uM en las condiciones salinas habituales y se filtra en una columna de Sephadex G-200 (1,5 x 35 cm). Las fracciones se analizan tal como se describe en la Figura 34.

A: se incuba EF1 con GTP y el aa-<sup>3</sup>H-tRNA de levadura recuperado de los oocitos.

B: se juntan las fracciones comprendidas entre los volúmenes 42 y 58 de la filtración presentada en A (el aa-tRNA correspondiente al complejo ternario), se desacila y se incuba en las mismas condiciones que se emplean para formar el complejo ternario.



## CAPITULO IV

### ACTIVIDAD DE EF1 PARA CATALIZAR LA UNION DE AMINOACIL-tRNA A RIBOSOMAS Y PARA ESTIMULAR LA SINTESIS POLIPEPTIDICA

Como se vio en el Capítulo I, es posible medir la actividad de EF1 tanto por su capacidad de unir aminoacil-tRNA a ribosomas como por su capacidad de estimular la síntesis de un polipéptido en presencia del factor de elongación complementario EF2. En el primer caso se requiere la presencia de un trinucleótido correspondiente al aminoácido que está esterificando al tRNA y en el segundo caso, la presencia de un RNA mensajero o de un polinucleótido sintético que dirija la síntesis polipeptídica.

En la Tabla III se especificaron las condiciones necesarias para unir  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA a ribosomas de trigo en presencia de poli U. También se aprovechó esta actividad de EF1 para medir la diferente unión de las dos especies de metionil-tRNA a los ribosomas en presencia del triplete AUG y se pudo observar que la forma iniciadora del metionil-tRNA se une preferentemente a los ribosomas y a AUG en ausencia del factor de elongación.

1. Acción del GTP en la reacción de unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas

Como se discutió en el Capítulo II, el factor de elongación tiene afinidad por unir tanto GTP como GDP o análogos de estos compuestos siempre que tenga un pirofosfato unido al carbono 5' de la ribosa del nucleósido. En cambio, la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas requiere exclusivamente nucleósidos trifosfatos que interactúen con el factor de elongación y con aminoacil-tRNA para formar un complejo ternario.

Se midió la unión de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA a ribosomas en presencia de poli U y se observó que es activa sólo en presencia de GTP o de su análogo trifosfato GMP-PCP (5'-guanosín metilén difosfonato) que contiene un grupo metileno entre los grupos fosfatos  $\beta$  y  $\delta$  del GTP y, por lo tanto, no puede hidrolizarse en GDP y fósforo inorgánico (Tabla XIV). La actividad de este compuesto demostraría que la hidrólisis del GTP no es necesaria para la reacción inicial de la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas. Otros autores (68,70) han presentado evidencias, sin embargo, que demuestran que el tRNA unido en presencia de GMP-PCP no es capaz de reaccionar formando enlace peptídico con peptidil-tRNA en el sitio P del ribosoma. En la Tabla XIV se observa que GDP y ppGpp no pueden catalizar la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas



y más bien parecen inhibir la actividad observada en ausencia de nucleótidos. Parece ser que la actividad de unión de aminoacil-tRNA aparente en ausencia de GTP se debería a que los ribosomas o el tRNA tendrían como contaminante pequeñas cantidades de GTP.

## 2. Acción de nucleótidos análogos del GTP en la síntesis de polifenilalanina

A diferencia de la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas, la síntesis del enlace peptídico requiere GTP como donador de energía, produciéndose la hidrólisis del GTP a GDP y fósforo inorgánico. En la Tabla XV se observa una reacción de polimerización de fenilalanina a partir de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA en presencia de ribosomas, poli U y diferentes nucleótidos y se puede ver que sólo el GTP puede estimular la formación del enlace peptídico. Su análogo trifosfato GMP-PCP que no se hidroliza, no es capaz de estimular esta reacción.

La presencia de los nucleótidos como GDP, GMP, ppGpp o GMP-PCP capaces de interactuar con EF1 junto con el GTP inhiben la reacción de polimerización. Sin embargo, en la reacción de polimerización actúa además el factor de elongación EF2 que también requiere GTP y forma un complejo (EF2 : GTP)(138). EF2 necesita concentraciones mucho más altas de GTP que EF1 para catalizar la translocación del peptidil-tRNA. Es probable, por lo tanto, que la inhibición de la polimerización



TABLA XIV

Especificidad por los nucleótidos que catalizan la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas

Nucleótido agregado	<sup>14</sup> C-fenilalanil-tRNA unido (pmoles)
Ninguno	1,42
GTP	3,26
GDP	0,73
ppGpp	0,84
GMP-PCP	4,26

La incubación en 0,1 ml contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, DTT 1 mM, 30 ug de poli U, 2,5 UA<sub>260</sub> de ribosomas de trigo, 11 pmoles de <sup>14</sup>C-fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol) y una preparación parcialmente purificada que contiene alrededor de 20 ug de EF1 de trigo.

La reacción se incuba durante 20 minutos a 20°, se detiene por dilución de 30 veces del volumen de reacción con una solución salina y se filtra en filtros de nitrocelulosa.

TABLA XV

Efecto de GTP y análogos en la síntesis de polifenilalanina en presencia de ribosomas de trigo y poli U

Nucleótido agregado	<sup>14</sup> C-fenilalanina polimerizada (pmoles)
Ninguno	0,07
GTP (0,5 mM)	12,00
GDP (0,5 mM)	1,30
ppGpp (0,5 mM)	0,18
GMP (0,5 mM)	0,16
GMP-PCP (0,5 mM)	0,04
GTP (0,5 mM) + GDP (4 mM)	1,70
GTP (0,5 mM) + ppGpp (4 mM)	0,70
GTP (0,5 mM) + GMP-PCP (4 mM)	0,01

La incubación en 0,1 ml contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, DTT 1 mM, 5 ug de creatín fosfoquinasa, creatín fosfato 5 mM, GSH 2 mM, 40 ug de poli U, 2,5 UA<sub>260</sub> de ribosomas de trigo, 15 pmoles de <sup>14</sup>C-fenilalanil-tRNA (ae 100 mCi/mmol) y una fracción sobrenadante de una centrifugación a 105.000 x g de germen de trigo, precipitada entre 40 y 80 % de saturación con sulfato de amonio que contiene EF1 y EF2. La reacción se incuba durante 15 minutos a 37°, se detiene con TCA al 5 % calentando 15 minutos a 90° y se filtra en filtros de fibra de vidrio.



provocada por la presencia de nucleótidos análogos al GTP se deba más a una interacción de ellos con el factor de elongación 2 que con EF1.

### 3. Actividad de EF1<sub>H</sub> y EF1<sub>L</sub> en la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas y en la síntesis proteica

La formación del enlace peptídico y en general la síntesis de una proteína requiere la acción conjunta de EF1, que estimula la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas, la peptidil transferasa presente en la subunidad ribosomal mayor, que cataliza la formación del enlace peptídico y EF2 que cataliza el movimiento del peptidil-tRNA desde el sitio ribosomal A al sitio P. Las actividades conjuntas de EF1 y EF2 se estimulan, como se puede observar en la Tabla XVI.

Al estudiar la actividad de las dos formas de EF1, EF1<sub>L</sub> y EF1<sub>H</sub> en la formación del enlace peptídico se encontró que existía una gran dificultad para separar EF1<sub>H</sub> y EF2 por los métodos de filtración molecular o de centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa empleados para separar las formas pesada y liviana de EF1.

En la Figura 36 se observa la filtración de EF1 en una columna de Sephadex G-200 en que se analizó la capacidad de EF1 para unir <sup>3</sup>H-GTP y se observa la presencia de las dos fracciones EF1<sub>H</sub> y EF1<sub>L</sub> características, y la capacidad de cada fracción para catalizar la síntesis de



TABLA XVI

Acción de EF1 y EF2 en la síntesis polipeptídica

Condiciones	poli-fenilalanina (pmoles)
EF1	0,50
EF2	0,58
EF1 + EF2	7,90

La incubación se realiza como se describe en la Tabla XV.

