

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL FACTOR
DE INICIACION 2 (eIF₂) DE LA SINTESIS
PROTEICA DE OVARIO DE
Xenopus laevis

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

FACULTAD DE CIENCIAS

por

María del Pilar Carvallo de Saint-Quentin

Marzo de 1987

Profesor patrocinante: Dr. Jorge E. Allende



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

María del Pilar Carvallo de Saint-Quentin

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de **Doctor en Ciencias con mención en Biología**, en el exámen de defensa de Tesis rendido el día 24 de marzo de 1987.

Patrocinante de la Tesis:

Dr. Jorge E. Allende

Jorge E. Allende

Comisión Informante de la Tesis:

Dr. Sergio Bazaes

Sergio Bazaes

Dr. Luis Izquierdo

Luis Izquierdo

Dr. Octavio Monasterio

Octavio Monasterio

Dr. Eugenio Spencer

Eugenio Spencer

Esta Tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy sinceramente a todas aquellas personas que no dudaron en brindarme su apoyo y su ayuda durante la realización de esta Tesis.

En forma muy especial:

Al Dr. Jorge Allende y a la Dra. Catherine Connelly, de quienes recibí gran parte de mi formación científica, con una excelente guía, mucha preocupación y cariño, durante los diez años de estadía en su laboratorio.

Al Dr. Severo Ochoa por su gentil invitación para trabajar en su laboratorio en el cual inicié el trabajo de esta Tesis.

Al Dr. José Manuel Sierra y a Mauricio García Mateu, por su valioso aporte intelectual.

A Juan Olate por la amistad de siempre y su constante estímulo, tanto en lo científico como en lo personal.

A Loreto Holuigue por su amistad y su espíritu colaborador, que resultaron muy valiosos en la etapa final de esta Tesis.

A todos mis Amigos del laboratorio y del Departamento de Bioquímica, quienes me entregaron su apoyo y su colaboración cada vez que fue necesario.

A Marcelo Antonelli, Oriana Salazar, Luisa Herrera, Jorge Acuña, Hernán Carreño, Doris Chamorro y Juan Venegas, por su cariño, su alegría y su espíritu de compañerismo, que han hecho de nuestro Departamento un lugar especial.

A José Mondaca, muy sinceramente, por su buena disposición en la rápida y excelente confección de las figuras de esta Tesis.

A los Dres. Octavio Monasterio, Eugenio Spencer, Luis Izquierdo y Sergio Bazaes por su gentil colaboración en la corrección de esta Tesis.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xviii
INTRODUCCION.....	1
I. LA MADURACION MEIOTICA EN OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u> ...	3
A. Papel de los nucleótidos cíclicos en la maduración meiótica de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	3
B. Fosforilación y desfosforilación de proteínas durante la maduración meiótica.....	6
C. Síntesis de proteínas en el oocito durante la oogénesis y la maduración meiótica.....	8
II REGULACION DE LA SINTESIS PROTEICA EN CELULAS EUCARIOTICAS.....	11
A Regulación de la síntesis proteica en reticulocitos de conejo.....	13
1. Características del factor eIF ₂ purificado de reticulocitos y de otros sistemas.....	13
2. Intercambio de nucleótidos durante la iniciación de la síntesis proteica.....	17
3. Fosforilación del factor eIF ₂	20
III. INTERCAMBIO DE NUCLEOTIDOS DE GUANINA EN LA REGULACION DE PROCESOS BIOLOGICOS EN QUE PARTICIPAN PROTEINAS G.....	25
IV. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	30
MATERIALES Y METODOS.....	32
A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	32
B. SINTESIS Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS RADIATIVOS...	35
1. Síntesis de [γ - ³² P] ATP.....	35

2.	Síntesis de [α - ³² P] GTP.....	37
3.	Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos.....	38
4.	Purificación de nucleótidos radiactivos.....	39
5.	Purificación de GTP.....	40
6.	Síntesis de oGDP, oGTP y oATP.....	41
C.	AMINOACILACION DEL [³ H]-METIONIL tRNA _i	42
1.	Purificación parcial de aminoacil-tRNA-sintetasas.....	42
2.	Ensayo de actividad para la metionil-tRNA-sintetasa.....	43
3.	Preparación del [³ H]-metionil-tRNA.....	44
D.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE INICIACION eIF ₂	45
1.	Formación de complejo ternario.....	45
2.	Formación de complejo binario.....	46
3.	Intercambio de nucleótidos.....	47
E.	ENSAYO DE FOSFORILACION DE PROTEINAS.....	48
F.	INACTIVACION DE PROTEINAS QUINASAS POR oATP.....	48
G.	SEPARACION DE LIGANDO LIBRE DE LIGANDO UNIDO A PROTEINA.....	49
E.	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	50
1.	Geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS.....	50
2.	Geles en gradiente vertical de poliacrilamida, para la determinación de peso molecular nativo.....	51
3.	Tinción de geles por azul de Coomassie.....	52
4.	Autorradiografías.....	53
I.	MICROINYECCION DE OOCITOS.....	53
1.	Obtención y separación de oocitos de estado VI.....	53
2.	Microinyección de oocitos.....	54
J.	SINTESIS PROTEICA in vivo.....	55
K.	PURIFICACION DE eIF ₂ DE OVARIO DE <u>Xenopus laevis</u>	55
1.	Preparación de los extractos crudos.....	55

2.	Cromatografía en DEAE-celulosa.....	57
3.	Cromatografía en fosfocelulosa.....	58
4.	Cromatografía en heparina-sefarosa.....	59
5.	Cromatografía en carboximetil-Sephadex.....	59
6.	Centrifugación en gradiente de glicerol.....	60
1.	DETERMINACION DE PROTEINAS.....	61
RESULTADOS.....		62
I.	PURIFICACION DEL FACTOR eIF ₂ DE OVARIO DE <u>Xenopus</u> <u>laevis</u>	62
A.	Método de purificación A.....	62
1.	Preparación del extracto crudo.....	62
2.	Cromatografía en DEAE-celulosa.....	65
3.	Cromatografía en fosfocelulosa.....	69
4.	Cromatografía en heparina-sefarosa.....	70
5.	Gradiente de glicerol.....	70
6.	Determinación del peso molecular aproximado del factor eIF ₂ por velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol.....	73
7.	Gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación A.....	75
B.	Método de purificación B.	
1.	Preparación de los extractos crudos.....	77
2.	Cromatografía en carboximetil-Sephadex.....	77
3.	Cromatografía en heparina-sefarosa.....	78
4.	Cromatografía en DEAE-celulosa.....	80
5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de la fracción DE-120.....	81
6.	Determinación del peso molecular nativo de eIF ₂ purificado por el método B.....	85

II. ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL FACTOR eIF ₂ PURIFICADO DE OVARIO DE <u>Xenopus laevis</u>	91
A. Fosforilación de las subunidades α y β de eIF ₂ obtenido por los dos métodos de purificación.....	91
B. Requerimientos de la reacción de formación del complejo ternario.....	97
1. Formación de complejo ternario en función de la concentración de GTP.....	97
2. Formación del complejo ternario en función de la concentración de [³ H]-metionil tRNA _i	97
3. Formación del complejo ternario en función de la concentración de KCl.....	100
4. Efecto de la temperatura sobre la actividad del factor eIF ₂	100
III. INTERACCION DEL FACTOR eIF ₂ CON NUCLEOTIDOS DE GUANINA.....	107
A. Presencia de GDP unido a eIF ₂ purificado.....	107
B. Determinación de las K _D aproximadas para GTP y GDP.....	109
C. Inhibición competitiva por GTP y compuestos análogos de GTP y GDP, en la formación del complejo binario.....	111
D. Inhibición de la formación del complejo ternario por análogos de GDP.....	119
E. Formación del complejo ternario utilizando diferentes análogos de GTP.....	121
F. Recambio de nucleótidos unidos al factor eIF ₂ de ovario.....	123
1. Inhibición de la formación del complejo ternario por Mg ⁺²	123
2. Estudios de intercambio de GDP en fracciones de diferente grado de purificación que contienen eIF ₂	125
3. Búsqueda de un probable factor de recambio de GDP en fracciones de ovario.....	128

IV. ESTUDIOS SOBRE FOSFORILACION DE eIF ₂ COMO UNA POSIBLE FUNCION REGULADORA DE LA SINTESIS PROTEICA.....	131
1. Presencia de una proteína quinasa en extractos de ovario capaz de fosforilar eIF ₂ de <u>Artemia salina</u>	131
2. Microinyección de HCl en oocitos aislados y su efecto en la síntesis proteica.....	132
 DISCUSION.....	 139
 I. PURIFICACION DEL FACTOR eIF ₂ DE OVARIO DE <u>Xenopus laevis</u>	 139
II. UNION DE eIF ₂ A NUCLEOTIDOS DE GUANINA.....	146
III.FOSFORILACION DE eIF ₂ Y SU POSIBLE FUNCION REGULADORA DE LA SINTESIS PROTEICA EN OOCITOS.....	159
 BIBLIOGRAFIA.....	 164

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

ESQUEMA I: Modelo de iniciación de la síntesis proteica en reticulocitos.....	18
ESQUEMA II: Regulación de la síntesis proteica por fosforilación de eIF ₂ , en reticulocitos de conejo.....	22
FIGURA 1: Actividad de eIF ₂ en extractos crudos de ovario.....	63
FIGURA 2: Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción S40-60.....	67
FIGURA 3: Velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol de la fracción HS-500.....	71
FIGURA 5: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de las fracciones provenientes de la purificación A.....	76
FIGURA 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la fracción DE-120.....	82
FIGURA 7: Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida en gradiente vertical, de los patrones de peso molecular.....	87
FIGURA 8: Autorradiografía de una electroforesis nativa en gradiente vertical de poliacrilamida, del factor eIF ₂ fosforilado por HCl.....	88
FIGURA 9: Determinación del peso molecular del factor eIF ₂ nativo purificado por el método B.....	90
FIGURA 10: Fosforilación de eIF ₂ de ovario por HCl de reticulocitos y por caseína quinasa II de ovario.....	94
FIGURA 11: Fosforilación de eIF ₂ proveniente de diferentes fracciones de la purificación A.....	96
FIGURA 12: Formación de complejo ternario en función de la concentración de GTP.....	98
FIGURA 13: Formación de complejo ternario en función de la concentración de metionil-tRNA _i	99

FIGURA 14: Formación de complejo ternario en función de la concentración de KCl.....	101
FIGURA 15: Efecto de la temperatura sobre la formación de complejo ternario.....	102
FIGURA 16: Efecto de la preincubación de eIF ₂ a 37° sobre la formación de complejo ternario y complejo binario.....	104
FIGURA 17: Determinación de la presencia de GDP unido a eIF ₂	108
FIGURA 18: Determinación de K _D para GDP y GTP.....	112
FIGURA 19: Inhibición competitiva por GTP y por análogos de GDP y GTP en la formación de complejo binario.....	116
FIGURA 20: Análogos de guanina	117
FIGURA 21: Inhibición de la formación de complejo ternario por análogos de GDP.....	120
FIGURA 22: Formación de complejo ternario utilizando diferentes análogos de GTP como sustrato.....	122
FIGURA 23: Inhibición de la formación de complejo ternario por Mg ⁺²	124
FIGURA 24: Intercambio de GDP en fracciones de diferente grado de purificación que contienen eIF ₂	127
FIGURA 25: Búsqueda de un probable factor de recambio de GDP en la fracción no retenida de la DEAE-celulosa...	129
FIGURA 26: Fosforilación de eIF ₂ de <u>A. salina</u> por fracciones de ovario.....	135
FIGURA 27: Fosforilación de eIF ₂ de ovario por HCl y HCl inactivado por oATP.....	136

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Actividad de eIF ₂ en fracciones eluídas de DEAE-celulosa.....	68
TABLA 2: Tabla resumen de la purificación A de eIF ₂ de ovario de <u>Xenopus laevis</u>	74
TABLA 3: Actividad de eIF ₂ medida en las fracciones eluídas de carboxi-metil Sephadex.....	79
TABLA 4: Tabla resumen de la purificación B de eIF ₂ de ovario de <u>Xenopus laevis</u>	83
TABLA 5: Tabla resumen de la actividad de formación de complejo binario del factor eIF ₂ de ovario de <u>Xenopus laevis</u>	84
TABLA 6: Cuantificación de GDP unido a eIF ₂	110
TABLA 7: Competencia de nucleótidos de guanina por la formación de complejo binario.....	118
TABLA 8: Búsqueda de un probable factor de recambio en la fracción CM-360.....	130
TABLA 9: Efecto de la microinyección de HCl en la síntesis proteica en oocitos aislados.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- γ -S	: Adenosina 5'- γ -tio trifosfato
oATP	: Adenosina trifosfato 2'3'-dialdehído
EDTA	: Acido etilen-diamino-tetracético
eIF ₂	: Factor de iniciación 2 de la síntesis protéica
GDP- β -F	: Guanosina 5- β -fluor difosfato
GDP- β -S	: Guanosina 5- β -tio difosfato
GEF	: GDP Exchange Factor (Factor para el intercambio de GDP)
GMP.P(NH)P	: Guanosina 5'(β - γ -imido) trifosfato
pppGpC	: Citidil 5'-3'-guanosina-5'-trifosfato.
GTP- γ -S	: Guanosina 5'- γ -tio trifosfato
oGDP	: Guanosina difosfato 2'3'-dialdehído
oGTP	: Guanosina trifosfato 2'3'-dialdehído
HCI	: Hemin Controlled Inhibitor (Inhibidor regulado por hemina)
MPF	: Maturation Promoting Factor (Factor inductor de maduración)

RESUMEN

Durante el proceso de maduración meiótica de los oocitos de Xenopus laevis, se observa una activación de la síntesis protéica que aparentemente estaría relacionada a un proceso de fosforilación-desfosforilación de proteínas celulares. La regulación de la síntesis protéica en este proceso se ejerce a nivel post-transcripcional.

Por otra parte se conoce (Ochoa, 1983), que en reticulocitos carentes de hemina o en células tratadas con interferón, la síntesis protéica es regulada por medio de la fosforilación-desfosforilación del factor de iniciación 2 de la síntesis protéica.

Con el fin de estudiar un posible mecanismo de regulación de la traducción en los oocitos, a través del factor eIF₂, se realizaron los estudios que se resúmen a continuación

Se purificó el factor eIF₂ de ovario de Xenopus laevis, por dos métodos diferentes A y B. El método A incluyó cromatografías en DEAE-celulosa, fosfocelulosa y heparina - sefarosa, seguido de una centrifugación en

gradiente de glicerol. De esta purificación se obtuvo un factor eIF₂ que constaba de dos subunidades, de peso molecular 38.000 y 51.000. El peso molecular del factor nativo determinado en gradiente de glicerol, fue de 90.000.

La purificación B, se realizó partiendo de una homogeneización del tejido en presencia de benzamidina 30 mM con el objetivo de inhibir la acción proteolítica, lo que no se realizó en la purificación A. Esta purificación incluyó además cromatografías en carboximetil-Sephadex, heparina sefarosa y DEAE celulosa. De esta purificación se obtuvo un factor eIF₂ de tres subunidades de pesos moleculares 38.000, 50.000 y 52.000. La identidad de la subunidad de 38.000 daltons como subunidad α y de la de 50.000 daltons como la subunidad β se confirmó por la capacidad de la proteína quinasa de reticulocitos, regulada por la presencia de hemina, y específica para eIF₂- α (HCI), de fosforilar la primera y de la caseína quinasa II de ovario de fosforilar la segunda. La diferencia mas relevante entre estos dos factores eIF₂ es la presencia de la subunidad β , de 50.000 d, en la purificación B y la ausencia de ésta en la purificación A. Este resultado contribuye a esclarecer una discrepancia existente en la literatura sobre el número de subunidades presentes en los

factores de iniciación 2 de eucariontes, y apoya la idea de que la subunidad β es especialmente sensible a proteólisis.

Los estudios de interacción del factor eIF₂ con nucleótidos de guanina, GTP y GDP, indicaron que este tiene una afinidad por GDP 50 veces mayor que por GTP. La K_D calculada para GDP fue de $7,2 \times 10^{-8}$ M y para GTP de $3,8 \times 10^{-6}$. Además se encontró que el factor eIF₂ purificado tenía GDP fuertemente unido en un 40% de sus moléculas. Estos resultados sugieren la necesidad de la existencia de un mecanismo de recambio de GDP por GTP en los oocitos, que permita el funcionamiento de la síntesis protéica. Esta idea está apoyada por experimentos que demostraron que en presencia de Mg^{+2} , las fracciones crudas de eIF₂ intercambian GDP unido por GDP libre, mientras que la fracción mas pura no es capaz de realizar este intercambio.

Se analizó también la interacción de diferentes análogos de guanina con el factor eIF₂. Al estudiar la capacidad de estos análogos de inhibir la formación de complejo binario eIF₂-[³H]-GDP, se encontró que los análogos con modificaciones en la ribosa como 2'3'-dialdehído GDP (oGDP), 2'3'-dialdehído GTP (oGTP), y el dinucleótido pppGpC, mantenían cierta afinidad con el factor eIF₂.

Comparativamente la afinidad relativa de ellos es: $\text{pppGpC} > \text{GTP} = \text{dGTP} > \text{oGTP}$. A su vez el oGDP mostró una afinidad relativa menor que GDP . Las modificaciones en la cadena de fosfatos revelaron que la sustitución de un oxígeno en posición β por un azufre, para formar $\text{GDP}-\beta\text{-S}$, causa una disminución de la afinidad del GDP . Sin embargo cuando esta sustitución se realiza en posición γ , para formar $\text{GTP}-\gamma\text{-S}$, el efecto es contrario causando un aumento de la afinidad del GTP . A su vez el $\text{GDP}-\beta\text{-F}$, que posee una carga negativa menos que el GDP , muestra una afinidad menor que GDP y $\text{GDP}-\beta\text{-S}$. El GMP.P(NH)P , por otra parte, muestra una afinidad menor que GTP . Una modificación en la base nucleotídica como la metilación en la posición 7, disminuye completamente la afinidad de eIF_2 por este nucleótido. La afinidad relativa de estos análogos de guanina, es similar al estudiar la formación del complejo ternario por los análogos de GTP , o la inhibición de esta reacción por los análogos de GDP , siendo lo mas relevante la disminución de afinidad del pppGpC en la formación de complejo ternario. En resumen la afinidad relativa de estos nucleótidos es: $\text{GDP} > \text{GDP}-\beta\text{-S} > \text{oGDP} > \text{GTP}-\gamma\text{-S} > \text{GDP}-\beta\text{-F} > \text{pppGpC} > \text{GTP} = \text{dGTP} > \text{GMP.P(NH)P} > \text{oGTP} >> \text{7mGDP}$.

En relación a los estudios realizados con la fosforilación de eIF₂, se puede decir que HCl. la proteína quinasa de reticulocitos específica para la subunidad α del factor eIF₂, fosforila la subunidad α del factor de ovario, proveniente de diferentes etapas de purificación. Además al microinyectar esta proteína quinasa (HCl) en oocitos, se vió una disminución de un 40 a 50% de la síntesis protéica.

Estos resultados sugerirían que la fosforilación del factor eIF₂ podría ser un mecanismo regulatorio en la síntesis de proteínas de los oocitos, sin embargo no fue posible detectar una proteína quinasa en extracto de ovario que fuese capaz de fosforilar la subunidad α del factor homólogo.

SUMMARY

An increase in protein synthesis is observed during the process of meiotic maturation of Xenopus laevis oocytes which apparently is related to phosphorylation-dephosphorylation of cellular proteins. The regulation of protein synthesis during this process occurs at a post-transcriptional level.

On the other hand, it is known that in heme deficient reticulocytes or in interferon treated cells, protein synthesis is regulated through the phosphorylation-dephosphorylation of the protein synthesis initiation factor 2 (eIF₂).

The study described below was carried out with the aim of understanding the possible mechanism of regulation of the translation process by the eIF₂ factor in oocytes.

Ovarian initiation factor eIF₂ was purified by two methods, A and B. Method A included chromatography on DEAE-cellulose, phosphocellulose and heparin Sepharose, followed by centrifugation in a glycerol gradient. By this method, a preparation of eIF₂ was obtained which had two subunit of 38,000 and 51,000 molecular weight. The

molecular weight of the native factor as determined by glycerol gradient was 90,000.

Purification by Method B was carried out by performing the initial homogenization of the ovary in the presence of 30 mM benzamidine, with the intention of inhibiting proteolytic activity, which is in contrast to the procedure used in Method A. The purification also included chromatographic separations on carboxymethyl Sephadex, heparin Sepharose and DEAE cellulose. With this method, a preparation of eIF₂ was obtained which had three subunits of 38,000, 50,000 and 52,000 molecular weights. The identification of the 38,000 molecular weight subunit as subunit α and of the 50,000 molecular weight subunit as the β subunit was established by the capacity of the reticulocyte protein kinase specific for eIF₂ (HCI) to phosphorylate the first and the capacity of casein protein kinase II of ovary to phosphorylate the second.

The most relevant difference between the factors obtained by the two methods is the 50,000 molecular weight subunit, present in preparation B but absent in preparation A. These results contribute an explanation for the discrepancy which exists in the literature concerning the number of subunits present in the eukariotic initiation

factor and also support the proposal that subunit β is especially sensitive to proteolysis.