EF1 y EF2 libres uno del otro se preparan por cromatografía en DEAE-celulosa como se describe en Métodos.

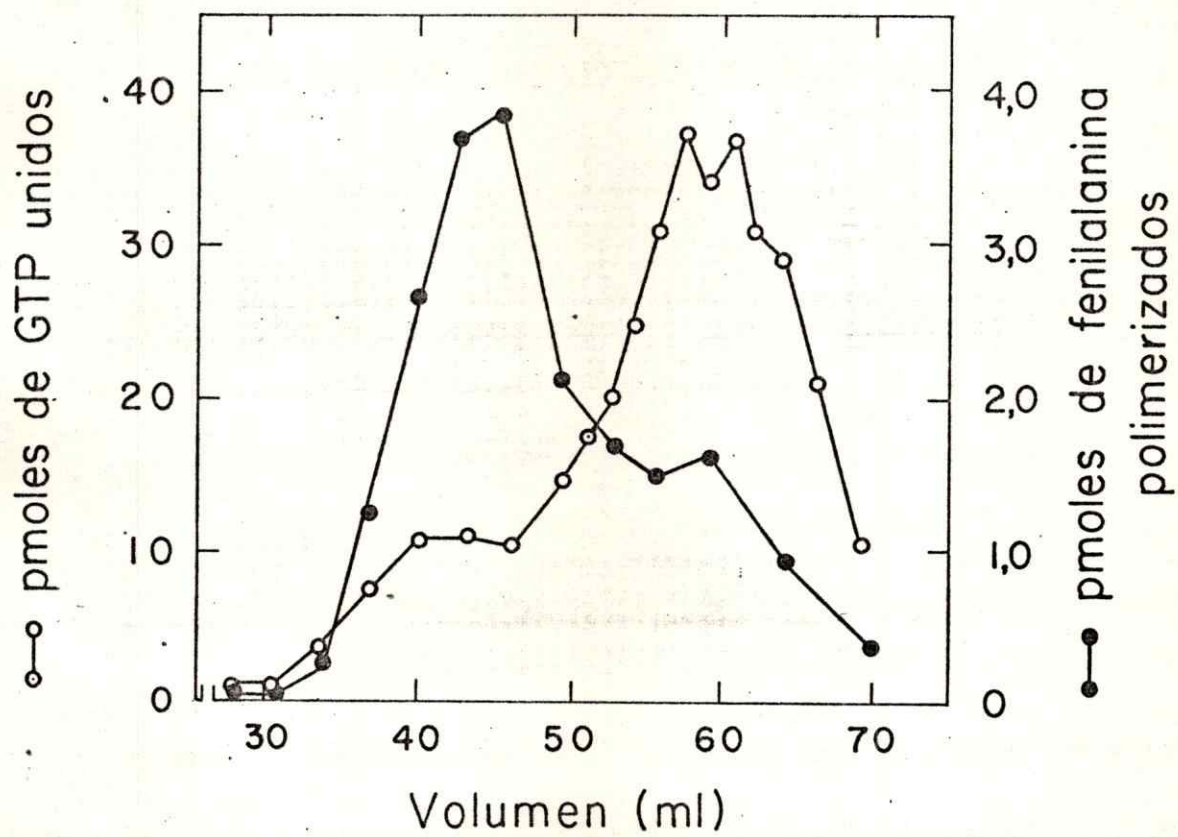


Figura 36

Figura 36. Filtración de EFl de trigo en Sephadex G-200

Se filtran aproximadamente 200 ug de EFl de trigo parcialmente purificado en DEAE-celulosa y luego preincubado durante 10 minutos a 0° con GTP 150 uM, en una columna de Sephadex G-200 (55 x 1,5 cm) equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, GTP 75 uM y 2-mercaptoetanol 1 mM. Se recogen fracciones de 1,6 ml y se analizan alícuotas de 150 ul en su capacidad de unir GTP (incubando las fracciones con <sup>3</sup>H-GTP 2,5 x 10<sup>-6</sup> M (ae 1000 mCi/mmol)) y 50 ug de seroalbúmina de bovino en 200 ul, durante 5 minutos a 0° (ver Métodos) y en su capacidad para estimular la síntesis de polifenilalanina (incubando las fracciones con una concentración final de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, GTP 0,5 mM, KCl 50 mM, DTT 2 mM, 2,5 UA<sub>260</sub> de ribosomas de trigo lavados, 40 ug de poli U y 12 pmoles de <sup>14</sup>C-fen-tRNA de ae 100 mCi/mmol, durante 15 minutos a 37°, deteniendo la reacción con TCA al 5 % y calentando a 90° durante 15 minutos (ver Métodos).



poli-fenilalanina para lo cual se agregó  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA, GTP, ribosomas y poli U. Aunque aparentemente  $\text{EF1}_\text{H}$  muestra una mayor capacidad para estimular la síntesis proteica que  $\text{EF1}_\text{L}$ , este hecho puede deberse a la presencia de EF2 que eluye junto a  $\text{EF1}_\text{H}$ . Esto indujo a pensar que la mayor estimulación de  $\text{EF1}_\text{H}$  para sintetizar polifenilalanina se debía exclusivamente a la presencia de EF2 que actuaba complementando a EF1.

Como se observa en la Figura 37, estudios similares en que se determinó la polimerización de fenilalanina estimulada por fracciones de EF1 separadas por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa demostraron el mismo efecto:  $\text{EF1}_\text{H}$  estimula más la síntesis proteica que  $\text{EF1}_\text{L}$ . Sin embargo, al realizar este análisis en gradiente de concentración de sacarosa,  $\text{EF1}_\text{H}$  también migra junto con EF2.

En la Figura 37A se observa que  $\text{EF1}_\text{L}$  tiene mayor capacidad para unir  $^3\text{H}$ -GTP que  $\text{EF1}_\text{H}$ . Un análisis de las mismas fracciones de la gradiente en que se midió la capacidad de  $\text{EF1}_\text{L}$  y  $\text{EF1}_\text{H}$  para catalizar la síntesis de polifenilalanina a partir de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanil-tRNA demostró que  $\text{EF1}_\text{H}$  tiene mayor capacidad que  $\text{EF1}_\text{L}$  para catalizar esta reacción (Figura 37B). Pero como se verá, la posible presencia de EF2 junto a  $\text{EF1}_\text{H}$  puede enmascarar esta reacción.

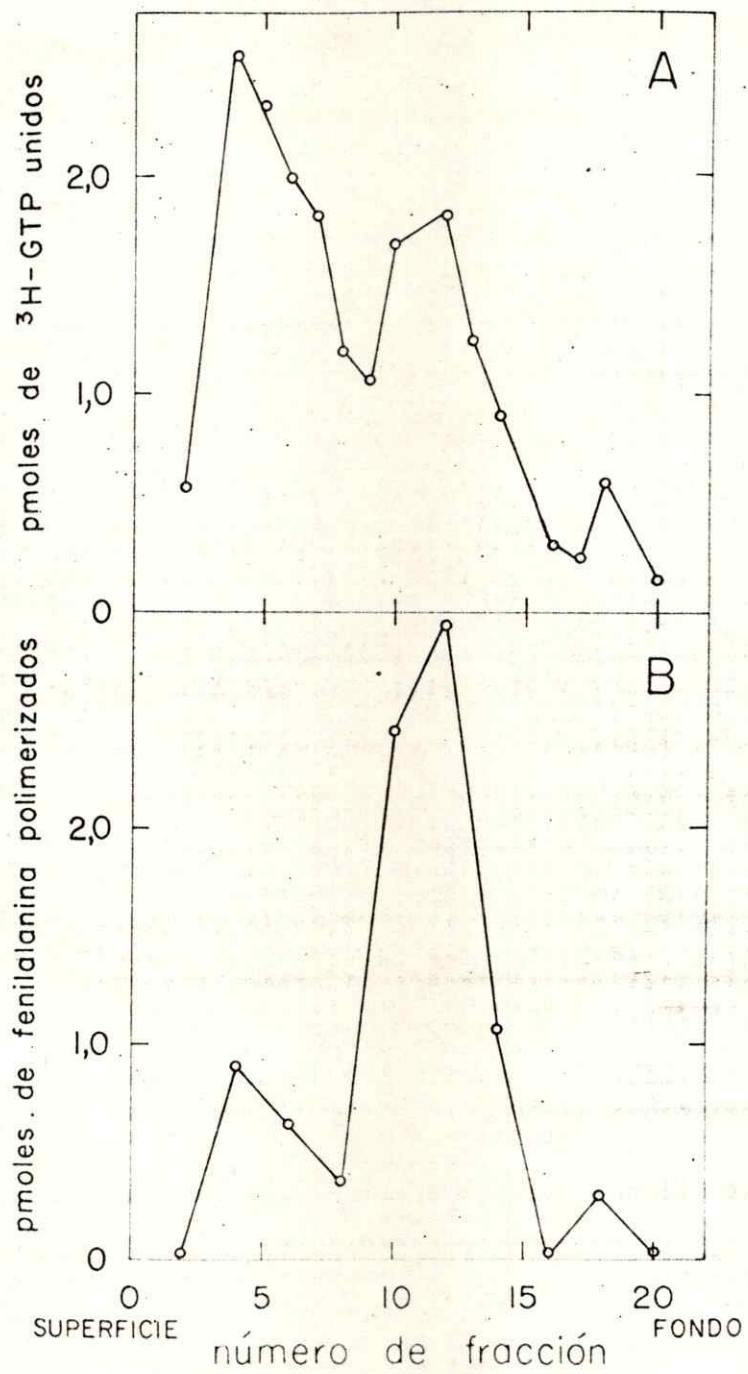


Figura 37

Figura 37. Capacidad de  $EF1_L$  y  $EF1_H$  para unir GTP y para catalizar la síntesis de polifenilalanina.

$EF1_L$  y  $EF1_H$  provenientes de una fracción que contenía 100 ug de  $EF1$  semipurificada en DEAE-celulosa se separan por centrifugación en un gradiente lineal de sacarosa entre 5 y 20 % p/p (ver Métodos).

Se recogen fracciones de 6 gotas y se analizan en su capacidad para unir GTP (Figura 37A) (incubando 100 ul de cada fracción con  $^3H$ -GTP  $2,5 \times 10^{-6}$  M a 1000 mCi/mmol) y en su capacidad para catalizar la síntesis de polifenilalanina (Figura 37B) (incubando 50 ul de cada fracción con una concentración final de Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $MgCl_2$  8 mM, GTP 0,5 mM, KCl 50 mM, DTT 2 mM, 2,5 UA<sub>260</sub> de ribosomas de trigo, 40 ug de poli U y 12 pmoles de  $^{14}C$ -fen-tRNA a 100 mCi/mmol durante 15 minutos a  $37^\circ$ , deteniendo la reacción con TCA al 5 % y calentando a  $90^\circ$  durante 15 minutos antes de filtrar en filtros de fibra de vidrio y contar la radiactividad en un sistema de centelleo.



Para verificar si la actividad de  $EF1_H$  es efectivamente mayor que  $EF1_L$  se midió la capacidad de las dos fracciones para estimular la unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas, para lo cual se requiere sólo  $EF1$  y no es necesaria la presencia del factor complementario  $EF2$ . Se separaron las dos fracciones por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa y se midió la capacidad de unir  $^3H$ -GTP y de estimular la unión de  $^{14}C$ -fenilalanil-tRNA a ribosomas. En la Figura 38B se observa que  $EF1_H$  tiene efectivamente mayor capacidad estimuladora que  $EF1_L$  aún cuando  $EF1_L$  también une  $^3H$ -GTP en estas condiciones (Figura 38A). Sin embargo, es probable que  $EF1_H$  se disocie por acción del GTP antes de interactuar con el aminoacil-tRNA.

En la sección III se vio que la fracción liviana tiene mayor capacidad que  $EF1_H$  para formar complejo ternario con aminoacil-tRNA y GTP (Figura 21), es decir,  $EF1_L$  une estequiométricamente GTP y aminoacil-tRNA, no así  $EF1_H$ .

Esta aparente discrepancia puede deberse a la enorme inestabilidad del sitio de unión del aa-tRNA en el factor de elongación, que podría ser aún más lábil en la especie liviana que en la pesada. Sin embargo, no se puede excluir el hecho de que la fracción pesada tenga una actividad catalítica en la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas y que la fracción liviana actúe en forma estequiométrica. En este sentido se

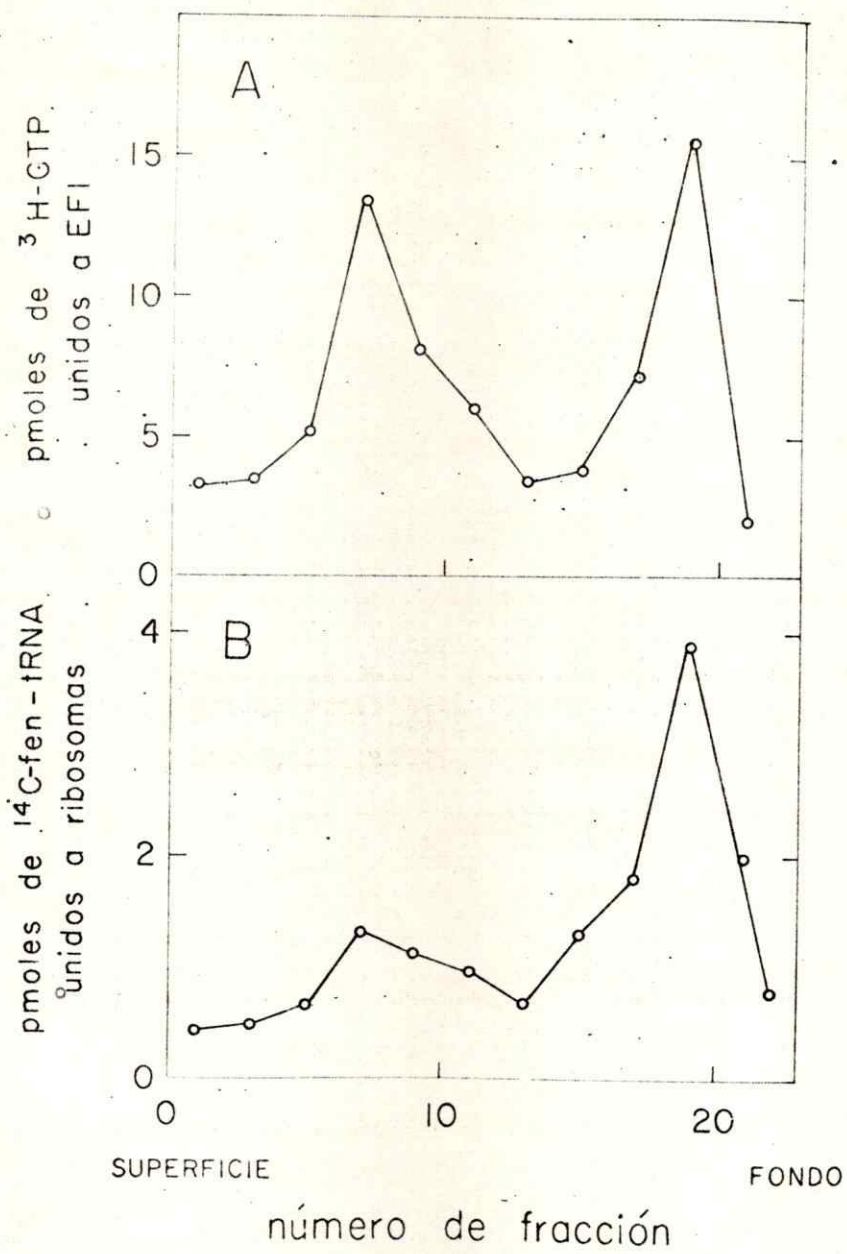


Figura 38

Figura 38. Capacidad de  $EF1_L$  y  $EF1_H$ , separadas en un gradiente de concentración de sacarosa, para unir GTP y para catalizar la unión de fen-tRNA a ribosomas.