Studies on the interaction of the factor eIF₂ with the guanosine nucleotides GTP and GDP indicated that the factor has 50 times more affinity for GDP than for GTP. The K_D calculated for GDP is $7.2 \times 10^{-8}M$ and for GTP is $3.8 \times 10^{-6}M$. It was also observed that purified eIF₂ has GDP tightly bound to 40% of its molecules. These results suggest the need of a mechanism of exchange of GDP for GTP in the oocyte which would allow protein synthesis to occur. This idea is supported by the demonstration that in the presence of Mg^{+2} , crude preparations of eIF₂ permitted exchange of bound GDP with unbound GDP, whereas such exchange was not observed with the more purified fractions.

The interaction of different analogs of guanine with eIF₂ was also analyzed. The capacity of these analogs to inhibit the formation of the binary complex eIF₂-[³H]-GDP was tested and it was observed that the analogs with modifications in the ribose moiety maintain some affinity for the eIF₂ factor. Their relative affinity was as follows: pppGpC>GTP=dGTP>oGTP. Also, oGDP showed less relative affinity than GDP. Modification of

the phosphate chain showed that the substitution of an oxygen in position β by a sulfur atom, to form GDP- β -S, caused a decrease in affinity, with respect to GTP. However, when this substitution was in position γ , to form GTP- γ -S, the opposite effect of increased affinity was observed. In addition, GDP- β -F, which possesses one less negative charge than GDP, shows less affinity than GDP and GDP- β -S. GMP.P(NH)P, on the other hand, shows less affinity than GTP. A modification of the nucleotide base by methylation in position 7, completely decreases the affinity of the factor for this nucleotide. The relative affinity of these guanine analogs is similar when one studies the formation of the ternary complex with analogs of GTP, or the inhibition of this reaction by analogs of GDP, the most relevant being the decrease in affinity of pppGpC in the formation of the ternary complex. In summary, the relative affinity of these nucleotides is as follows: GDP. GDP- β -S > oGDP > GTP- γ -S > GDP- β -F > pppGpC > GTP = dGTP > GMP.P(NH)P > oGTP >> 7mGDP.

In relation to the studies carried out on the phosphorylation of eIF₂, it is clear that the reticulocyte protein kinase which is specific for the α subunit of reticulocyte eIF₂, phosphorylates the α subunit of the

ovarian initiation factor obtained at different stages of purification. In addition, upon microinjection of the protein kinase (HCl) into oocytes, a decrease of 40 to 50% in protein synthesis was observed.

These results suggest that the phosphorylation of eIF₂ factor could constitute a regulatory mechanism for protein synthesis in oocytes. However, it was not possible to detect a protein kinase in extracts of ovary which was able to phosphorylate the α subunit of the homologous factor.

INTRODUCCION

Las células germinales, en contraste con las células somáticas, retienen su totipotencialidad a través de la vida de un individuo. Sin embargo ellas también pueden sufrir diferenciación y convertirse en células altamente especializadas como cualquier célula somática. En los oocitos esta diferenciación comienza en etapas muy tempranas de la vida, en el proceso denominado meiósis, antes de comenzar el crecimiento celular. El proceso de meiósis ocurre en dos etapas: la primera, durante la cual el oocito llega hasta la etapa de profase I, y la segunda, llamada maduración meiótica que ocurre cuando el oocito ha alcanzado su mayor tamaño dentro del ovario (estado VI). En anfibios el proceso de maduración está claramente definido siendo la continuación de la meiósis hasta la metafase II. Este proceso es estimulado fisiológicamente por hormonas provenientes de la glándula pituitaria. In vivo, la maduración es estimulada por hormonas peptídicas, como la gonadotropina coriónica humana y la hormona luteinizante, y por hormonas esteroidales, como la progesterona. La maduración involucra una serie de procesos que requieren de

una alta regulación, y que constituyen la preparación del oocito para la posterior fecundación y división celular.

Según los estudios relacionados con el efecto de la progesterona en la maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis, esta hormona actuaría sobre la membrana del oocito inhibiendo la actividad adenililciclásica ahí presente. Esto produciría una disminución de los niveles de cAMP que sería en parte responsable de la inducción de la maduración meiótica.

El estudiar los mecanismos moleculares de la maduración meiótica es de mucho interés, ya que es un proceso de gran similitud con la división celular y por lo tanto constituye un gran aporte al estudio de los procesos biológicos.

Para estudiar el proceso de maduración meiótica, el oocito de Xenopus laevis ofrece diversas ventajas como su gran tamaño, 1,2 mm de diámetro, lo que permite una fácil manipulación en comparación con las células somáticas. Además, su tamaño ofrece la ventaja de poder microinyectar diversas sustancias y estudiar su efecto en el proceso de maduración meiótica. Además el ovario de Xenopus laevis posee oocitos de diferente tamaño, lo que permite el estudio de diversos procesos celulares en oocitos en diferente etapa de la oogénesis.

Por estas razones la maduración meiótica de los oocitos ha sido ampliamente estudiada en diversas especies, ya que constituye un excelente modelo para el estudio de la regulación de diversos procesos fisiológicos.

I. LA MADURACION MEIOTICA EN OOCITOS DE *Xenopus laevis*

A. Papel de los nucleótidos cíclicos en la maduración meiótica de oocitos de *Xenopus laevis*

Una serie de experimentos realizados en relación con los niveles de cAMP durante la maduración meiótica del oocito de *Xenopus laevis*, han demostrado que estos disminuyen entre un 40 y un 60% en las primeras dos horas luego de agregar la progesterona. Los niveles normales de cAMP se recuperan entre las 4 y las 5 horas de iniciado el proceso de maduración (Morril y col. 1977, Bravo y col. 1978 y Maller y col. 1979). La disminución de los niveles de cAMP se debe probablemente a la acción de la progesterona, ya que ha sido demostrado por Jordana y col. (1981), Sadler y Maller (1981) y Finidori y Lepicard (1981), que concentraciones fisiológicas de esta hormona producen una inhibición de un 40 a un 50% en

la actividad de la adenililciclase de membranas aisladas de oocito.

Con el fin de relacionar la disminución de los niveles de cAMP y la maduración meiótica se han realizado una serie de estudios que han llevado a los siguientes hallazgos:

a) en relación a la adenililciclase se ha encontrado que la toxina del cólera, que activa a esta enzima, inhibe la maduración del oocito inducida por la progesterona (Schorderet-Slatkine y col. 1978),

b) algunos compuestos que inhiben a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, como teofilina, papaverina y metil-isobutil-xantina, manteniendo de esta forma los niveles de cAMP altos, inhiben también la maduración del oocito inducida por hormona (Bravo y col. 1978).

Como ha sido ampliamente estudiado el cAMP ejerce su acción en la célula a través de proteína-quinasas dependientes de este nucleótido. El cAMP actúa sobre la proteína-quinasa uniéndose a la subunidad reguladora de la holoenzima y produciendo su disociación en dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas activas.

Los hallazgos que involucran a estas proteína-quinasa en la maduración meiótica son:

a) la microinyección de la subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de cAMP, en oocitos, inhibe la maduración inducida por la progesterona. (Maller y Krebs, 1977)

b) a su vez la microinyección de la subunidad reguladora de esta misma proteína quinasa induce la maduración, en ausencia de progesterona (Maller y Krebs, 1977), igual que el inhibidor específico de esta misma quinasa. (Huchon y col. 1981a).

c) se ha descrito la presencia de proteína-quinasa dependientes de cAMP en el oocito que sufren cambios en su actividad durante la maduración (O'Connor y Smith, 1979; Flockart y Corbin 1982)

d) finalmente también en relación con la fosforilación y desfosforilación de proteínas se ha descrito que el inhibidor-1 específico para la fosfatasa de tipo I, inhibe la maduración inducida por la progesterona (Huchon y col. 1981b)

De esta forma se ha propuesto que la disminución de los niveles de cAMP, producida por la acción hormonal estaría involucrada en un proceso de

desfosforilación de proteínas relacionadas con la inducción de la maduración meiótica en los oocitos.

B. Fosforilación y desfosforilación de proteínas durante la maduración meiótica

Los primeros estudios realizados en relación a la fosforilación de proteínas en oocitos indicaron un aumento de la fosforilación inducida por la maduración meiótica (Morris y Murphy, 1972). Posteriormente estudios realizados por Maller y Gerhart (1977), mostraron que el aumento de la fosforilación comenzaba después de las tres horas de agregar la hormona a los oocitos y tres horas antes de la ruptura de la vesícula germinal.

Una de las características más interesantes de la maduración meiótica es la aparición de un factor protéico citoplasmático, llamado MPF, factor promotor de la maduración. El MPF aparece justamente después de las tres horas de inducir la maduración del oocito por hormonas, y ha sido parcialmente purificado por Whu y Gerhart (1980). El MPF induce la maduración en oocitos crecidos al ser microinyectado, disminuyendo el tiempo de ruptura de la vesícula germinal de 8 a 4 horas.

Como se ha visto que el aumento de la

fosforilación de proteínas durante el proceso de maduración coincide con la aparición del MPF, se estudió la relación entre estos dos fenómenos, y se encontró que la microinyección de MPF en los oocitos causa un aumento inmediato de la fosforilación de proteínas (Maller, 1977). La purificación de MPF llevó finalmente a la conclusión que éste está constituido por varias proteínas que son sustratos susceptibles de ser fosforilados o proteína-quinatas (Whu y Gerhart, 1980).

Los estudios realizados por Maller (1977) revelan además que el aumento de la fosforilación de proteínas ocurre sólo en oocitos con capacidad de madurar. Por ejemplo, oocitos pequeños que no tienen la capacidad de madurar, no presentan un aumento de la fosforilación de proteínas al ser expuestos a la progesterona.

Los resultados obtenidos por Maller y Smith (1985), indican que el aumento de la fosforilación producido durante la maduración del oocito involucra la aparición de nuevas fosfoproteínas y no un aumento de la fosforilación de proteínas ya existentes.

Se ha intentado identificar los sustratos que se fosforilan durante la maduración del oocito, inducida por MPF, y hasta el momento el único sustrato

identificado es la proteína ribosomal S6 (Nielsen y col. 1982). Además se purificó a partir de ovario de Xenopus laevis una proteína quinasa capaz de fosforilar S6.

Por otro lado, fuertes evidencias (citadas anteriormente) indican que las proteína-quinasa dependientes de cAMP y la proteína fosfatasa-1 juegan un papel importante en las primeras horas de la inducción de la maduración, previo a la aparición del MPF. Estos antecedentes han llevado a postular que se requiere de la desfosforilación de una(s) proteína(s) para inducir la formación del MPF, en las primeras horas de la maduración.

C. Síntesis de proteínas en el oocito durante la oogénesis y la maduración meiótica

Los estudios realizados por Golden y col. (1980), indican que la totalidad de los mRNA presentes en el oocito crecido, se sintetizan muy temprano durante la oogénesis entre los estados 1 y 2. Por lo tanto la síntesis de proteínas se realiza durante la oogénesis y hasta la fecundación, a partir de un reservorio de mRNA.

Los estudios realizados en relación a la síntesis protéica durante la maduración indican un aumento leve, de un 50% de la síntesis protéica durante las dos primeras horas de la inducción hormonal (Otero y col. 1978)

y un aumento mayor de dos veces a las tres horas de colocar la hormona, después de la aparición del MPF, y junto con un aumento de la fosforilación de proteínas. (Bravo y col. 1978, Smith, 1981 y Wasserman y col. 1982). Como ha sido demostrado por Wasserman (1982) y por Wasserman y Masui (1975), el aumento de la síntesis protéica, que ocurre posteriormente a la aparición del MPF, no es necesario para que ocurra la maduración del oocito, ni para el aumento de la fosforilación de proteínas (Maller y col, 1977).

Los estudios realizados por Richter y col. (1982), sugieren que el aumento de la síntesis protéica producido después de la aparición del MPF se debe a una incorporación a polisomas de mRNA enmascarados en el citoplasma, produciéndose la traducción de ellos. Por otro lado Richter y Smith, (1981), sugieren que la capacidad de traducción en los oocitos esta limitada por un factor intrínseco de la traducción diferente del mRNA. Estos autores observaron que al microinyectar mRNA exógeno al oocito, éste es capaz de competir con los mRNA endógenos, produciéndose una inhibición de la traducción de éstos últimos. La síntesis protéica neta en estos oocitos no varía. Esto contrasta con el hecho de que los oocitos tienen un exceso de ribosomas y algunos factores de la traducción. Estos mismos autores observaron además que la

traducción de mRNA en polisomas solubles no era limitante, mientras que la traducción de mRNA en polisomas asociados a retículo endoplásmico era saturable y limitante. De esta forma existiría en los oocitos un reconocimiento diferencial de los mRNA, dado probablemente por algún componente del sistema traduccional.

Por otra parte los inhibidores de la síntesis protéica, como la cicloheximida, no inhiben la maduración del oocito, cuando son agregados después de la aparición del MPF. Por el contrario, cuando se inhibe la síntesis protéica, por cicloheximida, previo a la adición de la hormona, la maduración no ocurre. Este hecho explicaría la necesidad de la síntesis de novo de una(s) proteína(s) que se requeriría(n) para la formación del MPF. Esta síntesis ocurriría en las tres primeras horas de la inducción de la maduración por hormonas (Schorferet-Slatkine y Drury, 1973).

En resumen existe un aumento leve (50%) de la síntesis protéica durante las tres primeras horas de la maduración meiótica, que es necesario para que ocurra este proceso. Luego de la aparición del MPF la síntesis protéica aumenta drásticamente, pero esto ya no es un requerimiento para que ocurra el rompimiento de la vesícula germinal.

Un antecedente importante es que el aumento de la síntesis protéica que ocurre durante la maduración no

requiere de la transcripción de nuevos mRNA, como lo demuestra el hecho de que este fenómeno ocurre aún en presencia de Actinomicina D, y también en oocitos anucleados (Smith y Ecker, 1981).

Resumiendo los antecedentes para los fines de esta tesis podemos decir que la regulación post-transcripcional de la síntesis protéica juega un papel importante en el proceso de maduración meiótica, así como la fosforilación y desfosforilación de proteínas.

II. REGULACION DE LA SINTESIS PROTEICA EN CELULAS EUCARIOTICAS

Existen diversos ejemplos de regulación diferencial de la traducción de mRNA en células eucarióticas, entre los cuales se ha descrito que la velocidad de traducción de los mRNA para α y β globina es diferente cuando hay carencia de Mg^{+2} (Bruns y London 1965). También se ha descrito en Dyctiostelium discoideum una traducción preferencial de algunos mRNA en el desarrollo temprano (Alton y Lodish, 1977).

Para el control post-transcripcional de la traducción en células eucarióticas se han propuesto cuatro mecanismos básicos (Bergmann y Lodish, 1979).

a) mRNA citoplasmáticos enmascarados formando parte de una porción inactiva. Este efecto puede deberse a la interacción de los mRNA con proteínas (complejos ribonucleoproteicos) o con RNA pequeños, o bien a mRNA cuyo procesamiento no ha finalizado.

b) la probable existencia de factores de iniciación de la síntesis protéica con diferente especificidad en el reconocimiento de mRNA que serían los responsables de la iniciación de la traducción de sólo algunos mensajeros.

c) podrían existir diferencias de afinidad de los mRNA por la subunidad 40s o por los factores de iniciación, lo que alteraría la traducción de ellos cuando la concentración de los componentes de la síntesis protéica varíe.

d) cambios en los niveles de tRNA isoaceptores, que pudieran alterar en forma diferencial la velocidad de traducción a través de los ribosomas.

Si bien se ha observado diferentes fenómenos de regulación de la síntesis protéica, el mecanismo de varios de ellos no ha sido esclarecido aún. El modelo de

regulación de la traducción que se conoce en mayor detalle hasta el momento es el que se describe a continuación.

A. Regulación de la síntesis protéica en reticulocitos de conejo

Uno de los modelos de regulación de la síntesis protéica en eucariontes mas estudiado hasta el momento, es el que involucra al factor de iniciación 2 de la síntesis protéica (eIF₂) de reticulocitos de conejo. En este sistema se ha encontrado que la fosforilación de eIF₂ por dos proteína -quinasas, una activada por la deficiencia de hemina y la otra activada por RNA de doble hebra, causan una inhibición de la traducción (Ochoa, 1983)

1. Características del factor eIF₂ purificado de reticulocitos y de otros sistemas

La estructura y las propiedades de eIF₂ han sido estudiadas en diferentes sistemas. En reticulocitos de conejo se ha descrito un factor eIF₂ que consta de tres subunidades: α de 38.000 d, β de 52.000 d y γ de 54.000 d. El peso molecular nativo para este factor determinado por electroforésis en gradiente de poliacrilamida es de 160.000 (Benne y col. 1976). Las subunidades α , β y γ de eIF₂

pueden ser identificadas por diferentes criterios. Uno es el peso molecular característico determinado en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Otra forma de diferenciar las tres subunidades es por sus puntos isoeléctricos; α : 5,8, β : 6,6 y δ 8,9 (Barrieux y Rosenfeld, 1977). La tercera forma de reconocer las subunidades de eIF₂ es por la fosforilación de dos de ellas. Se ha descrito que la caseína quinasa de tipo II de reticulocitos es capaz de fosforilar a la subunidad β de eIF₂ sin alterar su función (Benne y col. 1978, Tahara y col. 1978 y Sikierka y col. 1982). Por otra parte otras dos proteínas quinasas, una regulada por la ausencia de hemina y otra activada por RNA de doble hebra fosforilan la subunidad α de eIF₂.

Existen datos discrepantes sobre la estructura de eIF₂. La mayoría de los autores que han estudiado el factor eIF₂ de reticulocitos de conejo concuerdan en que dicho factor consta de tres subunidades, α : 38.000 d, β : 52.000 y δ : 54.000 d. El heterotrímero tendría un peso molecular de 160.000. También se ha obtenido un factor eIF₂ de tres subunidades y con pesos moleculares semejantes al de reticulocitos de levadura, Artemia salina y músculo esquelético de conejo, (Barrieux y

Rosenfeld, 1977; Benne y col. 1976; Phillipowics y col. 1975 Proud y Pain 1982; Baan y col. 1981). Sin embargo Chaudhuri y col. (1981) informaron sobre el aislamiento de un factor eIF₂ de reticulocitos de conejo, que a pesar de ser totalmente funcional tenía un peso molecular de 90.000 y sólo constaba de dos subunidades, una de 38.000 d y otra de 51.000 d, correspondientes a las subunidades α y γ . Posteriormente otros grupos también informaron de preparaciones de eIF₂ con sólo dos subunidades a partir de germen de trigo, hígado de cerdo y Drosophila melanogaster (Seal y col. 1983; Stringer y col. 1980, Striger y col. 1979, G. Mateu y col. 1987).

Como se ha mencionado el factor eIF₂ con dos subunidades es igualmente funcional en los ensayos realizados in vitro, de formación de complejo ternario e interacción con la subunidad 40s de los ribosomas. Es posible sin embargo que la subunidad β sea importante in vivo en otras funciones del eIF₂, como son su interacción con el mRNA, o su liberación del complejo de iniciación 40s. Por otra parte Mitsui y col. (1981) informaron que el factor sin subunidad β es menos estable a la temperatura que el factor de tres subunidades. Estos mismos autores son los únicos que han aportado datos experimentales que

sugieren una explicación para la discrepancia de los datos obtenidos sobre el número de subunidades y el peso molecular de eIF₂ de reticulocitos. Ellos observaron que al someter el factor eIF₂ purificado de reticulocitos a una proteólisis parcial con tripsina, se pierde la subunidad β del factor en forma selectiva. Estos resultados indican que esta subunidad es la más sensible a proteasas como la tripsina, y además sugieren que las preparaciones de eIF₂ con dos subunidades serían artefactos debido a la proteólisis de la subunidad β ocurrida durante la homogeneización y purificación de la proteína.

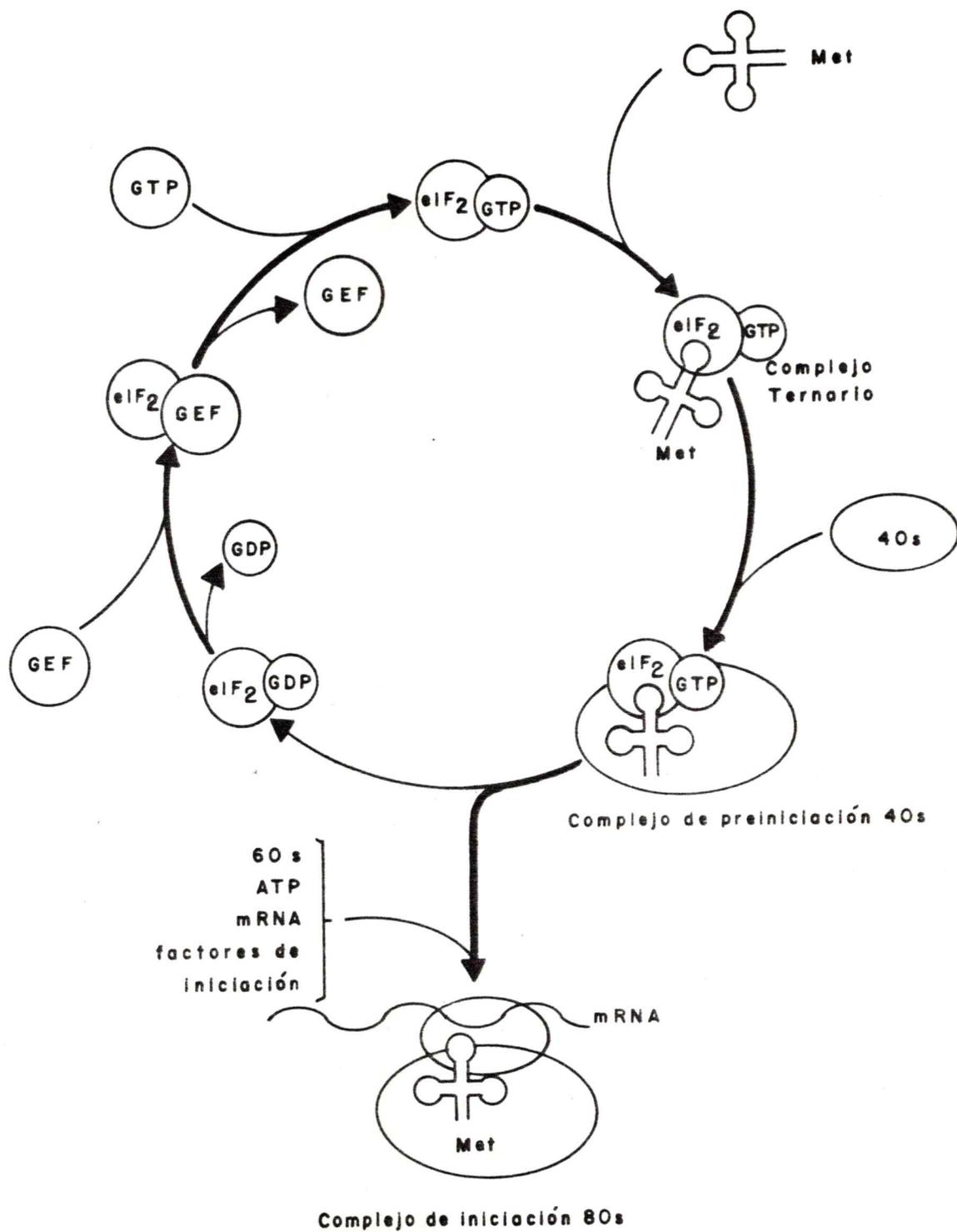
Todos los factores eIF₂ purificados hasta el momento tienen la capacidad de unir GDP y GTP, y metionil-tRNA_i. La formación de complejo ternario con GTP y metionil-tRNA_i, es necesaria para la unión del metionil-tRNA_i a la subunidad ribosomal 40s, formandose así el complejo de iniciación 40s. (esquema I). Se ha demostrado que la subunidad α de eIF₂ une GTP y GDP, y la subunidad δ es la que une al metionil-tRNA_i (Barrioux y Rosenfeld, 1977).

2. Intercambio de nucleótidos durante la iniciación de la síntesis protéica

Como se muestra en el esquema I, luego de la formación del complejo de iniciación 40s, el GTP unido a eIF₂ es hidrolizado y el factor eIF₂ es liberado formando un complejo estable eIF₂-GDP (Siekierka y col. 1983). La estabilidad del complejo eIF₂-GDP esta dada por la alta afinidad que tiene el eIF₂ por el GDP. Se han calculado las K_D para GTP y GDP del factor eIF₂ de reticulocitos y se ha encontrado un valor de 3×10^{-8} M para GDP y de $2,5 \times 10^{-6}$ para GTP. Es decir que eIF₂ tiene una afinidad por GDP 100 veces mayor que por GTP, en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg⁺² (1mM). (Walton y Gill 1975). De esta forma el intercambio de nucleótidos es un paso limitante y susceptible de ser regulado, en la iniciación de la síntesis protéica.

Al estudiar la formación de complejo ternario, utilizando eIF₂ de reticulocitos de conejo, diversos autores han encontrado que el Mg⁺², entre 1 y 5 mM, inhibe fuertemente esta reacción (Das y col. 1979; Ranu y London 1979; Siekierka y col. 1982). Además estos autores han encontrado un factor protéico llamado Co-eIF₂, SF, o GEF, de peso molecular entre 250.000 y 300.000, que es

MODELO DE INICIACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN RETICULOCITOS



Esquema I

capaz de revertir la inhibición de la formación de complejo ternario por Mg^{+2} . El grupo de Ochoa ha estudiado más en detalle el mecanismo de acción del factor GEF, y ha llegado a demostrar que este factor promueve el intercambio de GDP por GTP como se muestra en el esquema I. De esta forma GEF (GDP exchange factor), interactúa con eIF₂-GDP, liberándose el GDP, y formándose un complejo eIF₂-GEF. Este posteriormente interactúa con GTP formándose el complejo eIF₂-GTP y regenerando el GEF libre. El eIF₂-GTP puede ahora interactuar con metionil-tRNA_i. De esta forma el factor GEF actúa en forma catalítica y estaría en cantidades pequeñas en la célula.

Por otro lado también se ha descrito que el Mg^{+2} , inhibe el intercambio de nucleótidos, GDP y GTP, unidos a eIF₂ purificado de reticulocitos de conejo. Esta inhibición es revertida también al agregar GEF a la reacción. (Siekierka y col. 1983).

De esta forma se ha descrito que el Mg^{+2} aumenta la afinidad de GDP por eIF₂ haciéndose muy lento el intercambio de GDP unido a eIF₂, por GDP o GTP libre y de esta forma la formación de complejo ternario sólo puede realizarse con la fracción libre de GDP, en presencia de Mg^{+2} y en ausencia de GEF. En ausencia de Mg^{+2} el

intercambio de nucleótidos ocurre a mayor velocidad llegando a un 70 a 80% en 5 minutos. (Siekierka y col. 1983).

En algunos otros sistemas se han descrito factores protéicos que causan un efecto similar a GEF en la formación de complejo ternario: tumor de células ascíticas (Panniers y col., 1983) y Saccaromyces cerevisiae (Ahmad y col. 1985). De gérmen de trigo y de Artemia salina se han purificado factores protéicos que estimulan la formación de complejo ternario pero al parecer su mecanismo de acción es diferente a GEF, y no ha sido estudiado en detalle (Osterhout y col. 1983, Seal y col. 1983 y de Haro y col. 1978).

3. Fosforilación del factor eIF2

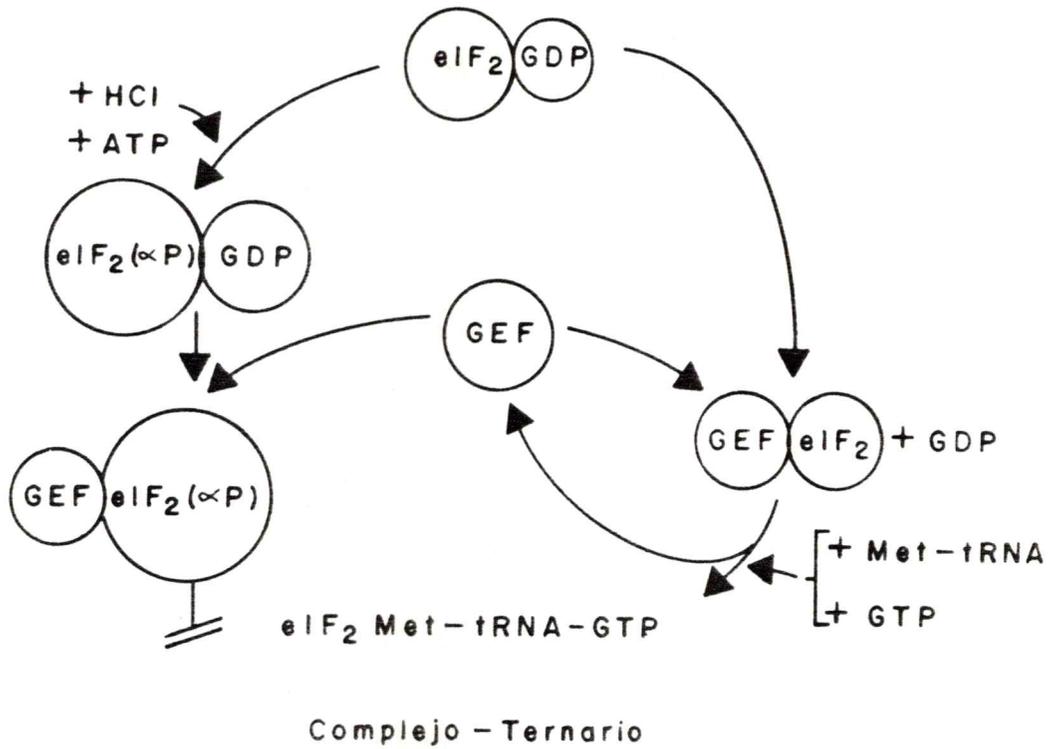
Los lisados de reticulocitos carentes de mitocondrias no sintetizan hemina y son dependientes de la adición de hemina exógena para el funcionamiento de la síntesis protéica. Así la síntesis protéica en los lisados tiene una duración de unos pocos minutos si no se agrega hemina al sistema. Se ha visto que la ausencia de hemina estimula a un inhibidor de la síntesis protéica que se llamó HCI (hemin controlled inhibitor) (Ochoa 1983).

Estudios posteriores llevaron a descubrir que HCI es una proteína quinasa independiente de cAMP que fosforila específicamente a la subunidad α de eIF₂ de reticulocitos alterando su función (Farrell y col. 1977, Levin y col. 1976). La activación de HCI por la ausencia de hemina en los lisados lleva a la fosforilación de dos polipéptidos, uno de 90.000 d que corresponde a la autofosforilación de HCI, y otro de 38.000 d que corresponde a la fosforilación de la subunidad α de eIF₂.

Durante ocho años se estudió el mecanismo por el cual HCI era capaz de inhibir la iniciación de la síntesis protéica en lisados de reticulocitos y finalmente en el año 1984, Sikierka y col. (1984) han llegado a proponer el modelo que se muestra en el esquema II.

En este esquema se muestra que la fosforilación de eIF₂, en la subunidad α , por HCI produce una unión irreversible con GEF. Los autores postulan que GEF actúa catalíticamente y se encontraría en cantidades limitantes en la célula, por lo tanto un aumento pequeño de la fosforilación de eIF₂ puede capturar gran parte del factor GEF formando un complejo GEF-eIF₂-P, e inhibir la síntesis protéica (Ochoa 1983). De esta forma cuando GEF no está disponible el GDP unido a eIF₂ no

REGULACION DE SINTESIS PROTEICA POR
 FOSFORILACION DE eIF₂
 EN RETICULOCITOS DE CONEJO



ESQUEMA II.

puede intercambiarse con GTP y queda formando un complejo eIF2-GDP, inactivo para la síntesis protéica.

HCI es una proteína-quinasa independiente de nucleótidos cíclicos. Puede ser activada por la presencia de N-etil-maleimida, por glutatión oxidado, pH elevado o alta presión. De todas estas formas, sólo la activación por la ausencia de hemina y por la presencia de glutatión oxidado son fisiológicas. De todas formas el mecanismo por el cual HCI es activado no ha sido totalmente esclarecido aún.

En otros sistemas se han encontrado proteína-quinatas que fosforilan a la subunidad α de eIF2 del mismo sistema (eIF2-quinatas). Hasta el momento se han descrito eIF2-quinatas en tres sistemas: gérmen de trigo (Ranu 1980), hígado de rata (Delauney y col. 1977) y tumor de células ascíticas (Clemens y col. 1976), además de reticulocitos. Sin embargo todos los factores eIF2 purificados de diversos sistemas son fosforilados por HCI.

Otra proteína-quinasa que fosforila a eIF2 en la subunidad α ha sido descrita en reticulocitos de conejo (Petryshyn y col. 1982) y en células HeLa tratadas con interferón (Kerr y col. 1976 y Sen y col. 1978). Esta proteína-quinasa es activada por RNA de doble hebra, y su

activación implica, igual que para HCl, su autofosforilación. Esta proteína-quinasa, llamada DAI, fosforila histonas además de eIF₂ y tiene propiedades diferentes de HCl. Sin embargo tanto HCl como DAI fosforilan la subunidad α de eIF₂ en el mismo sitio (Gross y col. 1981). De esta forma se ha postulado que el mecanismo de inhibición de ambas enzimas es similar aunque su activación deriva de diferentes señales.

En relación a las fosfatasas que desfosforilan al eIF₂ de reticulocitos, Foulkes y col. (1983) han descrito proteínas fosfatasas de tipo 1 y 2 en reticulocitos. De estas dos, la proteína fosfatasa 2 sería la responsable de la desfosforilación de DAI, que está acompañada de la desfosforilación de eIF₂ (Petryshyn, 1982). Por otra parte Ernst y col. (1982) han descrito que en lisados de reticulocitos la proteína fosfatasa 1 sería la responsable de la regulación de la desfosforilación de eIF₂ en lisados cuya síntesis proteica está regulada por la ausencia de hemina.

Resumiendo esta sección, podemos decir que existen numerosos resultados que señalan al factor eIF₂ como un punto sobre el cual se puede actuar para inhibir la síntesis de proteínas. La regulación de la actividad de

este factor se realiza por medio de un sistema enzimático de fosforilación-desfosforilación, que es un esquema bastante general en la regulación metabólica.

III. INTERCAMBIO DE NUCLEOTIDOS DE GUANINA EN LA REGULACION DE PROCESOS BIOLÓGICOS EN QUE PARTICIPAN PROTEÍNAS G.

Como ya se ha descrito el intercambio de GDP por GTP es una etapa susceptible de regulación, dentro de la secuencia de reacciones en las que participa el factor eIF₂ de reticulocitos, y lo es también probablemente para otros factores eIF₂.

Así como eIF₂, existen otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, llamadas proteínas G, en las cuales el intercambio de GDP por GTP y viceversa, constituye un punto de control de diversos procesos biológicos en que estas proteínas participan, como la elongación de la síntesis protéica, la transducción de señales hormonales por medio de la adenilil ciclase, la transducción de señales luminosas y el ensamble de los microtúbulos (Allende 1982). Algunas de estas proteínas han sido muy estudiadas con respecto a su estructura, afinidad

por GDP y por GTP e intercambio de nucleótidos, relacionados con la función que cumplen.

Algunas de las características que comparten las proteínas G son:

a) varias de ellas son heterotrímeros: eIF₂, transducina, las proteínas G_s y G_i de la adenililciclase y la proteína G_o de cerebro. Además una de sus subunidades, α , de peso molecular 40.000, une nucleótidos de guanina.

b) las proteínas G son activas cuando unen GTP. La hidrólisis de GTP produce un complejo proteína-GDP inactivo: eIF₂, factor de elongación Tu, factor de elongación 1, transducina y las subunidades G_i y G_s de la adenililciclase.

c) la regeneración de una proteína G activa requiere del intercambio de GDP por GTP, y esto involucra la interacción de la proteína G con otra proteína. En el caso de la transducina se requiere de su interacción con la rodopsina, y para G_s y G_i de su interacción con el receptor hormonal. El factor de elongación 1, el factor de elongación Tu y el factor eIF₂ (de reticulocitos), requieren de factores protéicos específicos que promueven el intercambio de GDP por GTP. Existen además otras proteínas que unen GDP y GTP pero que al parecer no requieren de proteínas de intercambio de nucleótidos (Proud, 1986).

Una proteína G que se ha incorporado a este grupo ultimamente es la proteína codificada por el oncogen Ras. La proteína p21 (Ras) une GDP y GTP y además tiene una actividad GTPásica, que está muy disminuída en la proteína oncogénica. Además la proteína p21 tiene una actividad autoquinasa dependiente de GTP. Para la transformación celular es primordial la unión de GTP a la proteína (Clanton y col. 1986).

Se han secuenciado los genes de diferentes proteínas G, y se ha encontrado homología de secuencia aminoacídica entre el factor de elongación Tu y la proteína p21 (Jurnak 1985). Este análisis revela cuatro regiones de aminoácidos en la estructura del Tu, homólogas a cuatro secuencias en la proteína p21. Estas cuatro regiones de aminoácidos están involucradas en el sitio de unión de GDP, en el factor Tu, observado por cristalografía de rayos X.

Los estudios de secuenciación del gen de la subunidad α de la transducina, realizados por Medynski y col. (1985), revelan cuatro regiones con gran homología al gen de la proteína p21 y a la secuencia de aminoácidos del factor Tu. En vista de que esta región ha sido identificada en Tu, como la región que une GDP, se piensa que estas regiones homólogas en las proteínas G analizadas,

correspondería al sitio de unión de GDP y GTP.

Un estudio mas reciente realizado por Sullivan (1986), indica que la secuencia de las proteínas Gs y Gi de la adenililciclase presentan homologías con las proteínas Tu y p21, en la región de unión de nucleótidos de guanina. Con este último estudio ya son seis las proteínas cuya secuencia aminoacídica (derivada de la secuencia nucleotídica) presentan regiones de alta homología en el sitio que probablemente une nucleótidos de guanosina.

Por otra parte algunas proteínas G son ADP-ribosiladas por diferentes toxinas bacterianas, modificando su actividad (Spiegel, 1987). Así la toxina diftérica ADP-ribosila al factor de elongación 2 de eucariontes inhibiendo su actividad. La toxina del cólera ADP-ribosila a la subunidad Gs de la adenililciclase y a la transducina, y la toxina de Bordetella pertussis la subunidad Gi de la adenililciclase.

Si bien todas las proteínas G estudiadas hasta el momento tienen algunas características comunes, existe una mayor homología entre aquellas que cumplen funciones similares; transducción de señales o síntesis protéica.

En cuanto a la afinidad de estas proteínas por nucleótidos de guanina existen estudios realizados con varias de ellas: transducina, factor de elongación G, factor de elongación 1, subunidad Gs de la adenililciclase y recientemente la proteína p21 (ras) (Yamanaka y col. 1986 Eckstein y col. 1975; Allende y col 1978; Northrup y col. 1982; Hall y Self 1986; Manne y col. 1984). Estos estudios revelan diferencias en la afinidad de estas proteínas por los nucleótidos de guanina que podrían ser significativas en la función que desempeñan.

El mecanismo por el cual actúan las proteínas G y todo aquello que involucre la función de ellas ha cobrado gran importancia en los últimos años con el descubrimiento de la proteína derivada del oncogen ras, ya que la función oncogénica de ésta depende de su unión a GTP.

IV. OBJETIVOS DE LA TESIS

La línea de trabajo del laboratorio donde se realizó esta tesis ha sido por muchos años el estudio de los mecanismos bioquímicos que participan en la inducción hormonal de la maduración meiótica en oocitos de anfibio. Dentro de este esquema el grueso del trabajo del laboratorio se ha centrado en la síntesis de proteínas, la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos y mas recientemente en la fosforilación de proteínas y en la transducción de señales externas por proteínas G de la membrana del oocito.

Como ha sido expuesto en la introducción, la regulación de la síntesis proteica es muy importante para el proceso de maduración, que requeriría al parecer de una traducción preferencial de algunos mRNA. Por otra parte existe una relación entre la fosforilación y desfosforilación de proteínas, y la inducción de la maduración meiótica. Estos dos hechos llevaron a postular una posible relación entre la regulación de la síntesis protéica y la fosforilación del factor de iniciación 2 de ovario de Xenopus laevis.

En este contexto y en base a los antecedentes presentados en la introducción, se plantearon los siguientes objetivos para esta tesis:

- 1) Purificación y caracterización del factor eIF2 presente en oocitos de Xenopus laevis.
- 2) Estudiar la interacción del factor eIF2 con los nucleótidos de guanina y su relación con su función.
- 3) Estudiar la fosforilación de eIF2 de oocitos, en relación a un posible mecanismo regulatorio de la síntesis protéica en este sistema.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.:

GTP, GDP, GMP.P.(NH)P, GTP- δ -S, GDP- β -S, 3'GMP, 7mGDP, dGTP, ATP y ADP, DTT, NEM, EDTA, peryodato de sodio, fosfoenol piruvato, piruvato de sodio, glicerol, acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato de sodio, TEMED, persulfato de amonio, azul de Coomassie R250, formaldehído, isopropanol, cloroformo, las enzimas: piruvato-quinasa (tipo II de músculo de conejo), nucleósido-5'-difosfato-quinasa (de hígado de bovino), las resinas: Carboximetil sephadex (CM-50-120) y heparina sefarosa.

las enzimas: 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa (de levadura), L- α -fosfoglicerol deshidrogenasa (de músculo de conejo), 5'-guanosina - monofosfato quinasa (de cerdo), lactato deshidrogenasa (de cerdo), nucleasa P1, polinucleótido quinasa (de E. Coli infectada con fago T4) y fosfotriosa isomerasa (de músculo de conejo), fueron obtenidas de Boehringer Mannheim.

DEAE Celulosa y filtros de microfibra de vidrio de 2,4 cm de diámetro de tipo GF/A se obtuvieron de Whatman Ltd.

Las resinas DEAE sephadex A-25, Sephadex G-10, y Sephadex G-25 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals.

Los compuestos radiactivos: [^3H]-GDP (10 Ci/mmol), [^3H]-GTP (32 Ci/mmol), [^3H]-metionina (70 Ci/mmol), [^{14}C]-lisina 331 nCi/mmol, fueron obtenidos de New England Nuclear.