$EF1_L$  y  $EF1_H$  se separan por centrifugación lineal en gradiente de sacarosa como se describe en la Figura 37.

A: capacidad de las fracciones para unir GTP medida por incubación de 100  $\mu$ l de cada fracción con  $^3H$ -GTP  $2,5 \times 10^{-6}$  M a 1000 mCi/mmol durante 10 minutos a  $0^\circ$ .

B: capacidad de las fracciones para catalizar la unión de fen-tRNA a ribosomas de trigo medida por incubación de 100  $\mu$ l de cada fracción con una concentración final de  $NH_4Cl$  50 mM, GTP 0,5 mM, 40  $\mu$ g de poli U, 2,5  $UA_{260}$  de ribosomas de trigo lavados con  $NH_4Cl$  0,5 M y 10 pmoles de  $^{14}C$ -fen-tRNA a 100 mCi/mmol, durante 20 minutos a  $25^\circ$  (ver Métodos).



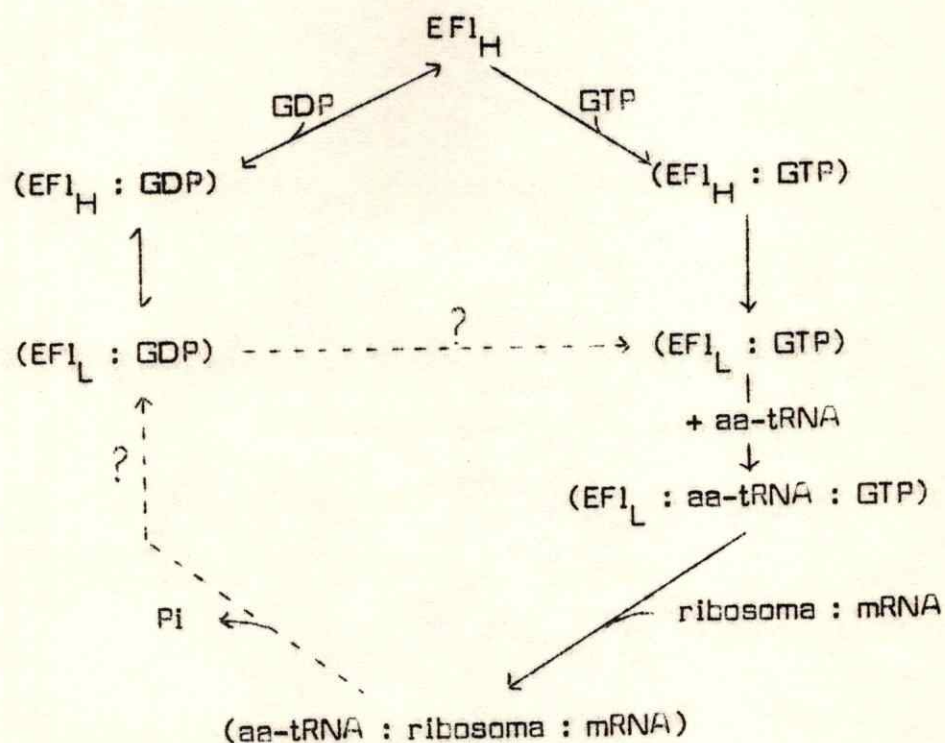
podría postular que  $EFl_L$  sería como EFTu de E. coli y  $EFl_H$  como el complejo EFTu-EFTs que se ha descrito en E. coli. Unos autores han publicado evidencias para el aislamiento de un factor que podría ser equivalente a EFTs en eucariontes (99,112) pero este hallazgo no ha recibido confirmación.

## DISCUSION

### Formas enzimáticas de EF1 : Efecto de nucleótidos

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis han demostrado que el problema de establecer la relación entre la estructura y función del factor de elongación I de eucariontes es complejo. Lo que se pensó que sería una simple molécula proteica con sitios para unir GTP y aminoacil-tRNA se fue transformando en un complejo proteico de alto peso molecular que a bajas concentraciones de GTP interactúa con este nucleótido (o análogos de él) formando un complejo muy estable, pero que a concentraciones mayores del nucleótido era capaz de disociarse en una especie de menor peso molecular, que presenta menor estabilidad y una diferente funcionalidad frente a la capacidad de estimular la unión de aminoacil-tRNA al ribosoma. Estas formas múltiples del factor de elongación se discuten en el trabajo de Tarragó et al (96), donde se postula que sólo la forma liviana del factor de elongación es capaz de formar un complejo ternario con GTP y aminoacil-tRNA y catalizar la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas liberándose el factor EF1 unido a GDP.

En el esquema siguiente se proponen las interacciones de EF1



Según este esquema,  $EF1_H$  interactúa con GTP y con GDP formando un complejo binario ( $EF1_H : GTP$ ) o ( $EF1_H : GDP$ ).

$EF1_H$  unido a GDP se transforma en  $EF1_L$  en forma relativamente rápida ya que basta efectuar el análisis de la transformación por filtración en gel (lo que demora aproximadamente una hora) para que se observe la desaparición de la forma pesada de EF1 (96).



En cambio cuando  $EF1_H$  une GTP, el complejo formado se convierte en  $EF1_L$  en forma lenta y no es posible detectar la forma liviana por filtración en gel; si este complejo ( $EF1_H : GTP$ ) se analiza por centrifugación en gradiente de concentración de sacarosa (que demora aproximadamente 16 a 18 horas) se detecta la desaparición total de la forma pesada de  $EF1$ .

Es posible que la formación de los complejos ( $EF1_H : GDP$ ) y ( $EF1_L : GDP$ ) a partir de  $EF1_H$  no sea funcional y se efectúe in vitro sólo debido a la gran afinidad de  $EF1$  por  $GDP$ . De hecho,  $EF1_L$  unido a  $GDP$  no tiene afinidad por el aminoacil-tRNA por lo que este complejo sería abortivo para la síntesis proteica. Es más probable pensar que se libera en el ribosoma después de la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, como ocurre en E. coli.

En cambio  $EF1_L$  unido a  $GTP$  tiene afinidad por el aminoacil-tRNA con el que forma el complejo ternario ( $EF1_L : GTP : aa-tRNA$ ). La formación de complejo ternario con  $EF1_H$  aislado es mucho menor que con  $EF1_L$ , posiblemente debido a la disociación de  $EF1_H$  por el  $GTP$ . Este complejo es el responsable de la unión del aminoacil-tRNA al (ribosoma: mRNA), etapa en la que probablemente se libera fosfato inorgánico como consecuencia de la hidrólisis del  $GTP$ .

Sin embargo, la liberación de  $EF1_L$  unido a GDP que se debe efectuar como consecuencia de la entrada del aminoacil-tRNA al ribosoma, no se ha detectado en eucariontes. Tampoco se ha podido determinar si ocurre una fosforilación del GDP unido a  $EF1_L$  para dar el complejo ( $EF1_L : GTP$ ), de lo que se puede concluir que es más probable que se cierre el ciclo regenerándose la especie pesada de EF1 cada vez. El hecho de que  $EF1_H$  sea más activo que  $EF1_L$  para estimular la síntesis proteica (Figura 37) es un indicio más de que posiblemente el ciclo se cierre a través de la formación de  $EF1_H$ .

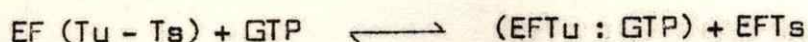
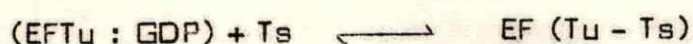
La especificidad en cuanto a la conversión del factor de elongación por medio de nucleótidos es bastante alta ya que es indispensable la presencia de una guanosina con dos fosfatos en la posición 5' de la ribosa para provocar su transformación; es así como GTP, GDP, ppGpp, transforman  $EF1_H$  en la fracción de menor peso molecular; nucleótidos como GMP o ATP son incapaces de producir la conversión (ver Figuras 15 y 16).