$^{32}\text{P}_i$ fue obtenido de Amersham y de la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

Placas cromatográficas de polietilen-imino celulosa fueron obtenidas de Merk y de J.T.Baker Chemical Corporation.

Membranas de nitrocelulosa de 25 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro, se obtuvieron de Scheicher y schuell.

Las placas para autorradiografía X-OMAT-XAR-5 y RX, fueron obtenidas de KODAK y de FUJI PHOTO FILM respectivamente.

La proteína-quinasa HCl y el factor eIF2 de reticulocitos de conejo fueron donados por los Drs. José

Manuel Sierra y Antonio Garcia de Herreros del Centro de Biologia Molecular de la Universidad Autonoma de Madrid, Espana.

La Caseina-quinasa de tipo II de oocitos de Xenopus laevis fue donada por el Dr. Daniel Carrasco del Departamento de Bioquimica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El tRNA de higado de rata fue donado por el Dr. Aldo Solari del departamento de Bioquimica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El GDP- β -F fue donado por el Dr. Octavio Monasterio, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las sales inorganicas (grado analitico) y los acidos inorganicos y organicos se obtuvieron de Baker, Merk y Sigma

Las hembras adultas de Xenopus laevis fueron adquiridas de South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A.

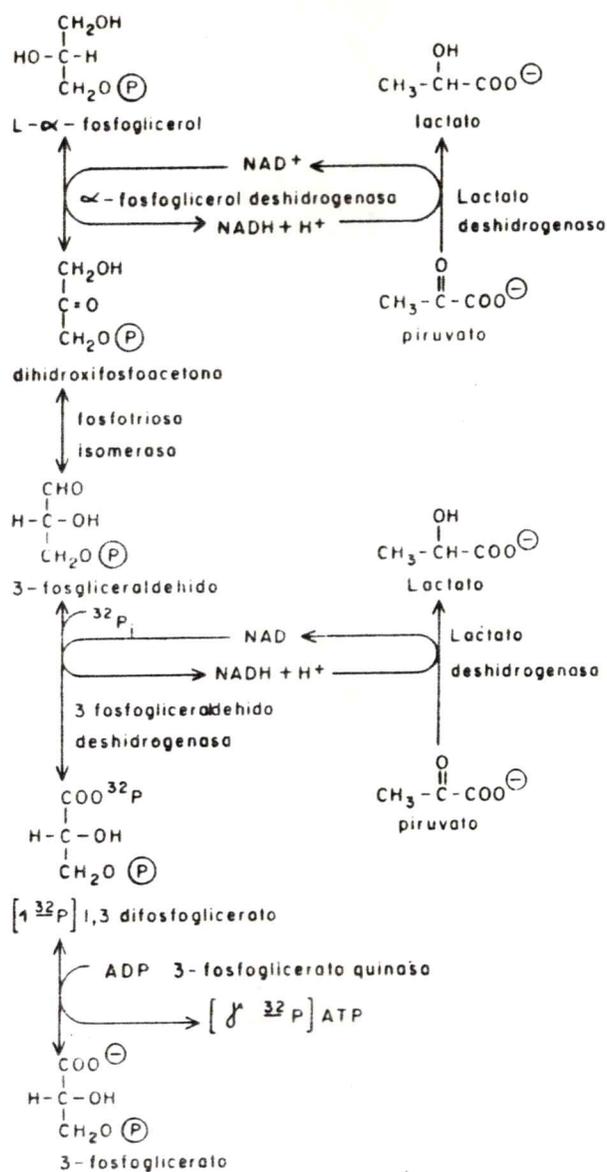
Las celulas de E.coli fueron donadas por el Dr. Hector Toledo del departamento de Bioquimica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

B. SINTESIS Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS RADIOACTIVOS

1. Síntesis de [γ - 32 P]-ATP:

Para la síntesis de [γ - 32 P]-ATP se utilizó el método descrito por Walseth y Johnson (1979), que consiste en una serie de reacciones enzimáticas descritas en el esquema III.

El procedimiento experimental era el siguiente: la solución ácida de 32 Pi en HCl 0,2N (50 mCi), se llevaba a pH 8 con NaOH 2N. Luego se incubaba a 30° por una hora en un medio que contenía: Tris-HCl 80 mM, pH 9,0; DTT 10 mM; α -L-glicerol 0,24 mM; NAD⁺ 1mM; MgCl₂ 20 mM; ADP 0,1 mM; piruvato de sodio 2 mM; fosfoglicerol-deshidrogenasa 14 μ g/ml (0,8 unidad); fosfotriosa-isomerasa 140 ng/ml (0,7 unidad); 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa 14 μ g/ml (1,1 unidad); 3-fosfoglicerato quinasa 1,4 μ g/ml (0,6 unidad); y lactato deshidrogenasa 7 μ g/ml (3,5 unidades). El volumen final de la reacción era de 1 ml. Las enzimas utilizadas estaban suspendidas en sulfato de amonio, por lo cual se mezclaban previamente en la proporción adecuada y se centrifugaban a 7.000 x g por 10 min. El residuo se resuspendía en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; DTT 1 mM y se



Esquema III. Síntesis enzimática de $[\mu\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

adicionaba a la mezcla de reacción. La reacción de fosforilación de ADP se detenía por calentamiento a 100° por 2 min.

2. SÍNTESIS DE $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$

La primera etapa de esta síntesis consistía en la preparación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$, para lo cual se utilizaba el mismo procedimiento que para la síntesis de $[\delta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ pero utilizando GDP 0,1 mM como sustrato en vez de ADP. El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ sintetizado se utilizaba para la síntesis del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ de acuerdo a las siguientes etapas y reacciones:

- Fosforilación de 3'GMP en posición 5
- Eliminación del grupo fosfato del 3'5'GMP, en la posición 3:
- Síntesis del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$, por fosforilación del 5'GMP.

El procedimiento experimental era el siguiente: una vez obtenido el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$, se agregaba a la mezcla de reacción 40 μl de espermina 0,1 M, 60 μl de 3'-GMP 50 mM

30 unidades de polinucleótido quinasa (10 μl), y se incubaba la mezcla por 6 horas y media a 30 (etapa a). A

continuación se agregaban 50 μ l de una solución amortiguadora de acetato de sodio 1M pH 5.5 (pH final 7) y 50 unidades de nucleasa P1 (50 μ l), y se incubaba por una hora a 33 $^{\circ}$ (etapa b). Para la última etapa se agregaban 200 μ g de 5'-GMP-quinasa (30 μ l), 15 unidades de piruvato quinasa en una mezcla de reacción que contenía: 40 μ l de KCl 2M, 75 μ l de PEP 0,1 M, 2 μ l de ATP 40 mM, 75 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,4 y 100 μ l de agua destilada, y se incubaba a 35 $^{\circ}$ por una hora y media (etapa c). Después de cada etapa la mezcla de reacción se calentaba a 100 $^{\circ}$ por 2 min. El rendimiento de esta síntesis es de un 70% aproximadamente.

3. Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos:

La determinación de la pureza de los nucleótidos sintetizados, así como la incorporación de la marca radiactiva en los productos de las diferentes etapas de la síntesis de [γ - 32 P]-ATP y [α - 32 P]-GTP, se realizaba por cromatografía ascendente en placas de polietilen-imino celulosa. El solvente utilizado dependía de los nucleótidos que se deseaba separar:

- La separación de los nucleótidos ATP y GTP se realizaba utilizando como solvente una solución de KH₂PO₄ 1M, pH 3,5. Esta cromatografía se realizaba durante 45 minutos con

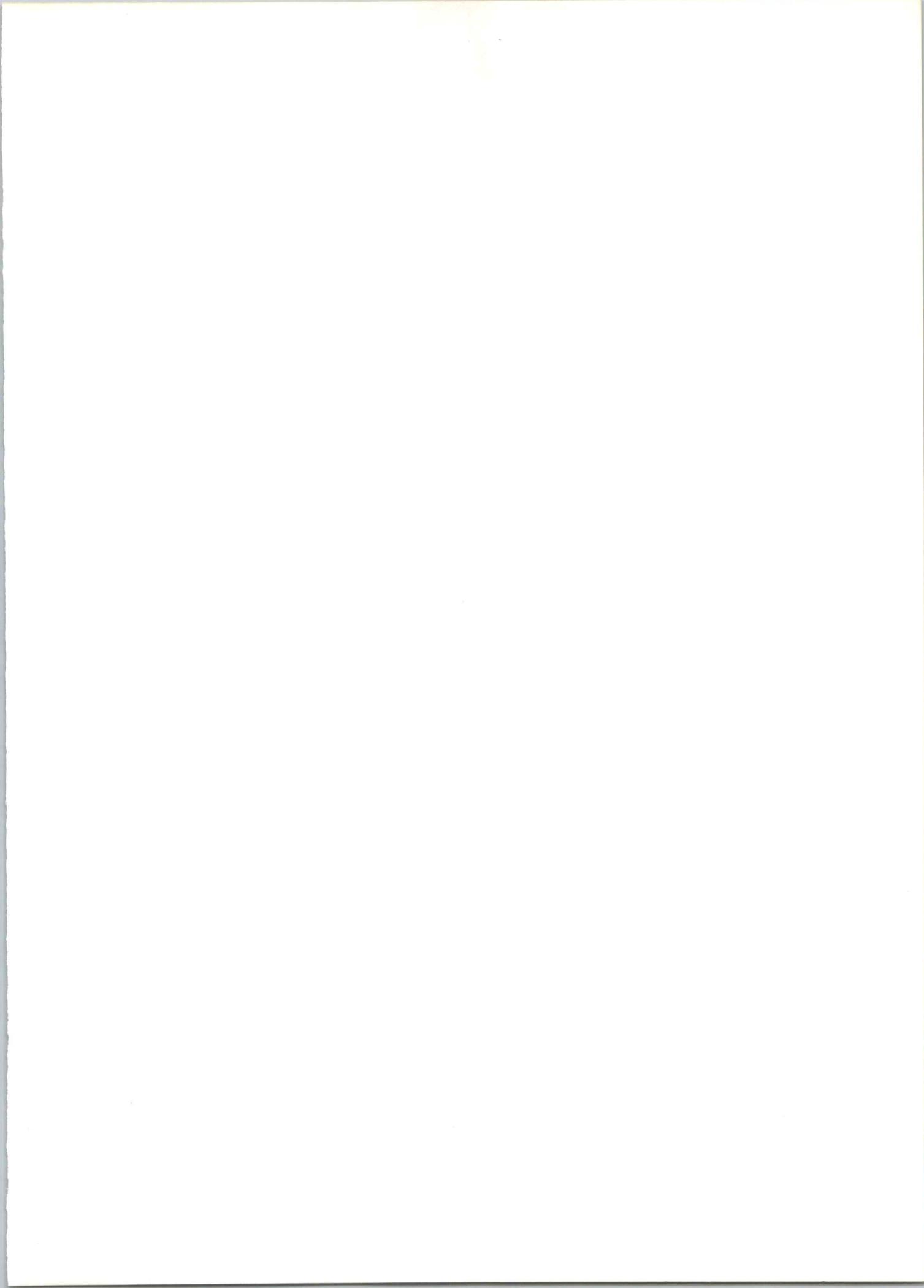
lo cual el ATP migraba con una distancia relativa (Rf) entre 0,4 y 0,5 , y el GTP entre 0,3 y 0,35.

- La separación de los nucleótidos GMP, GDP y GTP se realizaba utilizando como solvente formiato de sodio 2 M pH 3,5 para los primeros 6 cm de cromatografía y formiato de sodio 4 M para los 10 cm restantes. Las distancias relativas de migración (Rf) para estos nucleótidos eran las siguientes: GTP 0,06-0,1; GDP 0,5-0,55 y GMP 0,7-0,75.

La posición de los nucleótidos utilizados como patrones se determinaba por exposición de la placa cromatográfica a luz ultravioleta de onda corta. La posición de los nucleótidos radiactivos se determinaba cortando la placa cromatográfica en trozos de 0,5 cm y cuantificando la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

4. Purificación de nucleótidos radiactivos:

Los nucleótidos radiactivos sintetizados por el método ya descrito se purificaban por cromatografía en DEAE-sephadex A-25 previamente equilibrada con NH_4HCO_3 1M y lavada con agua. Una vez colocada la muestra en la columna, se eluía con un gradiente continuo de NH_4HCO_3



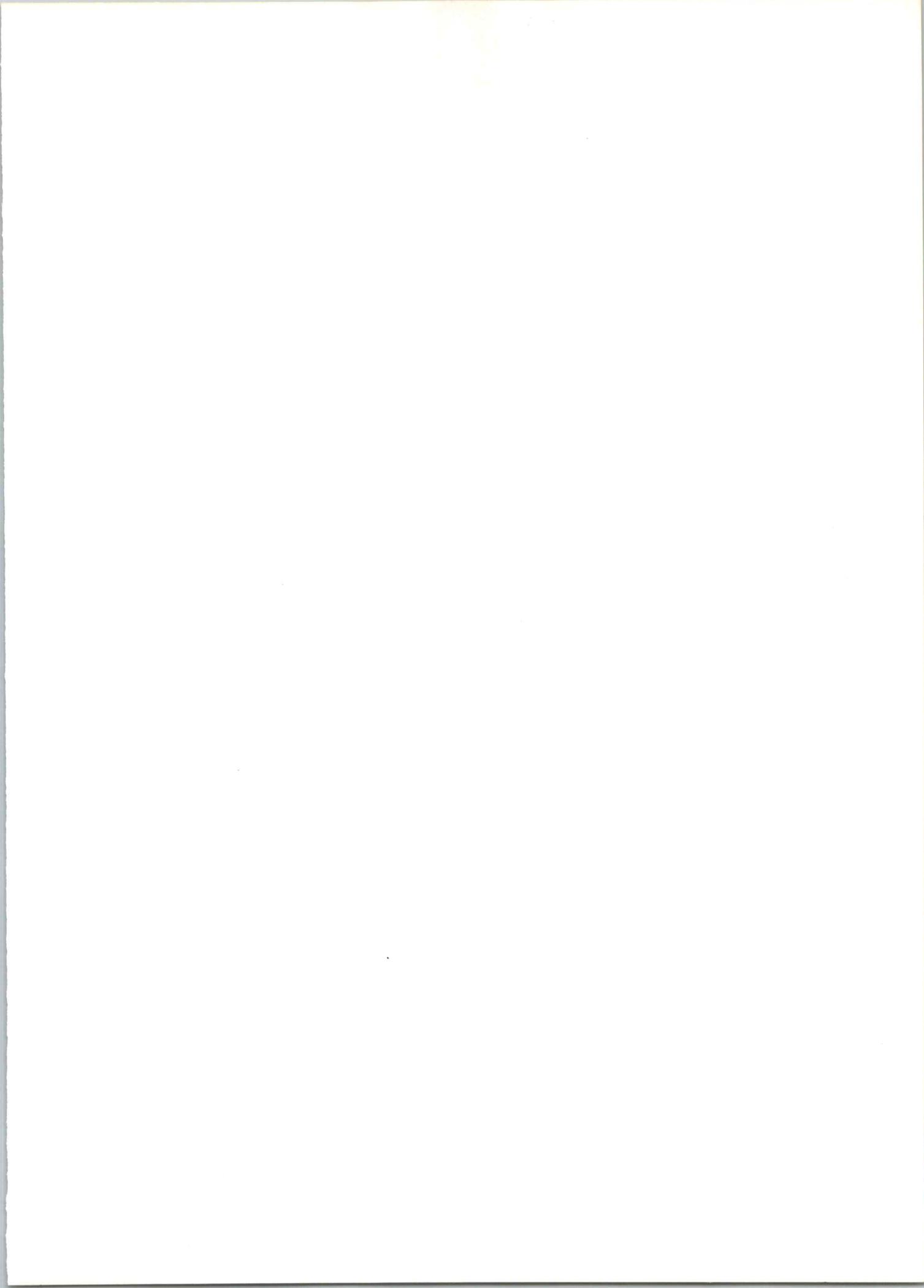
entre 0 y 1M. A las fracciones colectadas se les determinaba la radiactividad presente, se juntaban aquellas que correspondían al nucleótido que se deseaba purificar y se liofilizaban hasta sequedad. Luego se resuspendía el residuo en un volúmen adecuado, que contenía entre 10 a 20×10^6 cpm/ul. Luego de esta purificación los nucleótidos se obtenían con un 95% de pureza.

5. Purificación de GTP:

El GTP para los ensayos de unión a proteínas fue purificado por la misma técnica descrita para los nucleótidos radiactivos. Para ello se cargaba en la columna de DEAE sephadex A-25 (0,8 x 15 cm) 100 umoles de GTP. Las fracciones eluidas de la columna se analizaban por absorción a 260 nm y se analizaba su conductividad. Las fracciones correspondientes a GTP y con una absorción mayor que 1 se juntaban y se liofilizaban. El residuo se resuspendía en agua hasta obtener una concentración de 80mM aproximadamente. La concentración de GTP se determinaba espectrofotométricamente utilizando para ello el coeficiente de extinción molar de $13,7 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ a pH 7.

6. Síntesis de oGTP, oGDP y oATP:

Para la síntesis de los nucleótidos difosfato y trifosfato, 2'3' dialdehído se utilizó el procedimiento de Easterbrook-Smith y col. (1976), que consistía en lo siguiente. Se solubilizaba 0,1 mmol del nucleótido (ATP, GTP o GDP) en 1,5 ml de agua y se llevaba a pH 8,2. Se agregaba a la solución 0,11 mmoles de peryodato de sodio y después de incubar 2 horas a 4° en la oscuridad se detenía la reacción agregando 10 ul de etilenglicol. La mezcla se colocaba en una columna de Sephadex G-10 (1 x 100 cm) previamente lavada y equilibrada con agua. Se colectaban fracciones de 1 ml y se determinaba en cada una de ellas la absorción a 260 nm. También se determinaba la presencia del ión yodato haciendo reaccionar 3ul de cada fracción con 3ul de KI al 5% y 3ul de H₂SO₄ 6N. Las fracciones que daban color café o amarillo después de la reacción, dando cuenta de la presencia del ion yodato, eran descartadas. El resto de las fracciones que tenían una absorción mayor que 1, se juntaban y se liofilizaban. El residuo seco se resuspendía en agua y la concentración del nucleótido se determinaba por absorción a 260 nm utilizando para ello un coeficiente de extinción molar de $13,7 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ a pH 7 para GTP y GDP, y de $15,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ a pH 7 para ATP.



C. AMINOACILACION DEL [³H]-Metionil-tRNA_i:

1. Purificación parcial de aminoacil-tRNA sintetetasas:

Se tomaban 7g de células de *E. coli* y se resuspendían en amortiguador A que contenía: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, Mg(CH₃COOH)₂ 10 mM, NH₄Cl 60 mM y β-mercapto-etanol 6 mM. Luego se centrifugaba a 6.000xg por 10 minutos. Al sedimento celular se agregaba 10g de alumina y se maceraban en un mortero hasta obtener una pasta homogénea. Se resuspendía este homogenizado en 14 ml de solución A y se centrifugaba a 17.000xg por 10 minutos. Al sobrenadante de esta centrifugación se le agregaba DNasa 1ug/ml y se incubaba 5 minutos a 00. Luego se centrifugaba a 27.000xg por 40 minutos y el sobrenadante se centrifugaba nuevamente por 2 horas a 100.000xg. Finalmente el sobrenadante de esta centrifugación se dializaba contra amortiguador B que contenía: Tris-HCl 20 mM pH 7,6, Mg(CH₃COOH)₂ 1 mM y DTT 1mM. De esta forma se obtiene una preparación cruda de aminoacil-tRNA sintetetasas. Con el fin de obtener una preparación parcialmente purificada de esta enzima, se realizó una cromatografía en una columna de DEAE celulosa (1,5 x 5 cm) equilibrada con el amortiguador B. Se colocaba en la columna la fracción cruda de

aminoacil-tRNA sintetisas obtenida como se explicó anteriormente y se eluía con el amortiguador B que contenía además KCl 250 mM. Las fracciones que eluían se concentraban por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, y posteriormente se dializaban contra el amortiguador B que contenía KCl 50mM y glicerol al 50%. Esta preparación enzimática contenía 14 mg de proteína.

2. Ensayo de actividad para la metionil-tRNA sintetasa:

La actividad metionil-tRNA sintetasa se ensayaba en un medio que contenía: 4ul de amortiguador C (Hepes 1M pH 7,6; KCl 100 mM; $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ 50mM y DTT 20 mM), 5 ul de metionina 0,8 mM, 1 ul de ATP 100mM, 8 uL de tRNA de hígado de rata 530 OD/ml, 3 ul de $[^3\text{H}]$ -Metionina (25 Ci/mmol), 2 ul de agua y 13 ug de la preparación de aminoacil-tRNA sintetisas (1 ul).

La mezcla de reacción se incubaba por 20 minutos a 37°. Se detenía la reacción agregando 1 ml de TCA al 10% en frío, se filtraba por filtros de microfibra de vidrio, se secaban los filtros y se contaban en un contador de centelleo líquido.

Con estas condiciones se obtenía un máximo de formación de $[^3\text{H}]$ -metionil-tRNA_i por lo cual se utilizaban condiciones similares para la preparación del $[^3\text{H}]$ -metionil tRNA_i. La actividad específica para la

metionil-tRNA sintetasa de esta preparación era aproximadamente de 100 pmoles/mg/min.

3. Preparación del [^3H]-metionil tRNA.

Para la preparación masiva de [^3H]-metionil tRNA se realizaba la misma reacción descrita en el punto 2. aumentando las cantidades de los sustratos 5 veces. De esta forma el medio de incubación se componía de: 20 μl de amortiguador C, 5 μl de metionina 0,8 mM, 15 μl de [^3H]-metionina (25 Ci/mmol), 5 μl de ATP 100 mM, 40 μl de tRNA 530 OD/ml, 5 μl de la preparación de metionil-tRNA sintetasa (6,5 unidades) y 20 μl de agua. Esta mezcla de reacción se incubaba por 20 minutos a 37° . Se detenía la reacción añadiendo 1 ml de fenol destilado saturado con un amortiguador esteril de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10 mM pH 5,5. Luego se agitaba en un vortex 2 a 3 minutos y se centrifugaba a 3.500 rpm por 10 minutos. Se tomaba la fase acuosa y se colocaba en un tubo estéril. Esta fracción que contenía tRNA y aminoácidos (metionina) principalmente se filtraba a través de una columna de sephadex G-25-150 (1 x 40 cm) equilibrada con amortiguador $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10 mM pH 5,5. Se recogían fracciones de 1 ml y se determinaba en cada una de ellas la radiactividad presente. Se juntaban aquellas fracciones que presentaban una radiactividad específica superior a 2.000

cpm/ul, y que se colectaban en el volúmen de exclusión de la columna. Estas fracciones se liofilizaban y se resuspendían en un volúmen adecuado, de manera de tener 1 pmol de [^3H]-metionil-tRNA_i por ul. La cantidad de [^3H]-metionil-tRNA_i obtenido era de 500 pmoles aproximadamente y tenía una radiactividad específica de 20.000 cpm/pmol. Cabe hacer notar que la metionil-tRNA sintetasa de E. coli sólo carga al metionil-tRNA iniciador de eucariontes, por lo cual el producto de esta reacción es un sustrato específico para el estudio de la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariontes (Stanley, 1972).

D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE INICIACION

eIF₂:

1. Formación de complejo ternario:

La medición de complejo ternario se realizaba por el método descrito por de Haro y Ochoa (1979a), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción, en un volúmen de 25 ul, contenía: Hepes 20 mM pH 7,6; DTT 1mM, KCl 150 mM, 1 pmol de [^3H]-metionil-tRNA_i (20.000 cpm/pmol), GTP 50 uM y una fracción proteica de oocitos que contenía el factor eIF₂.

Esta mezcla se incubaba por 5 minutos a 37° y se detenía la reacción por dilución con amortiguador D (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, β -mercaptoetanol 7 mM y $Mg(CH_3COO)_2$ 1 mM) en frío. Esta mezcla se filtraba por membranas de nitrocelulosa en la cual quedaba retenido el complejo ternario formado por eIF₂, [³H]-metionil tRNA_i y GTP. Los filtros secos se contaban en un contador de centelleo líquido. La unidad de factor eIF₂ se definió como la cantidad de factor que es capaz de unir 1 pmol de [³H]-metionil tRNA_i en 5 minutos a 37°.

2. Formación de complejo binario:

Se midió la formación de complejo binario en presencia de GTP o GDP según el método descrito por de Haro y Ochoa (1979b), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción, en un volumen de 20 μ l, contenía: Hepes 20 mM pH 7,6, KCl 150 mM, [³H]-GTP (10.000 cpm/pmol) 50 μ M o [³H]-GDP (8.000 cpm/pmol) 1 μ M, y una fracción protéica de oocitos que contenía al factor eIF₂ (en los casos en que se indica se agregó Mg^{+2} 1 mM al ensayo). Esta mezcla se incubaba durante 5 minutos a 30°. La reacción se detenía por dilución con amortiguador D y se filtraba por membranas de nitrocelulosa. Los filtros secos se contaban en un

contador de centelleo líquido. La unidad de factor eIF₂ se definió como la cantidad de factor que es capaz de unir 1 pmol de GDP o de GTP en 5 minutos a 30°.

3. Intercambio de nucleótidos:

Para medir el intercambio de nucleótidos se preincubaba la fracción protéica que contenía al factor eIF₂ como se describió para la formación de complejo binario. A los 5 minutos de preincubación se agregaba el nucleótido frío a diferentes concentraciones y se incubaba por 2 minutos a 30°. Se cuantificaba el nucleótido radiactivo unido a eIF₂ (complejo binario) por filtración como se describió anteriormente. El recambio se determinaba midiendo la diferencia de radiactividad con tubos controles a los cuales no se agregaba el nucleótido frío.

E. ENSAYO DE FOSFORILACION DE PROTEINAS:

Para el ensayo de fosforilación de proteínas se incubaba una fracción protéica en un medio que contenía: Hepes 20 mM pH 7,6; $Mg(CH_3COO)_2$ 4 mM; KCl 10 mM y [γ - ^{32}P]-ATP (4.000 a 6.000 cpm/pmol) 100 μ M; en un volúmen final de 50 μ l. En los ensayos que se especifican se agregó una proteína quinasa exógena (HCl o caseína quinasa). Se incubaba por 15 minutos a 37°. La reacción se detenía agregando 17 μ l de amortiguador E (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; SDS al 8%; glicerol al 40 %; azul de bromofenol al 0,005% y β -mercaptoetanol 0,14 M. Las muestras se calentaban a 100° por 2 minutos. Estos ensayos eran analizados en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS.

F. INACTIVACION DE PROTEINAS QUINASAS POR oATP:

Para inactivar las proteína-quinatas por 2'3' dialdehído ATP (oATP) se realizaba una preincubación de una fracción protéica que contenía actividad quinásica, en el medio de incubación descrito para el ensayo de fosforilación, colocando oATP 300 μ M en vez de [γ - ^{32}P]-ATP. Se realizaba esta incubación durante 15

minutos a 37° y se detenía agregando 2 ul de NaBH₄ 0,6 M

G. SEPARACION DE LIGANDO LIBRE Y LIGANDO UNIDO A PROTEINAS:

Para separar nucleótidos unidos a proteínas de nucleótidos libres, o proteínas fosforiladas de ATP libre, se utilizaba el método descrito por Penefsky (1977), que consistía básicamente en lo siguiente: jeringas desechables de 1 ml (tuberculina) se llenaban con 1 ml de sephadex G-50 equilibrado con amortiguador F (Hepes 20 mM pH 7,6; KCl 100 mM; EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM y glicerol 10 %). Las jeringas se colocaban posteriormente en tubos de 1,5 x 9,5 cm y se centrifugaban a 3.000 rpm por 90 segundos en un rotor "swinging bucket" en una centrífuga clínica. Luego se colocaba una muestra de 50 ul en la parte superior de la columna y se centrifugaba nuevamente en las mismas condiciones utilizando un tubo limpio para recoger la muestra de ligando unido a proteína.

H. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA:

1. Geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS:

Para analizar el patrón de proteínas durante la purificación del factor de iniciación eIF₂, así como la fosforilación de proteínas se realizaban geles de poliacrilamida en placas de vidrio en las condiciones siguientes:

gel de separación: acrilamida al 10%, bisacrilamida al 0,25%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS al 0,1%; TEMED 0,025% y persulfato de amonio al 0,037%, en un volumen de 30 ml.

Se dejaba polimerizar durante 2 horas y se agregaba el gel de concentración.

gel de concentración: acrilamida al 3%, bisacrilamida al 0,08%, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS al 0,1%, TEMED al 0,1% y persulfato de amonio al 0,13%, en un volumen de 8 ml.

Una vez polimerizado el gel de concentración se aplicaban las muestras y se llevaba a cabo la electroforesis a temperatura ambiente, y a una intensidad de corriente constante de 40 mA, durante aproximadamente 4 horas. El

amortiguador electrolito utilizado se componía de: Tris-base 0,012 M, glicina 0,096 M, y SDS al 0,05%. Una vez finalizada la electroforésis los geles se teñían. Los geles para autorradiografía se fijaban con una solución de ácido acético al 10% durante 1 hora a 37°, cambiando la solución cada 15 minutos para eliminar la radiactividad inespecífica.

2. Geles en gradiente vertical de poliacrilamida para la determinación del peso molecular nativo:

Para la determinación del peso molecular nativo del factor eIF₂ de oocitos se utilizó la técnica descrita por Hedrick y Smith (1968) y modificada por Retamal y Babul (comunicación personal). Esta técnica consistía básicamente en lo siguiente:

Se realizaba un gradiente de poliacrilamida en sentido vertical al de migración de las muestras, con dos soluciones de acrilamida, al 18 y al 6%. Estas soluciones contenían además: bisacrilamida en una relación de acrilamida:bisacrilamida de 40:1, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; TEMED 0,025% y persulfato de amonio al 0,037%. Una vez realizado el gradiente se dejaba polimerizar el gel toda la

noche. Se agregaba el gel de concentración cuya composición era: acrilamida 2,5%, bisacrilamida 0,3%, Tris-HCl 60 mM pH 7,6; TEMED al 0,06%, riboflavina 4 mg/100ml y sacarosa al 40%. Se realizaba la polimerización de este gel frente a una lámpara de luz blanca. El gel contenía 15 pocillos en cada uno de los cuales se colocaban 20 ul de la muestra a analizar. Las muestras se preparaban agregando 5 ul de amortiguador E, sin SDS ni β -mercaptoetanol, a 15 ul de la solución protéica a analizar.

Los patrones de peso molecular utilizados eran: catalasa, P.M: 232.000; Láctico-deshidrogenasa, P.M.: 140.000 y seroalbúmina de bovino, P.M: 67.000, y se colocaba 20 ug de cada una por pocillo.

El amortiguador electrolito se componía de Tris-base 0,012 M y glicina 0,096 M. La electroforesis se llevaba a cabo a 4° durante aproximadamente 6 horas cuidando de que el frente de azul de bromofenol no saliera del gel. Una vez finalizada la electroforesis los geles se teñían y se analizaban.

3. Tinción de geles por azul de Coomassie:

Los geles se sumergían en una solución que contenía ácido acético al 10%, alcohol isopropílico al 20%

y azul de Coomassie al 0,5%; y se incubaban por 1 hora a 50°. Posteriormente se desteñían colocándolos en una solución de ácido acético al 7% y alcohol isopropílico al 20%, e incubándolos por 4 horas a 37°, realizando cambios de la solución cada 30 minutos. Finalmente los geles se lavaban con agua y se secaban al vacío.

4. Autorradiografías:

Con el fin de localizar la radiactividad asociada a proteínas o nucleótidos en los geles de poliacrilamida y en las placas de polietil-iminoetil celulosa, se realizaba una autorradiografía. Para esto se exponía el gel o la placa cromatográfica a películas de autorradiografía, en chasis herméticos con doble pantalla intensificadora. El tiempo de exposición de las autorradiografías variaba dependiendo de la radiactividad asociada a las proteínas o nucleótidos. Finalmente las películas se revelaban y se fijaban.

I. MICROINYECCION DE OOCITOS:

1. Obtención y separación de oocitos de estado VI:

Para extraer el ovario se anesthesiaba la rana

sumergiéndola en un baño de agua con hielo durante 15 minutos. Luego se operaba haciendo una pequeña incisión en el abdomen, se extraía el ovario y se colocaba en una solución salina descrita por Barth cuya composición era: NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, CaCl₂ 0,4 mM, MgSO₄ 0,82 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM y Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Los oocitos se separaban del ovario manualmente utilizando pinzas de relojero DUMONT #5, observándolos bajo una lupa con aumento de 0,8 veces. Se seleccionaban los oocitos de estado VI de 1,2 mm de diámetro, los que fueron utilizados en los experimentos de microinyección y de síntesis proteica in vivo.

2. Microinyección de oocitos:

Los oocitos de estado VI fueron microinyectados en el citoplasma mediante una aguja capilar previamente calibrada. Esta aguja estaba conectada a una jeringa GILMONT (para microinyección) que contenía vaselina, lo que permitía regular el flujo de la solución y microinyectar volúmenes con cierta precisión. Una vez microinyectados, los oocitos eran incubados durante 30

minutos en solución salina de Barth a 22°, para permitir la difusión de la sustancia microinyectada.

J. SINTESIS PROTEICA *in vivo*:

Se incubaban grupos de 5 oocitos en 50 μ l de solución salina de Barth, que contenía [14 C]-lisina 20 μ M (2.400 cpm/pmol) durante 30 minutos a 22°. Una vez finalizado el tiempo de incubación se detenía la reacción agregando 2 ml de ácido tricloroacético al 10% frío. Se homogenizaban los oocitos y se filtraban por filtros de microfibra de vidrio. Los filtros secos se contaban en un contador de centelleo líquido.

K. PURIFICACION DE eIF₂ DE OVARIO DE *Xenopus laevis*

1. Preparación de los extractos crudos

Se pesaban 600g de ovario y se lavaban con amortiguador G1 (Hepes 50 mM, pH 8,0; Mg(CH₃COO)₂ 5 mM; EDTA 0,1 mM; KCl 100 mM, β -mercaptoetanol 7 mM, glicerol 10%), o con amortiguador G2 (igual a G1, mas benzamidina 30

mM). Los ovarios se cortaban en trozos pequeños y estos se homogeneizaban en presencia del amortiguador G1 (preparación A), o del amortiguador G2 (preparación B) en una proporción de 20 ml de amortiguador por cada 10g de tejido, en un homogeneizador Potter, ejecutando 10 golpes del émbolo por cada 15g de tejido. los homogeneizados así obtenidos se centerifugaban por 10 minutos a 15.000xg. La suspensión sobrenadante se filtraba por lana de vidrio y se centrifugaba nuevamente por 20 minutos a 27.000xg. Se filtraba nuevamente el sobrenadante por lana de vidrio y se centrifugaba esta fracción a 160.000xg durante 2 horas 30 minutos. De esta centrifugación se obtenía un sedimento microsomal y una suspensión sobrenadante.

La fracción microsomal se lavaba con amortiguador H (Hepes 20 mM, pH 7,6; KCl 0,5 M; EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM; glicerol 10%) durante 2 horas 30 minutos con agitación suave. Con este procedimiento algunas de las proteínas unidas a la fracción microsomal son liberadas y entre ellas los factores que participan en la síntesis protéica.

Esta suspensión se centrifugaba nuevamente a 160.000xg durante 2 horas 30 minutos y se colectaba el sobrenadante claro, al que comunmente se le llama lavado

ribosomal de alta sal.

Tanto el lavado ribosomal de alta sal como el sobrenadante de la centrifugación a 160.000xg, se trataban con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% y posteriormente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60%. La fracción que precipita entre un 40 y un 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en ambos casos, tenía actividad de formación de complejo ternario en presencia de $[^3\text{H}]$ -metionil-tRNA_i, y fueron utilizadas para la purificación del factor eIF₂. La fracción proveniente del lavado ribosomal de alta sal se llamo LR40-60 y aquella proveniente del sobrenadante se llamo S40-60.

Todo el procedimiento para preparar estas dos fracciones se realizaban a 4.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

250 mg de la fracción S40-60 se colocaban en una columna de DEAE-celulosa (DE-52) (1,5x10cm) de 12 ml de volúmen en presencia del amortiguador I (Hepes 20 mM, pH 7,6; KCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; β -mercaptoetanol 7 mM; glicerol 10%). Una vez absorbida la muestra, se lavaba la columna con 100 ml del mismo amortiguador. La elución del factor eIF₂ se realizaba mediante un gradiente lineal de KCl entre 50 mM y 0,5 M en el amortiguador I. La

concentración salina de las fracciones se verificaba por medición de la conductividad de las fracciones. El flujo de la columna se mantenía constante en 60 gotas/minuto y se recogían fracciones de 4 ml.

La actividad enzimática se medía en alícuotas de 10 μ l de cada fracción por formación de complejo ternario. Las fracciones que presentaban actividad se juntaban para continuar la purificación.

Las columnas de DEAE-celulosa realizadas con cantidades mayores de 1g de proteína de extracto de ovario se eluían en dos etapas : KCl 120 mM y KCl 200 mM en amortiguador I. Para ello se colocaban en 1,7g de proteína de extracto de ovario en una columna de DEAE-celulosa (20x3,5cm). Se lavaba la columna con 700ml de amortiguador I, y luego se eluía con las dos etapas indicadas. Se determinaba la actividad de eIF₂ por formación de complejo ternario en 10 μ l de cada fracción.

Un procedimiento similar se realizaba con la fracción LR40-60.

3. Cromatografía en fosfocelulosa

Aproximadamente 300 mg de la fracción que eluía a 200 mM KCl de la columna de DEAE celulosa (DE-200)

se colocaban en una columna de fosfocelulosa (1,5x15cm) de 25 ml de volúmen. Se lavaba la columna con amortiguador I con KCl 200 mM. La elución se realizaba en dos etapas: amortiguador I con KCl 400 mM y amortiguador I con KCl 700 mM. El factor eIF₂ eluía a una concentración de KCl 700 mM. El flujo de la columna se mantenía constante en 60 gotas/minuto.

4. Cromatografía en Heparina-Sefarosa (Heparin Sepharose)

Aproximadamente 10 mg de la fracción que eluía a 700 mM KCl se dializaban contra el amortiguador I y se colocaban en una columna de Heparina Sefarosa (0,5x1cm). Se lavaba la columna con el amortiguador I y se eluía en dos etapas : amortiguador I con KCl 200 mM y amortiguador I con KCl 500 mM. El flujo de la columna se mantenía constante en 6 gotas/minuto. El factor eIF₂ eluía a una concentración de KCl 500 mM.

5. Cromatografía en carboximetil-Sephadex

Para la purificación B se utilizó como primera cromatografía carboximetil-Sephadex. Para ello se colocaban 1,5g de LR40-60 en una columna de carboximetil-

Sephadex equilibrada con amortiguador I. Se lavaba la columna con el mismo amortiguador y se eluía en dos etapas: amortiguador I con KCl 180 mM y amortiguador I con KCl 360 mM. El flujo de la columna se mantenía constante en 60 gotas/minuto. El factor eIF₂ eluía a una concentración de KCl de 360 mM.

6. Centrifugación en gradiente de glicerol

En un tubo de 12,5 ml se preparaba un gradiente lineal de glicerol entre el 15 y el 35 % en amortiguador I. En la parte superior del gradiente se colocaba 0,5mg (1ml) de la fracción obtenida de la última etapa de la purificación del factor eIF₂. Se realizaba una centrifugación durante 36 horas a 38.000 rpm en un rotor "swinging bucket" 41 Ti. Al final de la centrifugación se colectaban fracciones de 0,5 ml y se determinaba la actividad de eIF₂ en cada una de ellas por formación de complejo ternario. En un tubo paralelo se colocaban como patrones de peso molecular: BSA 67.000, aldolasa 158.000 y catalasa 232.000.

K. DETERMINACION DE PROTEINAS:

Las determinación de las proteínas se realizaba por el método descrito por Lowry y col. (1951) o por el método descrito por Bradford (1976).

RESULTADOS

I. PURIFICACION DEL FACTOR eIF₂ DE OVARIO DE Xenopus laevis

A continuación se analizan dos métodos de purificación de eIF₂. Ambos métodos utilizan cromatografías de uso común en la purificación de eIF₂ de otros sistemas. El método B incluye un inhibidor de proteasas durante la homogeneización, y el método A no lo incluye. Los dos métodos de purificación permiten obtener un factor eIF₂ activo, en la formación del complejo ternario, pero con diferente estructura, siendo lo más notable la ausencia de subunidad β en la preparación A y la presencia de esta en la preparación B.