Al encontrar estas dos formas de EF1 de distinto peso molecular, pensamos en la posibilidad de que  $EF1_H$  fuera un complejo proteico semejante al complejo (EFTu - Ts) existente en E. coli ya que ambos son complejos proteicos de alto peso molecular que en presencia de GTP se transforman y originan los complejos binarios ( $EF1_L : GTP$ ) y (EFTu : GTP)



respectivamente.

Como se discutió en la Introducción, el factor EFTs de E. coli que tiene una actividad catalítica que promueve la liberación de EFTu del complejo binario (EFTu : GDP) para que EFTu pueda volver a interactuar con GTP y comenzarse así un nuevo ciclo:



Para estudiar si era posible que  $EF1_H$  tuviera una actividad semejante a EFTs se intentó ver si  $EF1_H$  contenía una actividad más catalítica respecto a  $EF1_L$  en la reacción de unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas como sucede con  $EF(Tu - Ts)$  de E. coli. En los numerosos intentos realizados, no fue posible detectar esta actividad. Sin embargo, hay un hecho importante. Como se puede observar en la Figura 21,  $EF1_L$  tiene mayor capacidad que  $EF1_H$  para formar el complejo ternario, debido probablemente a una mayor afinidad de la forma liviana de EF1 con el aminoacil-tRNA. En cambio, a pesar de este dato,  $EF1_H$  tiene mayor capacidad que  $EF1_L$  para estimular la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas (Figura 38). Este hecho pareciera indicar que en la fracción pesada existe una actividad distinta, tal vez semejante al factor EFTs de E. coli que activa de algún modo la reacción de unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas.



En eucariontes se han realizado numerosos estudios con la idea de encontrar un factor de elongación semejante a EFTs de E. coli, pero no ha sido posible aislar dicha actividad. Sólo en un trabajo de Kaziro (112) realizado en hígado de cerdo se presenta una evidencia de la existencia de una fracción que estimula la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas, catalizada por EF1. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en otros sistemas de eucariontes.

En esta tesis se hizo un estudio en que se calcularon las constantes de disociación de los complejos (EF1 : GTP) y (EF1 : GDP) como un posible medio de dilucidar si es necesaria realmente la existencia de un factor para disociar el complejo (EF1 : GDP) y liberar EF1.

Como se puede observar en la Tabla VIII, la afinidad de EF1 por GDP es sólo 4 veces mayor que por GTP, a diferencia de lo que ocurre en E. coli en que la afinidad de EFTu por GDP es sobre 20 veces mayor que por GTP. El hecho de que haya poca diferencia entre las afinidades de GTP y GDP por EF1 sugiere la idea de que en células eucarióticas no sea necesaria la presencia de un factor proteico que estimule la disociación del complejo (EF1 : GDP).

Legocki (97) propone que  $EF1_H$  de trigo es un tetrámero de peso molecular 250.000 en que la forma más estable sería el trímero de peso

molecular 180.000, lo que hace pensar que en la fracción pesada de EF1 de germen de trigo no habría otra actividad acompañando a EF1<sub>H</sub>.

Por otro lado, es bastante factible pensar que EF1<sub>L</sub> podría ser equivalente al factor EFTu de E. coli ya que ambos unen GTP y GDP y a la vez forman un complejo ternario con aminoacil-tRNA en que hay una relación estequiométrica de 1:1 entre GTP y el aminoacil-tRNA (ver Figura 19).

A pesar del esfuerzo realizado para reconstituir in vitro el complejo enzimático EF1<sub>H</sub> a partir de la fracción liviana EF1<sub>L</sub>, no fue posible obtener resultados positivos en este sentido. Aparentemente, la conversión va acompañada de la liberación de un compuesto de bajo peso molecular ya que la disociación de la forma pesada aislada (libre de la especie liviana) no es completa cuando se efectúa en las mismas condiciones que la disociación de EF1<sub>H</sub> a partir de una preparación cruda de factores de elongación. La existencia de fosfolípidos en el factor de elongación I de cerebro de ternera (139) sugiere la idea de que EF1<sub>H</sub> sea un complejo lipoproteico de alto peso molecular en que los lípidos podrían interactuar con las distintas subunidades de menor peso molecular. Sin embargo, los resultados de tratamiento de EF1 con fosfolipasas en que se observa una inactivación sólo de la especie liviana de EF1 (Figuras 7 y 8) es posible que los lípidos tengan relación con el sitio activo



además de la mantención de una estructura polimérica.

### Interacción con GTP

En el esquema II se observa la estructura de algunos análogos del GTP.

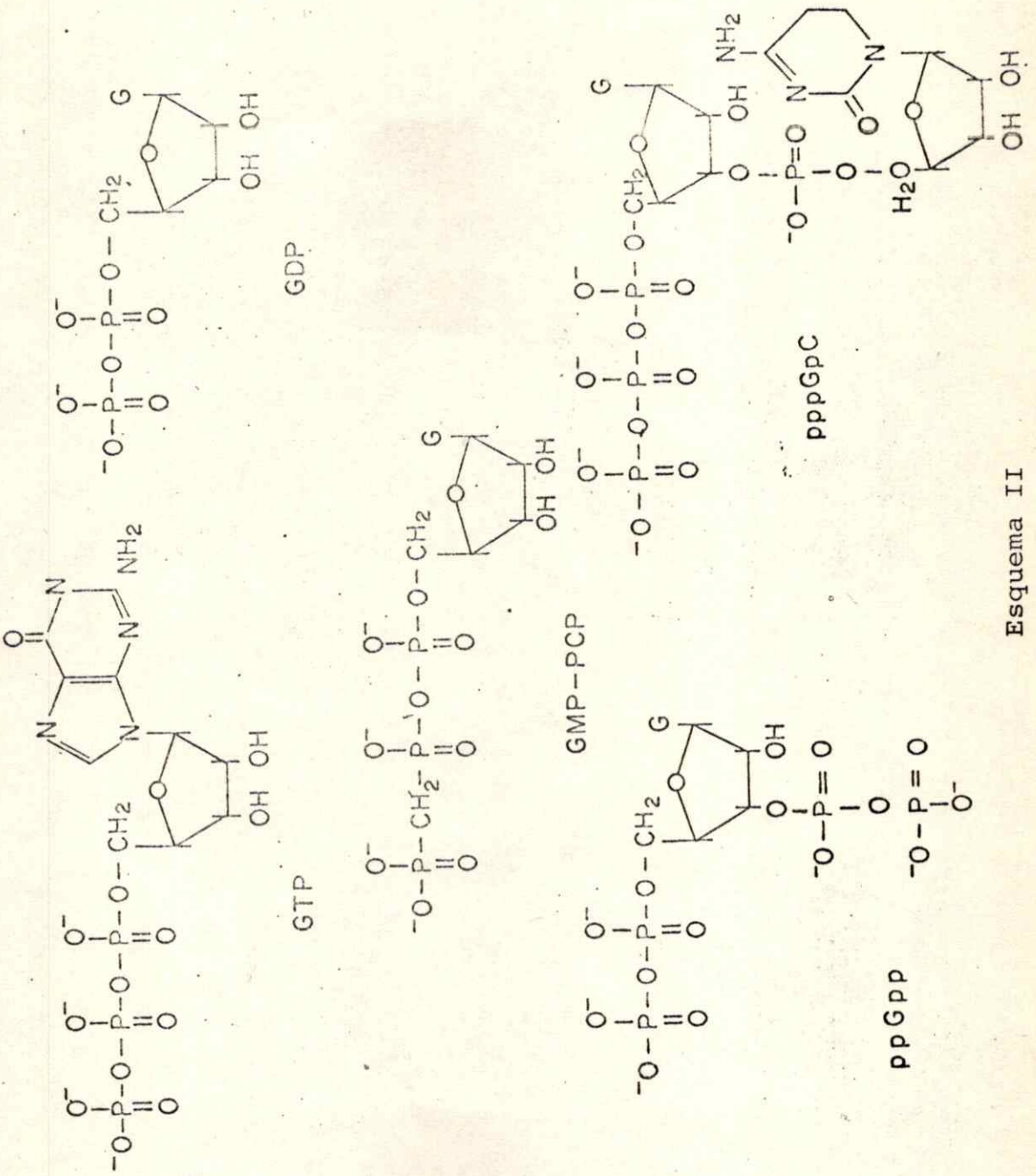
La interacción de EF1 con GTP es muy específica en lo que respecta a la base ya que no interactúa con nucleótidos que contengan adenina ni ninguna otra base. Sin embargo, no se sabe si una modificación en la guanina altera la especificidad de la interacción de EF1 por GTP. Como hemos visto que EF1 interactúa con algunos RNA virales que se aminoacilan en su extremo terminal 3' (Figura 29) y a la vez, que el extremo 5' de algunos RNA virales contienen una guanina metilada en una secuencia  ${}^7\text{mG (5')} \text{ppp(5')} \text{G}^{\text{m}} \text{p} \dots$  (140-142), sería interesante estudiar la interacción de EF1 con compuestos análogos a este extremo del RNA en que la guanina tuviera una modificación en su estructura.