A. Método de purificación A

1. Preparación del extracto de ovario:

Como ha sido descrito por otros autores el factor eIF₂ se encuentra en la fracción soluble y también

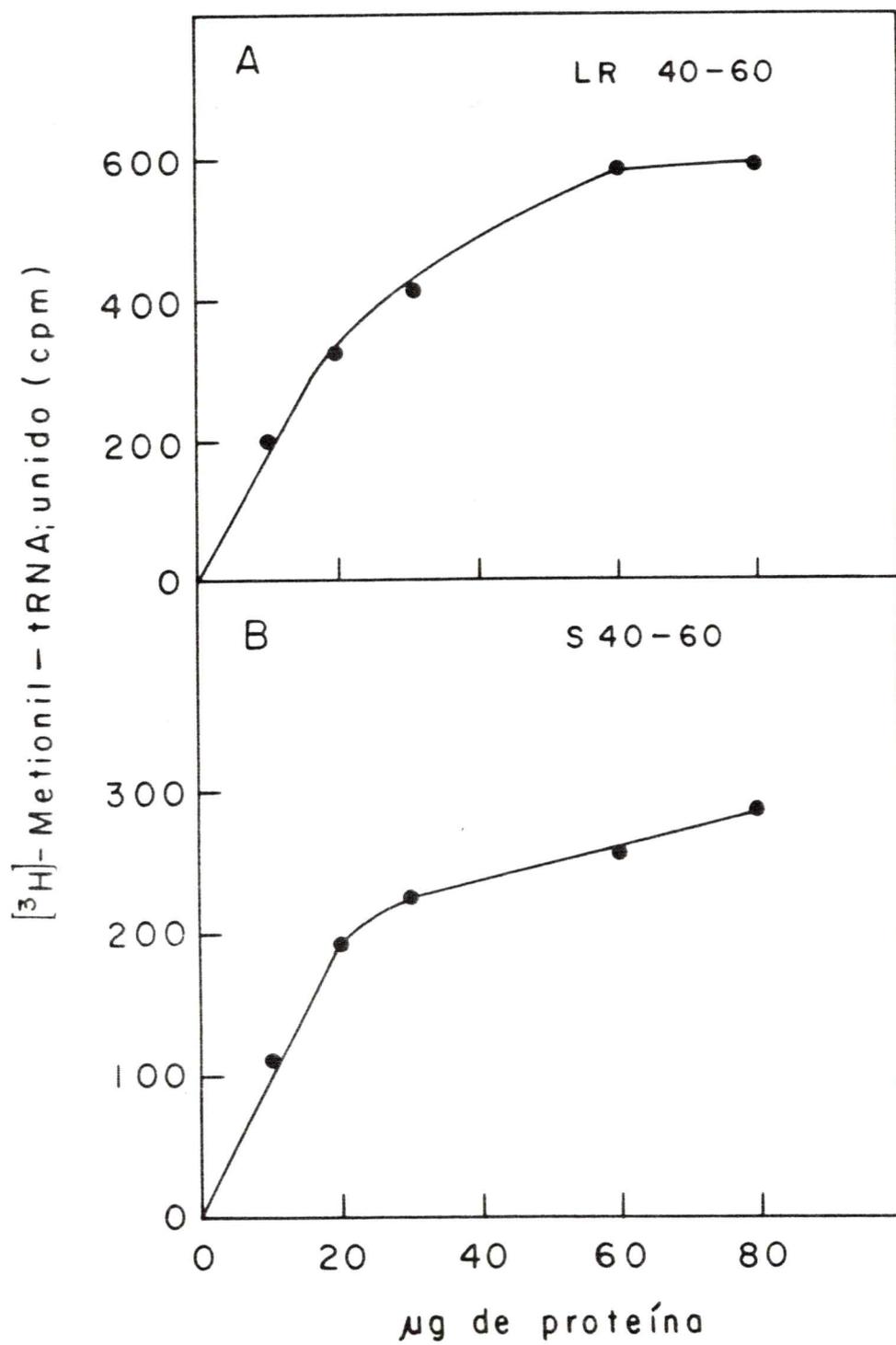


Figura 1: Actividad de eIF2 en extractos crudos de ovario

Se midió la formación de complejo ternario en la fracción LR40-60 (A) y S40-60 (B), en presencia de [³H]-metionil-tRNA; y GTP, como se indica en los métodos. Se utilizaron diferentes cantidades de proteína entre 10 y 80 µg.

en la fracción microsomal de células eucarióticas. Se prepararon ambas fracciones (S40-60 y LR40-60) como se describió en los métodos, homogeneizando con amortiguador G1, y se determinó la presencia de eIF₂ midiendo la formación de complejo ternario, en ambas fracciones luego de dializarlas contra el amortiguador I. Como se muestra en la figura 1 ambas fracciones presentan actividad de complejo ternario. La actividad específica de la fracción LR40-60 fue de 0,8 unidades por mg de proteína y la de la fracción S40-60 fue de 0,44 unidades por mg de proteína. Aunque la fracción proveniente del lavado ribosomal de alta sal presentó una mayor actividad específica la cantidad relativa de factor eIF₂ presente en ambas fracciones es de un 50% en cada una.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa:

250 mg de la fracción S40-60, dializada contra el amortiguador I, se sometieron a una cromatografía en DEAE-celulosa eluyendo con un gradiente de KCl entre 50 mM y 500 mM como se describe en los métodos. Se midió la actividad del factor eIF₂ y la absorbancia a 280 nm en las fracciones eluidas de la columna, obteniéndose el perfil de elución que se muestra en la figura 2. Como se puede observar sólo las fracciones que eluyen entre 160 y 200 mM KCl presentan actividad para eIF₂.

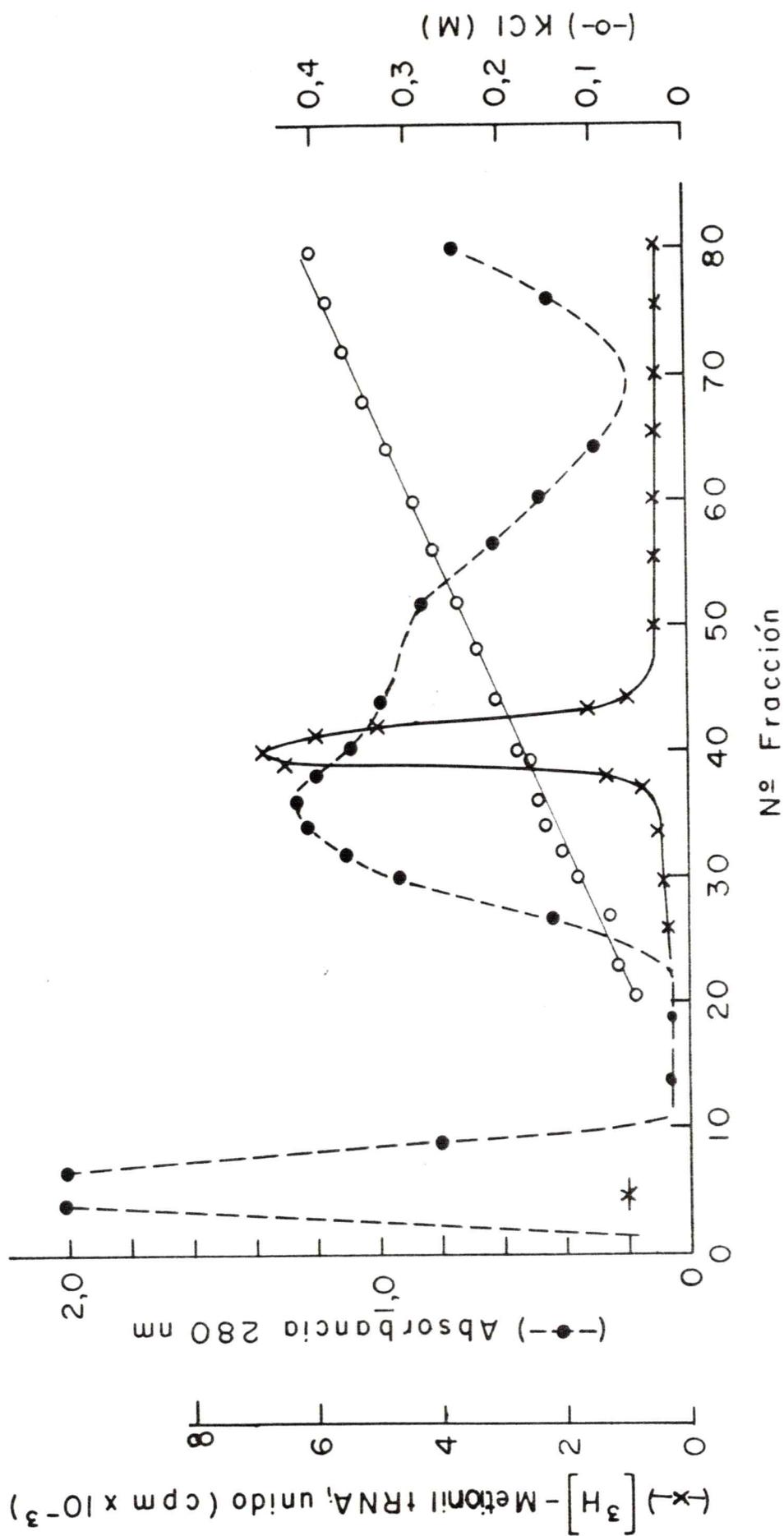


Figura 2: Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción S40-60.

250 mg de la fracción S40-60 se fraccionaron en una columna de DEAE-celulosa de 10 ml, eluyendo con un gradiente lineal de KCl entre 50 mM y 0,5 M. Se colectaron fracciones de 6 ml en las cuales se midió la absorbancia a 280 nm (---) y la actividad de eIF₂ por formación de complejo ternario en presencia de [³H]-metionil-tRNA_i y GTP (*—*) como se indica en los métodos. La actividad de eIF₂ se midió en 10 µl de cada fracción. El gradiente de concentración de sal se verificó midiendo la conductividad en cada fracción.

TABLA 1
 ACTIVIDAD DE eIF₂ EN FRACCIONES ELUIDAS
 DE DEAE-CELULOSA

Fracción	Actividad Específica U/mg proteína	Unidades totales	Rendimiento %
S40-60	0,45	1444	100
DE-200	8,7	3997	276

Se determinó la actividad de eIF₂ por formación de complejo ternario en presencia de [³H]-metionil-tRNA_i y GTP como se indica en los métodos. La actividad se determinó en la fracción no retenida, en la fracción eluída a 120 mM KCl y en 30 µg de la fracción eluída a 200 mM KCl (DE-200). No se detectó actividad en la fracción no retenida ni en aquella que eluyó a 120 mM KCl.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos con una columna de DEAE celulosa de mayor tamaño en la cual se colocaron 3,5g de proteína de la fracción S40-60. Las fracciones se eluyeron en dos etapas con 120 y 200 mM KCl, en base a estudios que mostraron un grado de purificación equivalente en esta cromatografía, y la mayor rapidez con que se realiza la elución.

La actividad específica de eIF₂ aumenta 20 veces con esta cromatografía. Además se observó que después del fraccionamiento en DEAE celulosa, constantemente ocurría un aumento del rendimiento de mas de dos veces. Este hecho podría indicar la separación del factor eIF₂ de algún inhibidor (específico o inespecífico) de la formación de complejo ternario.

3. Cromatografía en fosfocelulosa

La fracción DE-200 se sometió a una cromatografía en fosfocelulosa como se indica en los métodos. En este caso, así como en DEAE celulosa se observó que la elución en dos etapas, 400 y 700 mM KCl, llevaba a obtener un factor eIF₂ mas estable y de una actividad específica similar a aquél eluído por gradiente salino. Se determinó la actividad de eIF₂ en la fracción no

retenida, en la fracción que eluyó a 400 mM KCl, y en la que eluyó a 700 mM KCl (PC-700). Sólo se observó actividad en la fracción PC-700. En esta cromatografía el factor eIF₂ es purificado 10 veces con un rendimiento de un 53%.

4. Cromatografía en heparina-sefarosa:

La fracción PC-700 se dializó contra el amortiguador I, se colocó en una columna de heparina sefarosa y se eluyó como se indica en los métodos. Se determinó la actividad de eIF₂ en la fracción no retenida en la fracción que eluyó a 200 mM KCl, y en la que eluyó a 500 mM KCl (HS-500). Sólo se encontró actividad de eIF₂ en la fracción HS-500. En esta cromatografía el factor eIF₂ es purificado 2,5 veces con un rendimiento de un 70%.

5. Gradiente de glicerol:

Se tomaron 0,5 mg de la fracción HS-500 y se sometieron a centrifugación en un gradiente de glicerol como se indica en los métodos. Se determinó la actividad en las fracciones del gradiente. Los resultados se muestran en la figura 3.

La actividad de eIF₂ migra como un solo pico en el gradiente entre los volúmenes de migración de

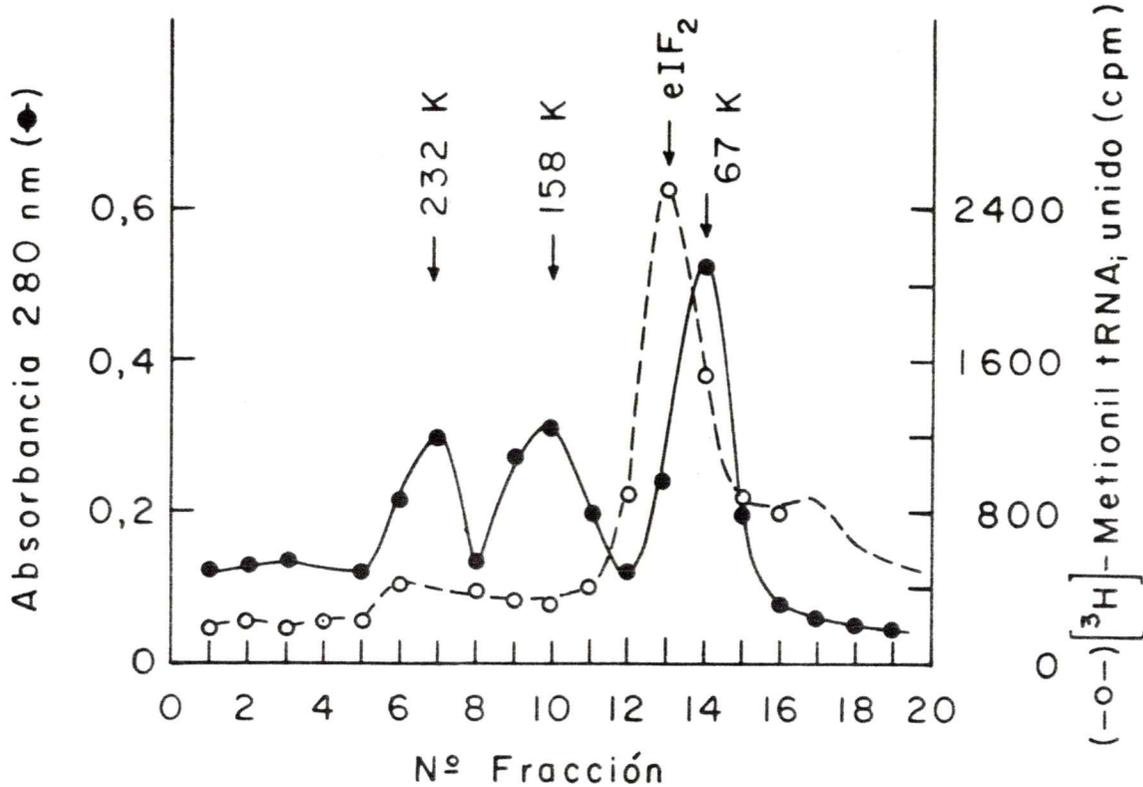


Figura 3: Velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol de la fracción HS-500.

Se sometió a centrifugación en gradiente de glicerol 0,5 mg de la fracción HS-500 como se indica en los métodos. Al final de la centrifugación se colectaron fracciones de 0,5 ml y se determinó en cada una de ellas la actividad de eIF₂ por formación de complejo ternario en presencia de [³H]-metionil tRNA; y GTP (○-○). Se tomaron 10 μl de cada fracción para hacer la determinación de actividad. Para la determinación de la migración de las proteínas patrones se midió la absorbancia a 280 nm en cada fracción (●-●). Los patrones utilizados fueron: BSA, 67.000d; aldolasa, 158.000 d catalasa 232.000d.

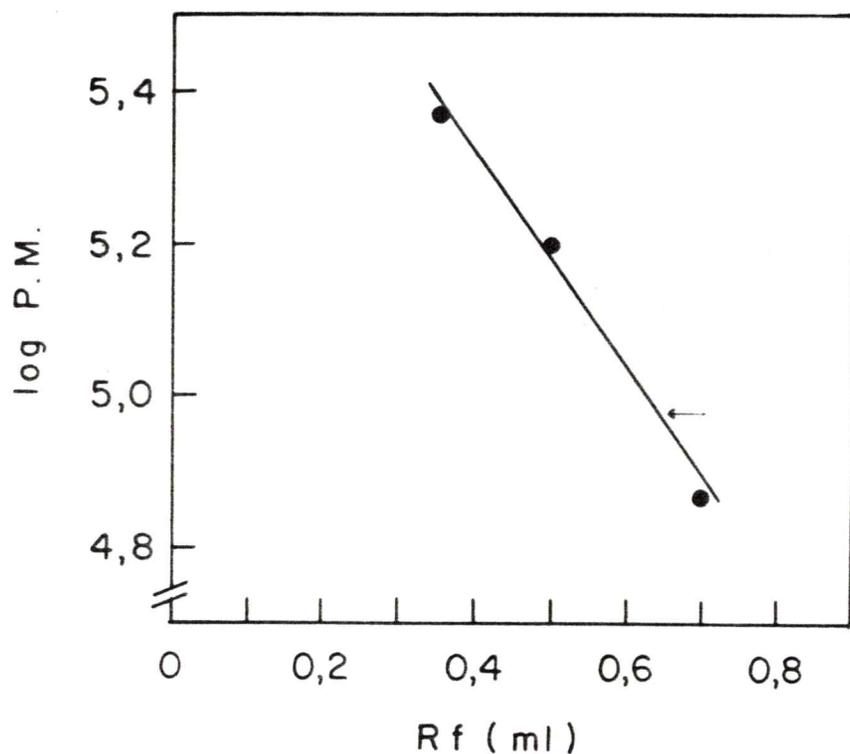


Figura 4: Determinación del peso molecular de eIF₂ por velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol:

Se graficó la migración relativa (Rf) de los patrones de proteínas en función del logaritmo del peso molecular de cada patrón. La flecha indica la migración relativa de la actividad de eIF₂.

los patrones de BSA y aldolasa. La actividad específica del factor eIF₂ recuperada después del gradiente fue de casi un 50% de la actividad específica de la fracción HS-500, siendo de 125 unidades por mg de proteína. En este gradiente no se colocó toda la fracción HS-500 por lo tanto el rendimiento se calculó en base a las unidades colocadas en él. Se colocaron en el gradiente 117 unidades de eIF₂ y se recuperaron 13 unidades totales con lo cual el rendimiento de esta etapa fue de un 11%. La inactivación parcial del factor eIF₂ durante la centrifugación en el gradiente de glicerol, se debe probablemente a que éste es muy inestable a 4º por tiempos prolongados.

6. Determinación del peso molecular aproximado del factor eIF₂ por velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol:

Para la determinación aproximada del peso molecular del factor eIF₂ nativo se graficó la migración relativa de los patrones de peso molecular en función del logaritmo del peso molecular. Como se muestra en la figura 4 el factor eIF₂ de ovario, purificado por este método tiene un peso molecular aproximado de 90.000.

La tabla 2 muestra un resumen de la purificación A de eIF₂ de ovario con la cual se obtuvo un factor con una actividad específica de 125 unidades por mg

TABLA 2
 TABLA RESUMEN DE LA PURIFICACION A DE eIF2
 DE OVARIO DE Xenopus laevis.

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg proteina	UNIDADES TOTALES	RENDIMIENTO %
S40-60	0,45	1444	100
DE-200	8,7	3997	276
P-700	96,4	2142	146
HS-500	234	1490	102
G.Glicerol*	125	164*	11*

la tabla resume el método de purificación A del factor eIF2. Para la determinación de actividad se utilizaron 30 μg de la fracción que eluye a 200 mM KCl en DEAE celulosa (DE-200), 3 μg de la fracción que eluye a 700 mM KCl en fosfocelulosa (PC-700) y 3 μg de la fracción que eluye a 500 mM KCl de la heparina sefarosa (HS-500).

*Estos valores estan calculados basándose en las unidades que se colocaron en el gradiente que corresponden a un 8% de las unidades totales de HS-500.

de proteína, y un rendimiento de un 11%.

7. Gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación A.

Con el fin de analizar las fracciones provenientes de las diferentes etapas de la purificación del factor eIF₂, se realizó un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, como se describe en los métodos. La fracción proveniente del gradiente de glicerol presenta dos bandas de proteína mayoritarias que dieron cuenta, por análisis densitométrico, del 70% de las proteínas totales del gel. Se determinó el peso molecular de estas proteínas, siendo 52.000 para la de mayor tamaño y 38.000 para la menor.

Por lo tanto de esta purificación se obtuvo un factor eIF₂ de dos subunidades y de peso molecular 90.000.

A continuación se muestra el método de purificación B, en el cual se cambió el orden de las cromatografías utilizadas, así como la columna de fosfocelulosa por una carboximetil-Sephadex. Esto se hizo con el fin de intentar un mejor rendimiento y pureza del factor eIF₂.

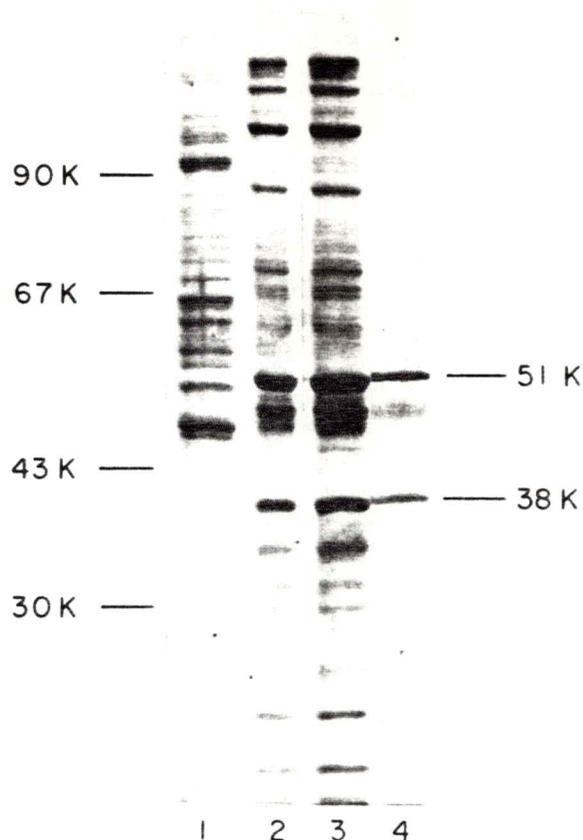


Figura 5: Electroforésis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de las fracciones provenientes de la purificación A.

Muestras provenientes de las cuatro últimas etapas de purificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, como se indica en los métodos. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

canal 1: 50 μ g de DE-200; canal 2: 30 μ g de FC-700; canal 3: 20 μ g de HS-500; canal 4: 6 μ g de la fracción de eIF2 proveniente del gradiente de glicerol. Para la determinación del peso molecular se utilizaron como patrones: fosforilasa, 94.000; BSA, 67.000; ovoalbúmina 43.000 y anhidrasa carbónica, 30.000.

B. Método de purificación B

1. Preparación de los extractos crudos

Como ha sido descrito que el factor eIF2 tiene tres subunidades, y que la subunidad β es sensible a proteólisis, se realizó una segunda purificación en presencia de benzamidina 30 mM, como inhibidor de proteasas, con el fin de intentar la obtención de un factor eIF2 con sus tres subunidades.

Se preparó un extracto crudo LR40-60 como se describe en los métodos pero utilizando amortiguador G2, que contiene 30 mM Benzamidina, durante la homogeneización de los trozos de ovario y hasta la etapa de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La benzamidina ha resultado ser muy eficiente como inhibidor de proteasas de oocitos, cuando es colocado en una concentración de 30 mM, aunque sea sólo durante la homogeneización. (Connelly, comunicación personal).

Luego el extracto LR40-60 se dializó contra amortiguador I, antes de someterlo a cromatografía.

2. Cromatografía en carboximetil-Sephadex

La fracción LR40-60 se sometió a una cromatografía en carboximetil-Sephadex como se describe en

los métodos. Se midió la actividad eluída de la columna por formación de complejo ternario y complejo binario, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 3. La formación de complejo binario no es un ensayo específico para el factor de iniciación 2, sólo se midió con el fin de comparar esta actividad asociada a la formación de complejo ternario durante la purificación de eIF₂ y en el factor purificado. Como se puede apreciar sólo la fracción proveniente de la elución realizada a 360 mM presentó actividad para el factor eIF₂ medida por formación de complejo ternario. En cambio al medir la formación de complejo binario, se obtuvo actividad en la fracción no retenida y también en la fracción eluída a 360 mM KCl. Así como ocurrió con la cromatografía en DEAE-celulosa realizada en la preparación A, después de la carboximetil-Sephadex realizada en la preparación B, se recuperó una mayor cantidad de unidades de eIF₂ que las que se colocaron en la columna. La actividad específica obtenida en la formación de complejo ternario fue de 21,7 unidades por mg de proteína y en complejo binario de 125 unidades por mg de proteína. Estos resultados indican que esta fracción tiene una actividad específica 5 veces mayor para la formación de complejo binario que para la formación de complejo ternario.

TABLA 3
ACTIVIDAD DE eIF₂ MEDIDA EN LAS FRACCIONES ELUIDAS
DE CARBOXIMETIL SEPHADEX

A. Formación de complejo ternario

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg proteína	UNIDADES TOTALES	RENDIMIENTO %
LR40-60	0,7	455	100
CM-360	21,7	1064	233

B. Formación de complejo binario

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg proteína	UNIDADES TOTALES	RENDIMIENTO %
LR40-60	23	14950	100
No retenida	12,4	3244	22
CM-360	125	6125	41

Se determinó la actividad de eIF₂ por formación de complejo ternario en presencia de [³H]-metionil-tRNA_i y GTP 50 μM (A), o por formación de complejo binario en presencia de [³H]-GDP 1 μM (B), como se describe en los métodos. No se observó actividad de complejo ternario en la fracción no retenida, así como en la fracción que eluyó a 180 mM KCl. La actividad de complejo binario se observó sólo en las dos fracciones indicadas, no retenida y aquella que eluye a 360 mM KCl (CM-360).

El rendimiento de esta etapa de purificación fue de un 233% para la actividad de formación de complejo ternario y de 41% para la actividad de formación de complejo binario que eluyó junto con la actividad para eIF₂ (Tabla 3).

3. Cromatografía en heparina-sefarosa

La fracción CM-360 obtenida en la etapa anterior se sometió a una cromatografía en heparina-sefarosa, luego de dializarla contra el amortiguador I.

Se eluyó la columna en una etapa a una concentración de KCl 500mM en amortiguador I, obteniéndose una actividad específica de 40,2 unidades por mg de proteína, una purificación de dos veces y un rendimiento de un 68%.

4. Cromatografía en DEAE-celulosa

La fracción HS-500 obtenida de la etapa anterior se dializó contra el amortiguador I, y se colocó en una columna de DEAE-celulosa. Luego se eluyó en dos etapas como se indica en los métodos, obteniéndose dos fracciones DE-120 y DE-200. En esta preparación la actividad de eIF₂ eluyó a 120 mM KCl y no a 200 mM como

ocurrió en la preparación A. La actividad específica de esta fracción fue de 192 unidades por mg de proteína con un rendimiento de un 46%.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de la fracción DE-120

Al analizar la fracción DE-120 en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS se encontró que ésta presentaba tres bandas mayoritarias de proteína que daban cuenta del 90% de las proteínas de esta fracción, como se muestra en la figura 6. Los pesos moleculares calculados para estas tres proteínas fueron de 38.000, 50.000 y 52.000.

La tabla 4 muestra un resumen de la purificación B, de eIF₂ de ovario, en la cual se obtuvo un mejor rendimiento que en la purificación A, siendo de un 75%, y una actividad específica similar.

La tabla 5 muestra un resumen de la purificación de la actividad de formación de complejo binario, determinado en las condiciones descritas en los métodos. Se puede observar que a lo largo de la purificación la actividad de formación de complejo binario es entre 4 y 6 veces mayor que la actividad de formación de complejo ternario.

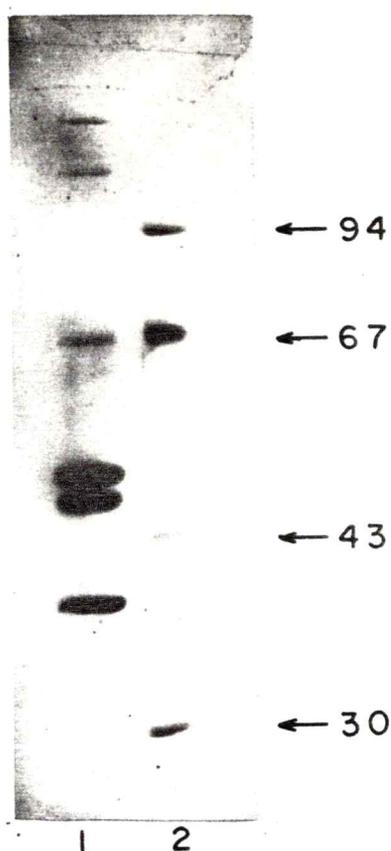


Figura 6: Electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la fracción DE-120

10 μg de la fracción DE-120 se sometieron a electroforésis en un gel de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS. El gel se tiñó con azul de coomassie como se indica en los métodos.

canal 1: eIF₂ purificado de ovario, canal 2: patrones de peso molecular, fosforilasa 94.000; BSA 67.000, ovoalbúmina 43.000 y anhidrasa carbónica 30.000.

TABLA 4
TABLA RESUMEN DE LA PURIFICACION B DE eIF₂
DE OVARIO DE Xenopus laevis

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg proteína	UNIDADES TOTALES	RENDIMIENTO %
LR40-60	0,7	455	100
CM-360	21,7	1064	233
HS-500	40,2	740	158
DE-120	192	340	75

Los valores de esta tabla se calcularon en base a la actividad de eIF₂ medida por formación de complejo ternario. Para ello se tomaron 15 µg de la fracción eluída a 360 mM KCl en la columna de carboximetil Sephadex, 10 µg de la fracción eluída a 500 mM KCl en la columna de heparina sefarosa (HS-500) y 1,5 µg de la fracción que eluyó a 120 mM KCl de la columna de DEAE celulosa.

TABLA 5
 TABLA RESUMEN DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE
 COMPLEJO BINARIO DEL FACTOR eIF₂
 DE OVARIO DE Xenopus laevis

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg proteína	UNIDADES TOTALES	RENDIMIENTO %
LR40-60	23	14950	100
CM-360	125	6125	41
HS-500	205	4595	31
DE-120	1230	2821	16

Los valores se calcularon en base a la formación de complejo binario, como se indica en los métodos. Las cantidades de proteína utilizadas de cada fracción fueron las mismas que se indican en la tabla 4.

6. Determinación del peso molecular de eIF₂ nativo, purificado por el método B

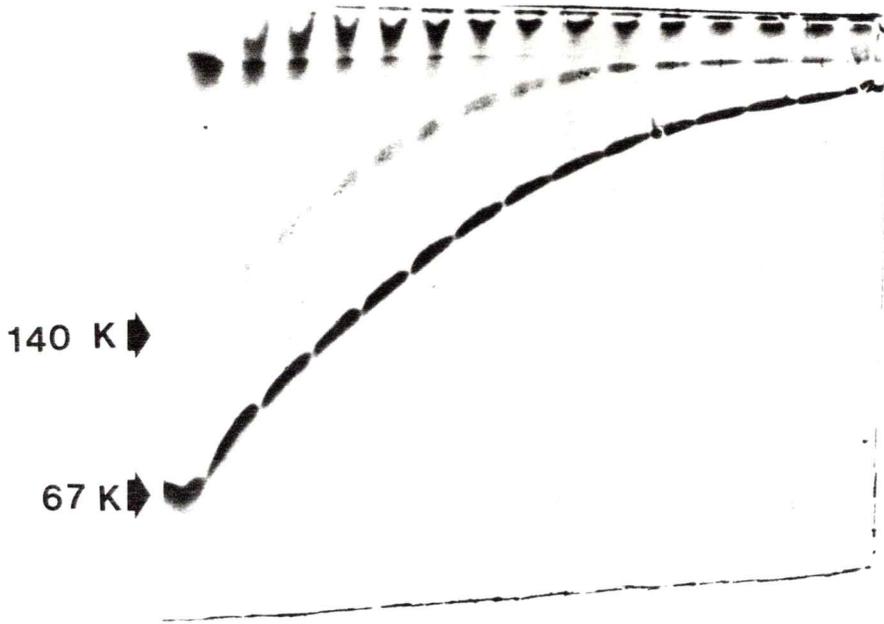
Con el fin de determinar el peso molecular de eIF₂ nativo de oocitos, se sometió la fracción DE-120 a electroforesis, en condiciones no desnaturalantes, en gradiente vertical de poliacrilamida como se indica en los métodos. En la figura 7 (A Y B) se muestra como migran tres patrones de peso molecular conocido en este tipo de electroforésis.

En la figura 8 se muestra la migración del factor eIF₂ en este tipo de electroforésis. En este caso eIF₂ fue fosforilado previamente con HCl con el fin de poder detectar su presencia por autorradiografía ya que la cantidad de proteína disponible era insuficiente para detectarlo por tinción de nitrato de plata, en este tipo de electroforésis.

En la figura 9 se muestra la determinación del peso molecular de eIF₂ que resultó ser de 160.000. Según este resultado y el observado en la figura 6, el factor eIF₂ purificado por el método B consta de tres subunidades: de 38.000, de 50.000 y de 52.000.

Así, el peso molecular del eIF₂ de oocitos es similar al obtenido para el factor de reticulocitos de conejo por Benne y col (1976) que consta de tres subunidades

A



B

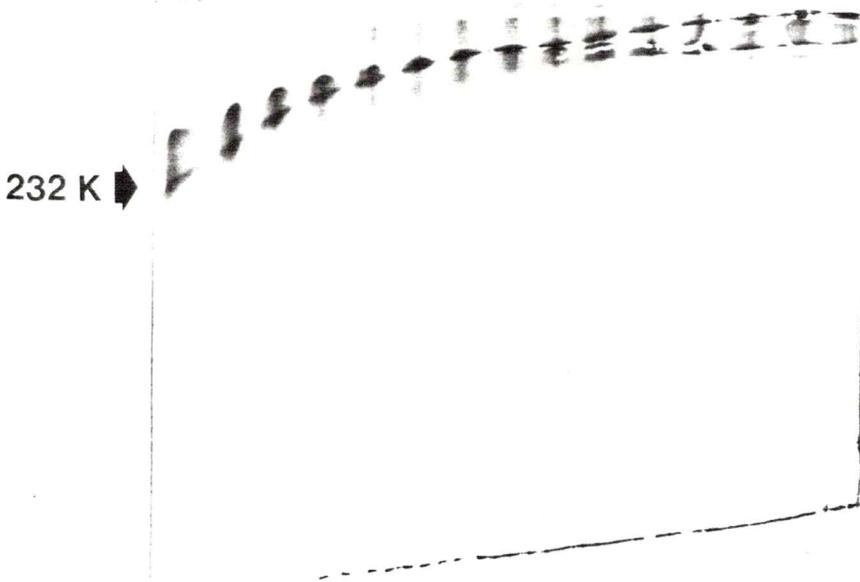


Figura 7: Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente vertical de los patrones de peso molecular

20 μg de BSA (67.000), 20 μg de deshidrogenasa láctica (140.000), (A), y 20 μg de catalasa (232.000) (B), se sometieron a electroforesis nativa en gradiente vertical de poliacrilamida como se indica en los métodos. Los geles se tiñeron con azul de coomassie según la técnica descrita en los métodos.



Figura 8: Autorradiografía de una electroforésis en gradiente vertical de poliacrilamida, del factor eIF₂ fosforilado por HCl.

5 μ g de eIF₂ se incubaron en presencia de HCl y [γ -³²P] ATP 100 μ M, en un ensayo de fosforilación como se describe en los métodos. El volumen final de la reacción fue de 300 μ l. Se sometió esta muestra a electroforésis nativa en un gel de poliacrilamida en gradiente vertical, repartiendo la muestra en 15 pocillos y colocando 20 μ l de ésta en cada uno.

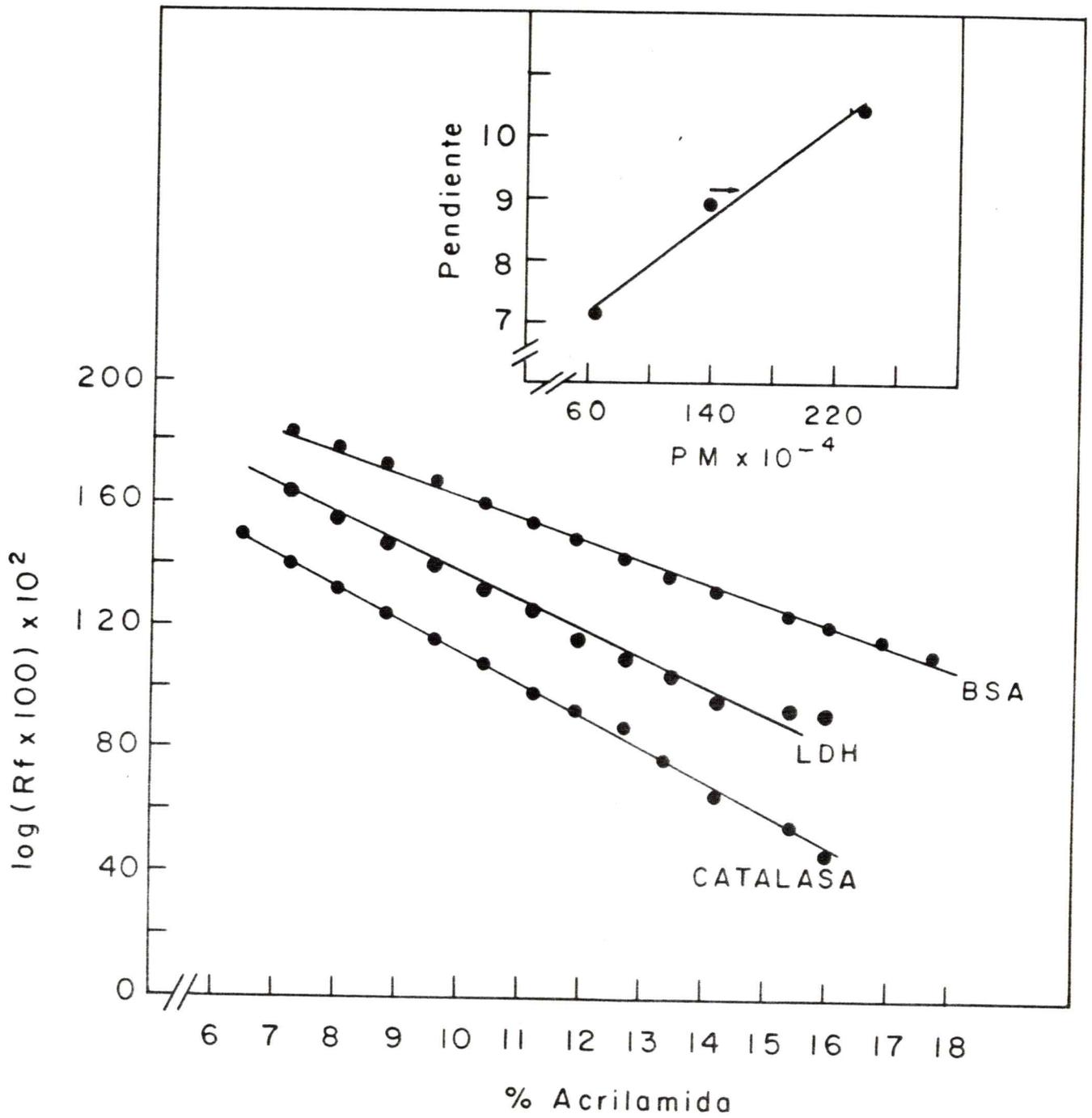


Figura 9: Determinación del peso molecular de eIF2 nativo purificado por el método B.

Se graficó el porcentaje de acrilamida en función del logaritmo (log) de la migración relativa de la proteína (Rf), multiplicado por 100, como lo indica el método de Hedrick y Smith (1968).

En el inserto se graficó la pendiente de cada recta obtenida para los patrones de peso molecular en función del peso molecular correspondiente. La flecha indica el valor de la pendiente obtenida para eIF2 cuyo valor fue de 9,2, lo que corresponde a un peso molecular de 160.000.

II. ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL FACTOR eIF₂ PURIFICADO DE OVARIO DE Xenopus laevis.

A. Fosforilación de las subunidades α y β de eIF₂ obtenido por los dos métodos de purificación

A las tres subunidades del factor eIF₂ se le asignaron las letras α , β y δ en el orden ascendente de sus pesos moleculares determinados en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Benne y col., 1976 y Tahara y col., 1978.). Sin embargo existen otros parámetros para identificar las subunidades de eIF₂ como son sus puntos isoeléctricos y la fosforilación de las subunidades α y β por dos proteína-quinasa diferentes. Se ha descrito que la subunidad α del factor eIF₂ de reticulocitos es fosforilada por dos proteína-quinasa presentes en este tejido: HCI y DAI, la primera activada en ausencia de hemina y la otra activada por RNA de doble cadena. Por otro lado la subunidad β es fosforilada por la caseína quinasa de tipo II.

Con el fin de identificar las subunidades del factor eIF₂ de oocitos se estudió la fosforilación de eIF₂ por HCl de reticulocitos y por caseína quinasa II de ovario de Xenopus laevis, en geles de poliacrilamida y con posterior autorradiografía. La preparación de HCl que estaba disponible, sin embargo, tenía una contaminación con caseína quinasa II de reticulocitos. Ambas quinasas copurifican a través de varias etapas de la purificación de HCl (Sierra, comunicación personal). Como se puede apreciar en la figura 10 las subunidades de peso molecular 38.000 y 50.000 son fosforiladas por HCl (canales 1 y 4) mientras que sólo la subunidad de peso molecular 50.000 es fosforilada por caseína quinasa II (canales 2 y 5). En el canal 3 se observa la inhibición de la fosforilación de la subunidad β por heparina. En esta autorradiografía se observa también la autofosforilación de HCl de peso molecular 90.000 y dos bandas de mayor peso molecular que pertenecen a la preparación de eIF₂, y que se fosforilan por caseína quinasa II.