Si EF1 interactúa con el extremo 3' de un RNA esterificado con un aminoácido (Figuras 29 y 30) y si a la vez pudiera interactuar con el extremo 5' del RNA se produciría una circularización del RNA mediada por EF1 (143).

La unión de EF1 al aminoacil-RNA en su extremo 3' o al RNA en su extremo 5' podría tener como función estimular de algún modo la traducción del virus a partir de su extremo 5' o atraer el RNA a los



Estructura de algunos análogos de GTP



Esquema II

ribosomas por una analogía del terminal 3' del RNA aminoacilado con el aminoacil-tRNA.

La especificidad del factor de elongación requiere que la posición 5' del nucleótido tenga al menos un enlace pirofosfato para interactuar con él. De hecho, EF1 interactúa con gran afinidad con GTP, GDP, GMP-PCP, ppGpp, pppGpC, pero no con GMP; aparentemente con todos estos análogos forma un complejo binario bastante estable.

Es importante notar el hecho de que la unión del aminoacil-tRNA a EF1 requiere la interacción previa del factor con GTP; es decir que GTP modifica de algún modo la molécula para permitir la formación del complejo ternario. Sin embargo, la unión de nucleósidos 5' difosfatos no es capaz de producir esta modificación en EF1.

Es decir, el complejo ternario requiere la presencia de un nucleósido trifosfato, pero sin que haya necesariamente una hidrólisis con liberación de Pi ya que también es posible formarlo con el análogo GMP-PCP que por tener un grupo metilén entre los fosfatos y , no puede hidrolizarse.

La interacción del complejo ternario con el ribosoma tampoco requiere de la hidrólisis del GTP ya que en presencia del GMP-PCP es factible catalizar la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma. Sin embargo, la formación del enlace peptídico, con intervención de la peptidil



transferasa requiere la hidrólisis del GTP y no es posible sustituirlo por ningún análogo.

La presencia de un sustituyente en la posición 3' de la ribosa del GTP no modifica la interacción de EF1 con el GTP. De ahí que el dinucleótido pppGpC pueda estimular la síntesis proteica sin que haya hidrólisis y liberación del sustituyente en 3'.

Esta interacción de EF1 con dinucleótidos podría sugerir la posibilidad de que EF1 interactuara con el extremo 5' terminal de algunos RNA.

En la Tabla XVII se muestra un resumen de la interacción de EF1 con análogos del GTP y de la funcionalidad de estos análogos en las distintas etapas de la elongación de la síntesis proteica.

#### Interacción con aminoacil-tRNA

Todos los tRNA aminoacilados interactúan con el factor de elongación sólo después que GTP se ha unido a él. Sin embargo, la molécula de tRNA que actúa como iniciador de la síntesis proteica, el metionil-tRNA, forma un complejo muy inestable con EF1 y GTP que es aislable sólo si se emplean métodos rápidos como filtración en Sephadex G-50 o detección del complejo ternario por filtración en filtros de nitrocelulosa (130).



TABLA XVII

NUCLEOTIDO	Interacción de EFI con análogos de GTP.			Síntesis de un polipéptido
	Interacción con EFI	Disociación de EFI	Interacción con aminoacil-tRNA a ribosomas	
GMP	-	-	-	-
GDP	+	+	-	-
GTP	+	+	+	+
GMP-PCP	+	nm	nm	-
ppGpp	+	+	-	-
GpC*	-	nm	nm	-
pGpC	-	nm	nm	-
ppGpC	+	nm	nm	-
pppGpC	+	nm	nm	+

nm : no medido

\* Algunos resultados obtenidos con dinucleótidos fueron tomados del trabajo de Allende y colaboradores (124).

Es probable que el factor de elongación reconozca una secuencia o una estructura del tRNA común en todos ellos. Como se sabe que la característica de las moléculas de tRNA iniciadoras de la síntesis proteica en eucariontes es que no tienen la secuencia TYCG común para todos los demás tRNA (144) se pensó que EF1 podría reconocer esta secuencia a pesar de que se ha demostrado que esta secuencia podría tener relación con la interacción del tRNA con el ribosoma (145). El hecho de que EF1 se una al met-tRNA<sub>f</sub> iniciador de E. coli (Figura 26) que tiene la secuencia TYCG (146) sugiere la idea de que realmente la interacción de EF1 con el aa-tRNA podría tener relación con dicha secuencia.

La presencia del aminoácido esterificando al tRNA es clave para la interacción con EF1 y GTP. El tRNA desacilado no interactúa con el factor de elongación. Es importante, además, que el aminoácido tenga su grupo amino libre ya que el N-acetil-aminoacil-tRNA no interactúa. Incluso no se detectó interacción de EF1 con el aminoacil-RNA viral que tenía su grupo amino acetilado (Figura 32).

Los estudios de los factores de elongación han llegado a un nivel en que es necesario comenzar un enfoque más estructural, por ejemplo, efectuando estudios de la molécula por difracción de rayos X. Para ello es necesario efectuar una purificación previa total y encontrar la forma de mantenerlo estable. Así se podrían analizar las interacciones



del factor con GTP y su disociación en moléculas de menor tamaño molecular, las interacciones con el aminoacil-tRNA y con el ribosoma. La etapa funcional del estudio, es decir, el mecanismo por el cual EF1 participa en la síntesis proteica ya ha avanzado bastante como para no detenerse en un estudio a nivel más estructural.

Sin embargo, se debe también comenzar a hacer énfasis en el posible rol regulatorio de los factores de elongación en la síntesis proteica. Se ha medido recientemente la cantidad de EFTu de E. coli presente en el citoplasma y se ha determinado que un 6 % de las proteínas del sobrenadante son EFTu (147). La razón EFTu:ribosoma es 14:1 en células en crecimiento rápido lo que demuestra la enorme importancia que puede tener el factor de elongación Tu en la regulación de la síntesis proteica. Como, además, la cantidad de tRNA que hay en la célula es semejante a la cantidad de EFTu se puede pensar que el tRNA estaría siempre con capacidad para interactuar con EFTu. El hecho de que siempre haya EFTu para poder unir todo el tRNA de la célula permite a la vez una protección del aminoacil-tRNA y una regulación de la entrega del aminoacil-tRNA a los ribosomas. Además, la formación del complejo ternario (EFTu : GTP : aa-tRNA) permitiría un desplazamiento del equilibrio de la reacción de activación del aminoácido.



La actividad de EF1 aparentemente es de vital importancia para el desarrollo de la célula. Roberts y Osborne (148), trabajando en embriones de cebada, observaron que conjuntamente con el envejecimiento de los embriones y, por lo tanto, con la pérdida de viabilidad de los mismos, había un decaimiento de la síntesis proteica debido a una inactivación de los factores de transferencia, especialmente del factor de elongación 1; en estas condiciones, el factor de elongación 2 pierde su actividad en mucho menor proporción que EF1.

Es importante notar, además, que el hecho de que exista una diferente afinidad del factor de elongación por los diferentes aminoacil-tRNA, y posiblemente, una diferente estabilidad de los complejos ternarios (Figura 28), podría regular también la velocidad de entrada de los aminoácidos en la cadena peptídica.

Para efectuar los estudios de la importancia de los factores de elongación en la regulación de la síntesis proteica, es necesario comenzar a estudiar la regulación de la propia síntesis de los factores de elongación y para ello, obtener mutantes de ellos. De hecho, ya se han publicado estudios en que se aislan mutantes de EF-G (149), de EFTs (150) y de EFTu (151) de E. coli.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bergmann, M., *Adv. Enzymol.* 2, 49 (1942)
2. Lipmann, F., *Adv. Enzymol.* 1, 99 (1941)
3. Kalckar, H.M., *Chem. Rev.* 28, 71 (1941)
4. Sanger, F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 14, 153 (1950)
5. Fruton, J.S., Johnston, R.B. y Fried, M., *J. Biol. Chem.* 190, 39 (1951)
6. Frantz, J.D.Jr., Loftfield, R.B. y Miller, W.W., *Science* 106, 544 (1947)
7. Siekevitz, P. y Zamecnik, P.C., *Fed. Proc.* 10, 246 (1951)
8. Siekevitz, P., *J. Biol. Chem.* 195, 549 (1952)
9. Keller, E.B., Zamecnik, P.C. y Loftfield, R.B., *J. Histochem. Cytochem.* 2, 378 (1954)
10. Littlefield, J.W., Keller, E.B., Gross, J. y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.* 217, 111 (1955)
11. Littlefield, J.W. y Keller, E.B., *J. Biol. Chem.* 224, 13 (1957)
12. Hoagland, M.B., *Biochim. Biophys. Acta* 16, 288 (1955)
13. Hoagland, M.B., Keller, E.B. y Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.* 218, 345 (1956)
14. De Moss, J.A., Genuth, S.M. y Novelli, G.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 42, 325 (1956)
15. Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. y Stephenson, M.L., *Biochim. Biophys. Acta* 24, 215 (1957)
16. Ogata, K. y Nohara, M., *Biochim. Biophys. Acta* 25, 660 (1957)



17. Berg, P., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44, 78 (1958)
18. Watson, J.D. y Crick, F.H.C., Nature 171, 737 (1953)
19. Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarthy, M.J., J. Exp. Med. 79, 137 (1944)
20. Beadle, G.W. y Tatum, E.L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 27, 499 (1941)
21. Gierer, A. y Schramm, G., Nature 177, 702 (1956)
22. Fraenkel-Conrat, H., J. Am. Chem. Soc. 78, 882 (1956)
23. Moore, S. en Symposium on Protein Structure (Neuberger, A., ed.) John Wiley and Sons, Inc. N.Y. (1958)
24. Anfinsen, C.B. en Symposium on Protein Structure (Neuberger, A. ed.) John Wiley and Sons, Inc. N.Y. (1958)
25. Dintzis, H.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 247 (1961)
26. Keller, E.B. y Zamecnik, P.C., J. Biol. Chem. 221, 45 (1956)
27. Brenner, S., Jacob, F. y Meselson, M., Nature 190, 576 (1961)
28. Gross, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C.G., Riseborough, R.W. y Watson, J.D., Nature 190, 581 (1961)
29. Crick, F.H.C., Sci. Am. 207, 66 (1962)
30. Nirenberg, M.W. y Matthaei, J.H., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 1588 (1961)
31. Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L., Scott, J.F. y Hoagland, M.B., Fed. Proc. 16, 275 (1957)
32. von Ehrenstein, G. y Lipmann, F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 941 (1961)
33. Hülsman, W.C. y Lipmann, F., Biochim. Biophys. Acta 43, 123 (1960)



34. Nathans, D. y Lipmann, F., *Biochim. Biophys. Acta* 43, 126 (1960)
35. Grossi, L.G. y Moldave, K., *J. Biol. Chem.* 235, 2370 (1960)
36. Arlinghaus, R., Favelukes, G. y Schweet, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 92 (1963)
37. Schweet, R., Arlinghaus, R., Shaeffer, J. y Williamson, A., *Medicine* 43, 731 (1964)
38. Conway, T. y Lipmann, F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52, 1462 (1964)
39. Arlinghaus, R., Shaeffer, J. y Schweet, R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51, 1291 (1964)
40. Bishop, J. y Schweet, R., *Biochim. Biophys. Acta* 54, 617 (1961)
41. Nathans, D., Allende, J.E., Conway, T.W., Spyrides, G.J. y Lipmann, F. en "Informational Macromolecules" (Vogel, H., Bryson, H. y Lampen, J.D., eds.) Academic Press, N.Y., pág.349 (1963)
42. Nakamoto, T., Conway, T.W., Allende, J.E., Spyrides, G.J. y Lipmann, F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 227 (1963)
43. Allende, J.E., Monro, R. y Lipmann, F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51, 1211 (1964)
44. Fessenden, J.M. y Moldave, K., *J. Biol. Chem.* 238, 1479 (1963)
45. Slapikoff, S., Fessenden, J.M. y Moldave, K., *J. Biol. Chem.* 238, 3670 (1963)
46. Moldave, K., *Adv. Chem.* 44, 41 (1964)
47. Gasior, E. y Moldave, K., *Biochim. Biophys. Acta* 95, 679 (1965)
48. Gasior, E. y Moldave, K., *J. Biol. Chem.* 240, 3346 (1965)
49. Lucas-Lenard, J. y Lipmann, F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 55, 1562 (1966)

50. Nishizuka, Y. y Lipmann, F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55, 212 (1966)
51. Ertel, R., Redfield, B., Brot, N. y Weissbach, H., Arch. Biochem. Biophys. 128, 331 (1968)
52. Skoultchi, A., Ono, Y., Moon, H.M. y Lengyel, P., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60, 675 (1968)
53. Ayuso, M.S. y Heredia, C.F., Eur. J. Biochem. 7, 111 (1968)
54. Richter, R. y Klink, F., Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters 2, 49 (1968)
55. Kaziro, Y. e Inoue, N., J. Biochem. 64, 423 (1968)
56. Parmeggiani, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 613 (1968)
57. Cannon, M., Krug, R. y Gilbert, W., J. Mol. Biol. 7, 360 (1963)
58. Conway, T.W., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 1216 (1964)
59. Spyrides, G.J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 1220 (1964)
60. Nirenberg, M. y Leder, P., Science 145, 1399 (1964)
61. Lucas-Lenard, J. y Haenni, A.L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 559 (1968)
62. Ravel, J.M., Shorey, R.L., Shive, W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 9 (1968)
63. Skoultchi, A., Ono, Y., Waterson, J. y Lengyel, P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 437 (1969)
64. Cooper, D., Gordon, J., Biochemistry 8, 4289 (1969)
65. Gordon, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58, 1574 (1967)
66. Ravel, J.M., Shorey, R.L., Shive, W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 68 (1967)



67. Gordon, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 179 (1968)
68. Lucas-Lenard, J., Tao, P. y Haenni, A.L., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 455 (1969)
69. Haenni, A.L., Lucas-Lenard, J. y Gordon, J., Fed. Proc. 27, 397 (1968)
70. Skoultchi, A., Ono, Y., Waterson, J. y Lengyel, P., Biochemistry 9, 508 (1970)
71. Miller, D.L. y Weissbach, H., Arch. Biochem. Biophys. 141, 26 (1970)
72. Miller, D.L. y Weissbach, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1016 (1970)
73. Waterson, J., Beaud, G. y Lengyel, P., Nature 227, 34 (1970)
74. Ono, Y., Skoultchi, A., Klein, A. y Lengyel, P., Nature 220, 1304 (1968)
75. Jerez, C., Sandoval, A., Allende, J.E., Henes, C., Ofengand, J., Biochemistry 8, 3006 (1969)
76. Ochoa, S. y Mazumder, R. en "The Enzymes", (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York, London, vol. 10, pág. 1 (1974)
77. Lucas-Lenard, J. y Beres, L. en "The Enzymes", (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York, London, vol. 10, pág. 53 (1974)
78. Miller, D.L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 752 (1972)
79. Cabrer, B., Vázquez, D. y Modolell, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 733 (1972)
80. Richman, N. y Bodley, J.W., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 686 (1972)
81. Richter, D., J. Biol. Chem. 248, 2853 (1973)



82. Tate, W.P. y Caskey, C.T., en "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York, London, vol. 10, pág. 87 (1974)
83. Blumenthal, T., Landers, T.A. y Weber, K., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 1313 (1972)
84. Cory, S., Spahr, P.F. y Adam, J.M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 1 (1970)
85. Travers, A. y Buckland, R., Nature, NB 243, 257 (1973)
86. Travers, A., Nature 244, 15 (1973)
87. Haseltine, W.A., Nature 235, 329 (1972)
88. Moon, H.M. y Weissbach, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 254 (1972)
89. Schneir, M. y Moldave, K., Biochim. Biophys. Acta 166, 58 (1968)
90. Collins, J.M., Moon, H.M. y Maxwell, E.S., Biochemistry 11, 4187 (1972)
91. McKeehan, W.L. y Hardesty, B., J. Biol. Chem. 244, 4330 (1969)
92. Richter, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 864 (1970)
93. Allende, J.E. en "Techniques in Protein Biosynthesis" (Campbell, P.N. y Sargent, J.R., eds.) Academic Press, London y New York, vol. 2, pág. 55 (1969)
94. Allende, J.E., Tarragó, A., Monasterio, O., Litvak, S., Gatica, M., Djeda, J. y Matamala, M., Biochem. Soc. Symp. 38, 77 (1973)
95. Allende, J.E., Tarragó, A., Monasterio, O., Gatica, M., Djeda, J. y Matamala, M. en "Gene Expression and its Regulation" (Kenney F.T., Hamkalo, B., Favelukes, G. y August, J.T., eds.) vol. 1, pág. 411 (1973)
96. Tarragó, A., Allende, J.E., Redfield, B. y Weissbach, H., Arch. Biochem. Biophys. 159, 353 (1973)

97. Golinska, B. y Legocki, A., *Biochim. Biophys. Acta* 324, 156 (1973)
98. Legocki, A.B. y Marcus, A., *J. Biol. Chem.* 245, 2814 (1970)
99. Moon, H.M., Redfield, B. y Weissbach, H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 69, 1249 (1972)
100. Ravel, J.M., Dawkins, R.C.Jr., Lax, S., Odom, O.W. y Hardesty, B., *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 332 (1973)
101. Johnston, F.B. y Stern, H., *Nature* 179, 160 (1957)
102. Allende, J.E., Seeds, N.W., Conway, T.W. y Weissbach, H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 58, 1566 (1967)
103. Rouser, G., Bauman, A.J., Kritchevsky, G., Heller, D. y O'Brien, J.S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38, 544 (1961)
104. Gillam, J., Milward, S., Blaw, D., von Tigerstrom, M., Wimmer, E. y Tener, G.M., *Biochemistry* 6, 3043 (1967)
105. Bray, G.A., *Anal. Biochem.* 1, 279 (1960)
106. Dickerman, H. y Weissbach, H. en "Methods in Enzymology" (Grossman, L. y Moldave, K., eds.) vol. XII, parte B, pág. 681. Academic Press, New York y London (1969)
107. Yot, P., Pinck, M., Haenni, A.L., Durantou, H.M. y Chapeville, F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 67, 1345 (1970)
108. Haenni, A.L. y Chapeville, F., *Biochim. Biophys. Acta* 114, 153 (1966)
109. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
110. Moon, H.M., Redfield, B., Millard, S., Vane, F. y Weissbach, H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 70, 3282 (1973)
111. Hanahan, D.J. en "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York y London, vol. 5, pág. 71 (1972)



112. Iwasaki, K., Mizumoto, K., Tanaka, M. y Kaziro, Y., J. Biochem. 74, 849 (1973)
113. Cashel, M. y Gallant, J., Nature 221, 838 (1969)
114. Cashel, M. y Kabacher, B., J. Biol. Chem. 245, 2309 (1970)
115. Cashel, M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 407 (1970)
116. Haseltine, W.A. y Block, R., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 1564 (1973)
117. Haseltine, W.A., Block, R., Gilbert, W. y Weber, K., Nature 238, 381 (1972)
118. Cashel, M., J. Biol. Chem. 244, 3133 (1969)
119. Klein, C., Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters 38, 149 (1974)
120. Manzocchi, L., Tarragó, A. y Allende, J.E., Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters 29, 309 (1973)
121. Gilham, P.T., Ann. Rev. Biochem. 39, 227 (1970)
122. Verbert, A.P., Sergeant, A. y Krsmanovic, V., Biochimie 56, 1103 (1974)
123. Zimmern, D., Nucleic Acid Res. 2, 1189 (1975)
124. Allende, J.E., Allende, C.C., Simoncsits, A. y Tomasz, J., J. Biol. Chem. 250, 2056 (1975)
125. Allende, C.C., Chaimovich, H., Gatica, M. y Allende, J.E., J. Biol. Chem. 245, 93 (1970)
126. Clark, B.F.C. y Marcker, F.A., J. Mol. Biol. 17, 394 (1966)
127. Tarragó, A., Monasterio, O. y Allende, J.E., Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 765



128. Lockwood, A.H., Chakraborty, P.R. y Maitra, U., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 3122 (1971)
129. Richter, D. y Lipmann, F., Nature 227, 1212 (1970)
130. Richter, D., Lipmann, F., Terragó, A. y Allende, J.E., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1805 (1971)
131. Ravel, J.M., Shorey, R.L., Froehner, S. y Shive, W., Arch Biochem. Biophys. 125, 514 (1968)
132. Thach, R.E., Sundararajan, T.A., Dewey, K.F., Brown, J.C. y Doty, P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 85 (1966)
133. Pinck, M., Yot, P., Chapeville, F. y Duranton, H.M., Nature 226, 954 (1970)
134. Litvak, S., Carré, D.S. y Chapeville, F., Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters 11, 316 (1970)
135. Oberg, B. y Philipson, L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 927 (1972)
136. Carriquiry, E. y Litvak, S., Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters 38, 287 (1974)
137. Chen, J.M. y Hall, T.C., Biochemistry 12, 4570 (1973)
138. Bodley, J.W., Lin, L., Salas, M. y Tao, M., Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters 11, 153 (1970)
139. Legocki, A.B., Redfield, B., Liu, C.K. y Weissbach, H., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 2179 (1974)
140. Furuichi, Y., Morgan, M., Muthukrishnan, S. y Shatkin, A.J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 742 (1975)
141. Lavi, S. y Shatkin, A.J., Fed. Proc. 34, 708 (1975)
142. Wei, C.M. y Moss, B., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 318 (1975)

143. Litvak, S., Tarragó, A., Tarragó-Litvak, L. y Allende, J.E.,  
Nature 241, 88 (1973)
144. Simsek, M., RajBhandary, U.L., Boisnard, M. y Petrisant, G.,  
Nature 247, 518 (1974)
145. Ofengand, J. y Henes, C., J. Biol. Chem. 244, 6241 (1969)
146. Dube, S.K. y Marcker, K.A., European J. Biochem. 8, 256  
(1969)
147. Furano, A.V., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 4780 (1975)
148. Roberts, B.E. y Osborne, D., Biochem. J. 135, 405 (1973)
149. Tocchini-Valentini, G.P., Felicetti, L. y Rinaldi, G.M., Cold  
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 463 (1969)
150. Kuwano, M., Ono, M., Yamamoto, M., Endo, H., Kamiya, T. y  
Hori, K., Nature 244, 107 (1973)
151. Lupker, J.H., Verschoor, G.J., de Rooij, F.W.M., Rörsch, A.  
y Bosch, L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 460 (1974)
152. Andrews, P., Biochem. J. 91, 222 (1964)
153. Racker, E. en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. y Kaplan,  
N.O., eds.). Academic Press Inc., New York, vol 1, pág. 500  
(1955).