Como se muestra en la figura 10B el factor eIF₂ purificado por el método A (canal 1) presenta una banda fosforilada por HCl correspondiente a la subunidad α

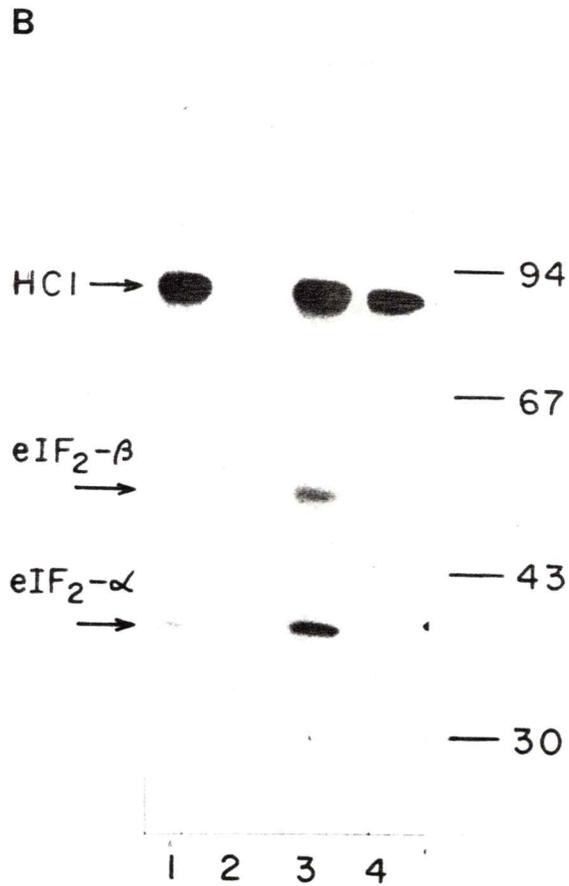
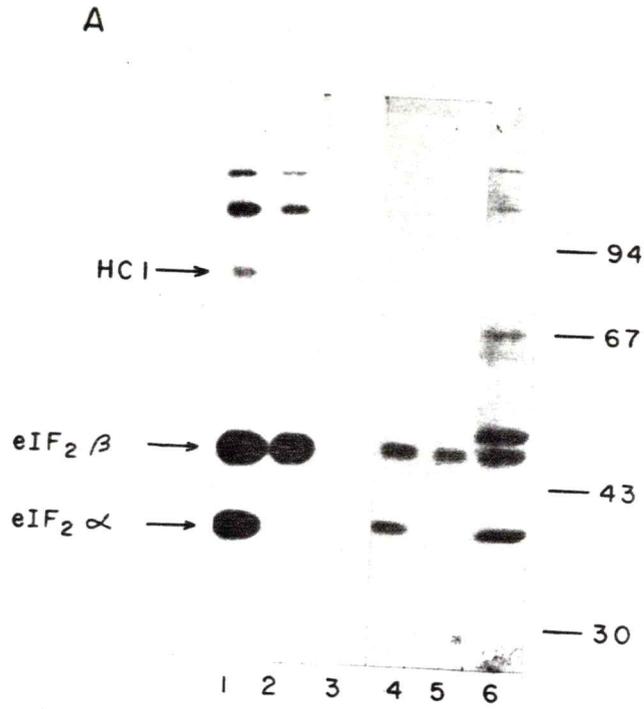


Figura 10: Fosforilación de eIF2 de ovario por HCl de reticulocitos y por caseína quinasa II de ovario.

0,6 μg de eIF2 purificado según el método B (A), o 0,5 μg de eIF2 purificado según el método A (B), se incubaron en presencia o ausencia de HCl, y de [γ - ^{32}P] ATP 100 μM , en un ensayo de fosforilación de proteínas como se describe en los métodos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Se muestra la autorradiografía de estos geles.

En A: canal 1: 0,6 μg de eIF2 (DE-120) + HCl.

canal 2: 0,6 μg de eIF2 (DE-120) + caseína quinasa II.

canal 3: igual al canal 2, mas heparina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los canales 4 y 5 contienen lo mismo que los canales 1 y 2, pero el tiempo de exposición de la autorradiografía fue ocho veces menor.

canal 6: 8 μg de eIF2 (DE-120), tinción azul de coomassie.

En B: canal 1: 0,5 μg de eIF2 (GG) + HCl

canal 2: 0,5 μg de eIF2 (GG), canal 3: 0,5 μg de eIF2 de reticulocitos + HCl, canal 4: HCl.

y de peso molecular 38.000 y no presenta una banda correspondiente a la subunidad β de peso molecular 50.000, que sí se encuentra en el factor de reticulocitos (canal 3). Debe mencionarse en este caso que el eIF₂ es mucho menos eficiente como sustrato para HCl y que esto permite que la autofosforilación de HCl sea mucho más notoria que la de la subunidad α de eIF₂. Lo inverso ocurre en la figura 10 A. No se pudo verificar la no fosforilación del factor eIF₂ de la preparación A por caseína quinasa, ya que en ese momento no se disponía de ella en el laboratorio.

La figura 11 muestra la fosforilación de la subunidad α de eIF₂ por HCl, en fracciones parcialmente purificadas y en la fracción más pura, obtenida por el método de purificación A. En esta autorradiografía se observa que la subunidad α sólo se fosforila en presencia de HCl y que en ninguna etapa de la purificación aparece una banda de fosforilación correspondiente a la subunidad β de eIF₂ (peso molecular 50.000) canales 1, 3 y 5.

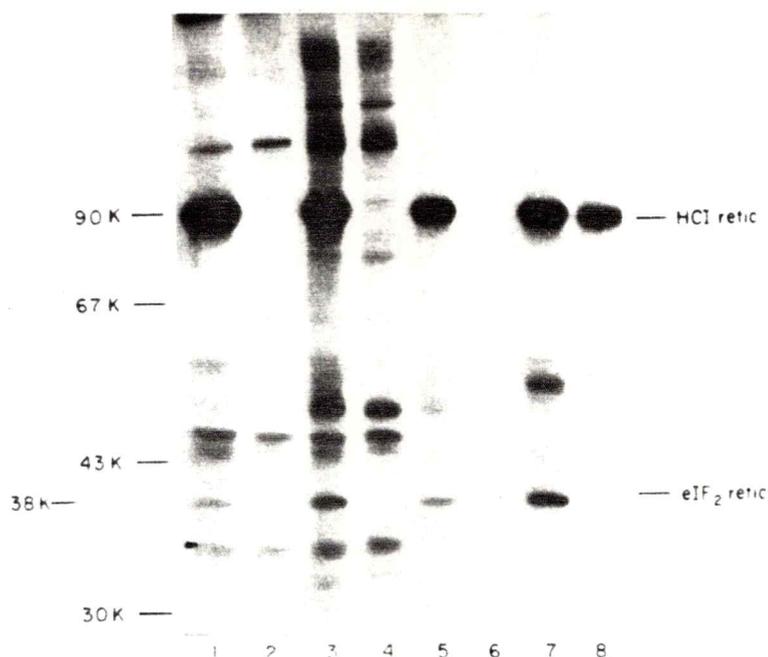


Figura 11 : Fosforilación de eIF₂ proveniente de diferentes fracciones de la purificación A, por HCl

Se tomaron fracciones de diferentes etapas de la purificación A y se incubaron en presencia de [γ -³²P] ATP 100 μ M y HCl de reticulocitos en un ensayo de fosforilación como se describe en los métodos. Las fracciones se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Se secó el gel y se sometió a autorradiografía.

canal 1: 30 μ g de DE-200 + HCl

canal 3: 10 μ g de HS-500 + HCl

canal 5: 0,5 μ g de GG + HCl

canal 7: 0,5 μ g de eIF₂ de reticulocitos + HCl

canal 8: HCl

Los canales 2, 4 y 6 tienen lo mismo que los canales 1, 3 y 5 pero no contienen HCl.

B Requerimientos de la reacción de formación de complejo ternario

1. Formación de complejo ternario en función de la concentración de GTP.

Se estudió la formación de complejo ternario en función de la concentración de GTP, con el fin de obtener la concentración de sustrato óptima para este ensayo. La figura 12 muestra la formación de complejo ternario por una fracción parcialmente purificada de eIF₂ en función de la concentración de GTP. Como se puede apreciar a una concentración de GTP de 50 μ M la reacción alcanza un 96% de la actividad máxima de formación de complejo ternario. Todos los experimentos de formación de complejo ternario se realizaron por lo tanto a esta concentración de GTP.

2. Formación de complejo ternario en función de la concentración de [³H]-metionil tRNA.

Se estudió la formación de complejo ternario en función de la concentración de [³H]-metionil-tRNA_i que es el segundo sustrato que participa en esta reacción. Como se muestra en la figura 13, la reacción presenta un máximo de actividad en presencia de 1 pmol de [³H]-metionil-tRNA_i en el ensayo, a una concentración de GTP de 50 μ M.

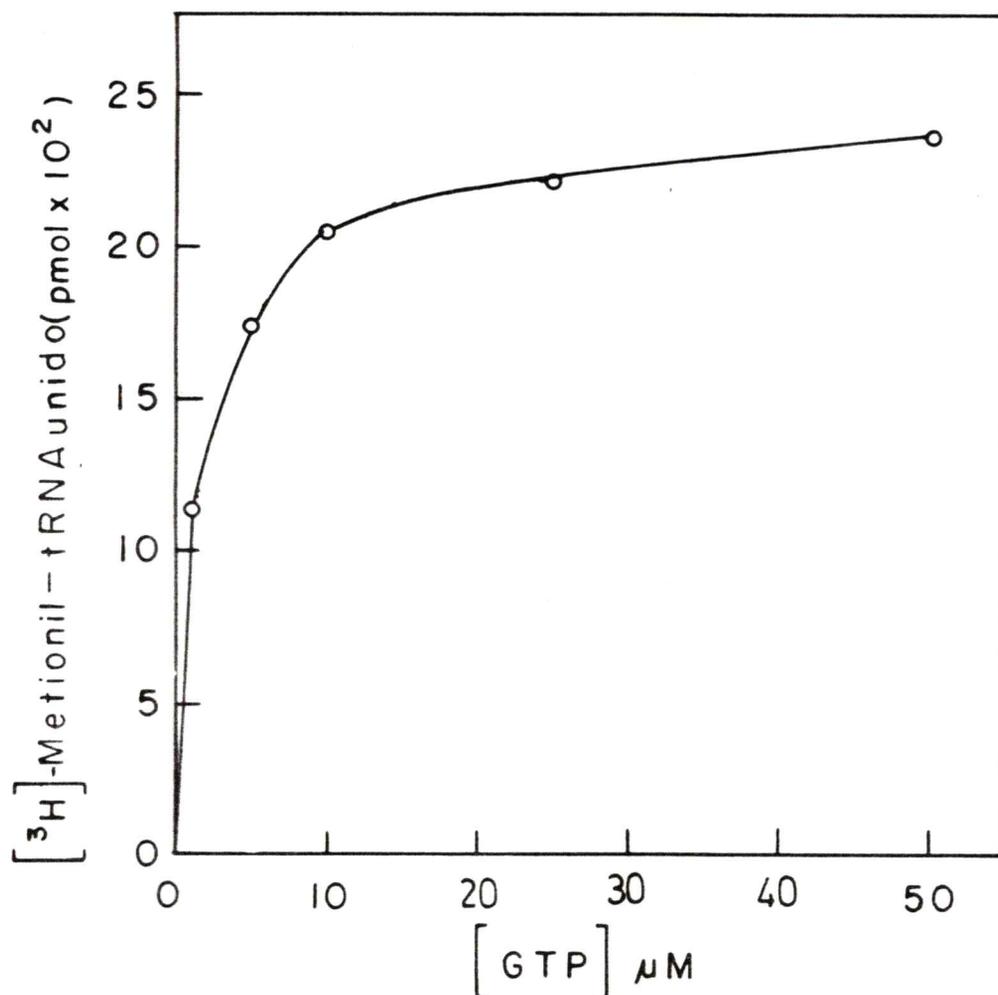


Figura 12: Formación de complejo ternario en función de la concentración de GTP

10 μg de la fracción HS-500 (preparación B) se incubaron en presencia $[^3\text{H}]$ -metionil tRNAi y diferentes concentraciones de GTP, y se midió la formación de complejo ternario luego de una incubación de 5 minutos a 37° . La formación de complejo ternario se cuantificó como se indica en los métodos.

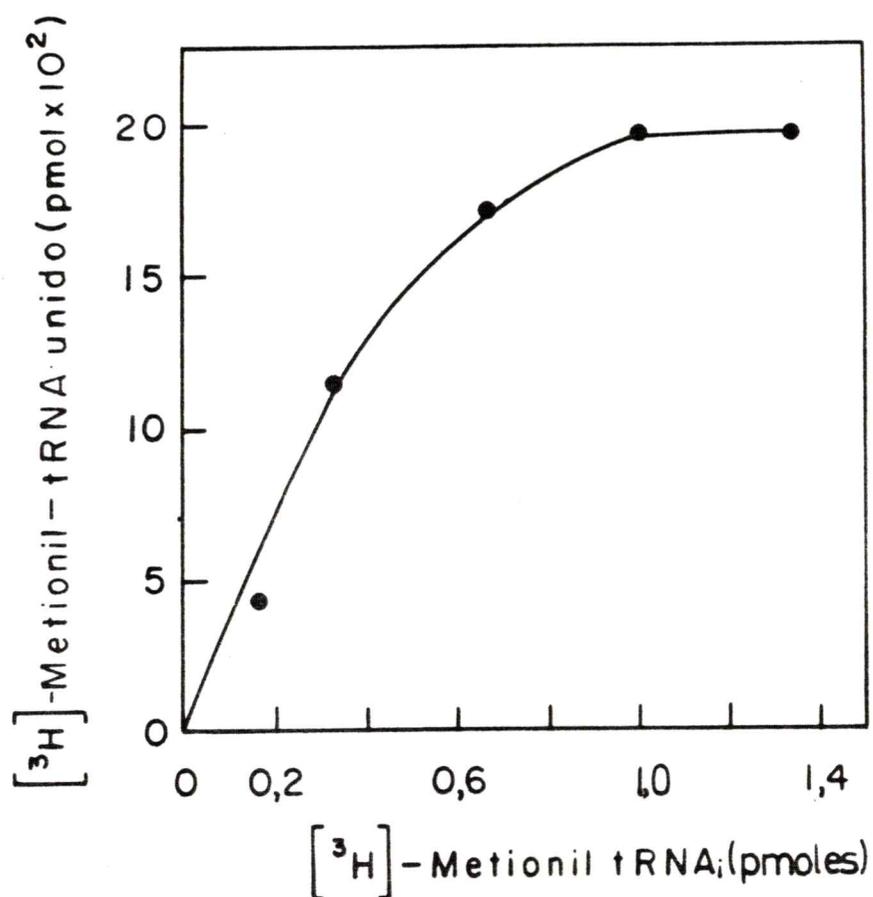


Figura 13: Formación de complejo ternario en función de la concentración de metionil tRNA_i

10 μ g de la fracción HS-500 (preparación B) se incubaron en presencia de GTP y diferentes concentraciones de [³H]-metionil tRNA_i, y se midió la formación de complejo ternario luego de una incubación de 5 minutos a 37°. Se cuantificó la formación de complejo ternario como se indica en los métodos.

3. Formación de complejo ternario en función de la concentración de KCl.

La reacción de formación de complejo ternario así como otras reacciones en la cual están involucrados los factores de la síntesis protéica requieren de KCl en concentraciones que varían entre 50 y 150 mM. La figura 14 muestra la formación de complejo ternario en función de la concentración de KCl encontrándose un óptimo de actividad a 150 mM en las condiciones del ensayo.

4. Efecto de la temperatura sobre la actividad del factor eIF₂

a. Efecto de la temperatura sobre la formación de complejo ternario.

Se estudió la formación de complejo ternario en función de la temperatura de incubación en un rango de 0 a 40°. Como se muestra en la figura 15, la temperatura óptima para la reacción de formación de complejo ternario, en las condiciones en que se realizó el ensayo resultó ser de 37°. Por lo tanto los ensayos de formación de complejo ternario se realizaron a 37°.

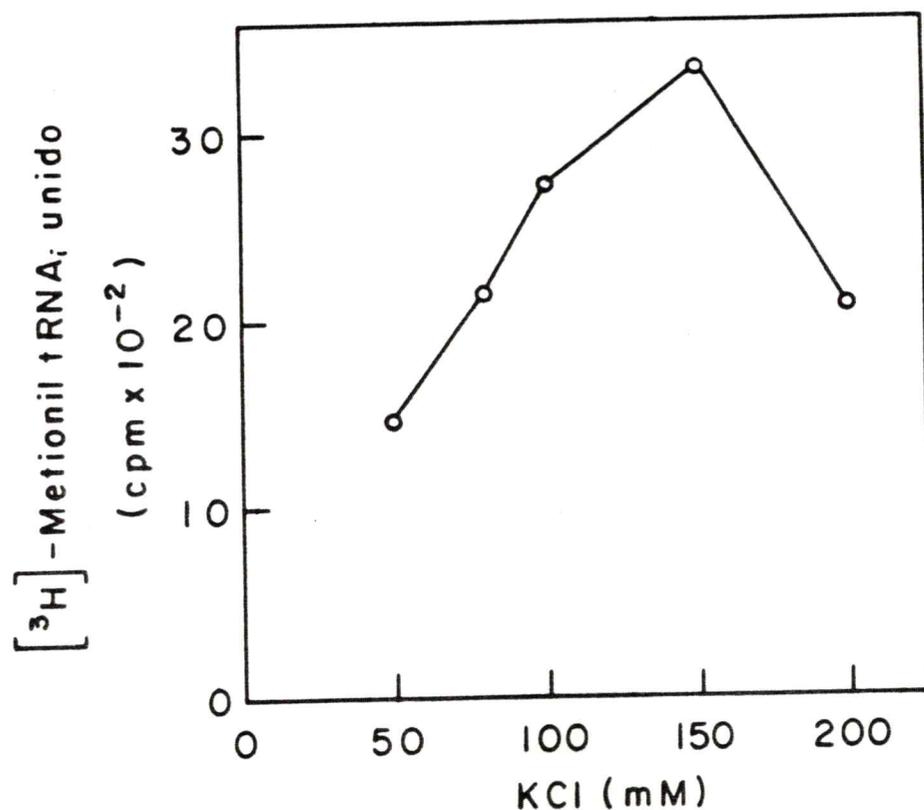


Figura 14: Formación de complejo ternario en función de la concentración de KCl.

30 μg de la fracción DE-200 (preparación A) se incubaron en presencia de GTP y [³H]-metionil tRNA_i, a diferentes concentraciones de KCl. Se midió la formación de complejo ternario luego de 5 minutos de incubación a 37^o, como se indica en los métodos.

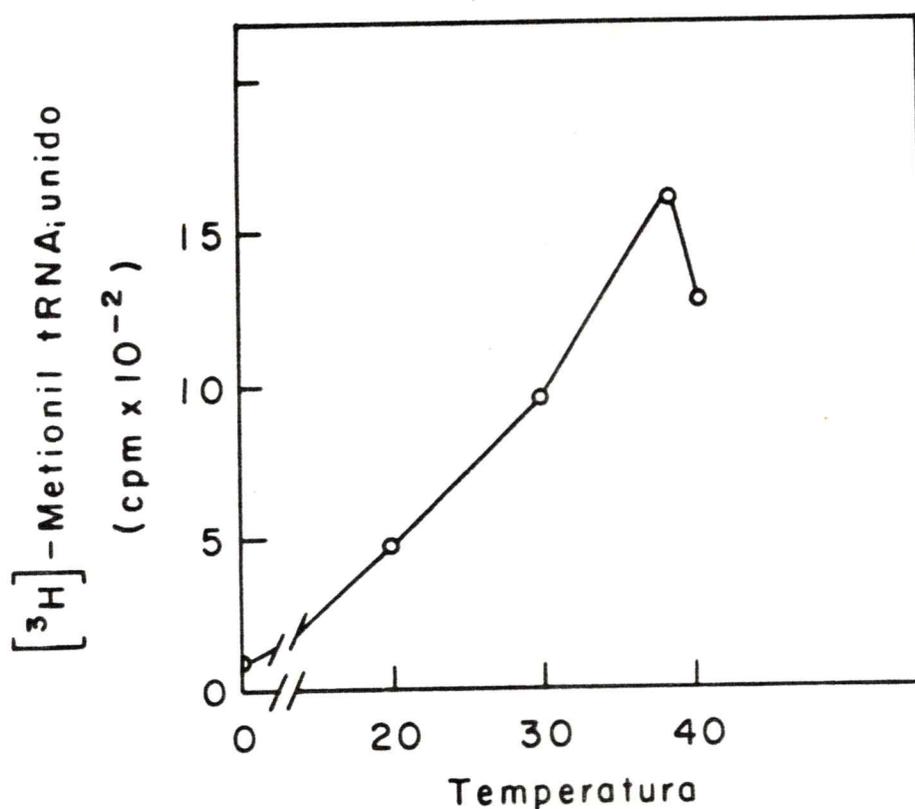


Figura 15: Efecto de la temperatura sobre la formación de complejo ternario.

30 μ g de la fracción DE-200 (preparación A) se incubaron en presencia de GTP y [³H]-metionil tRNA, a diferentes temperaturas. Luego de una incubación de 5 minutos, se midió la formación de complejo ternario como se indica en los métodos.

b. Efecto de la preincubación de eIF₂ a 37°, en la formación de complejo binario y complejo ternario.

Se preincubó el factor eIF₂ a 37° a diferentes tiempos y se determinó luego su actividad tanto en la formación de complejo binario como de complejo ternario. Como se muestra en la figura 16, la actividad de formación de complejo ternario es más afectada que la actividad de complejo binario, llegando a un 20% después de una hora de incubación en el primer caso y a un 65% de su actividad en el segundo caso. Este experimento fue realizado con el factor eIF₂ purificado por el método B. Cabe hacer notar que el factor eIF₂ purificado por el método A perdía su actividad para la formación de complejo ternario en un 100% luego de 30 minutos de incubación, tiempo en el cual el factor eIF₂ de la preparación B pierde sólo un 38% de su actividad. El hecho de que las actividades de formación de complejo ternario y de complejo binario tengan una sensibilidad diferente a la temperatura no es de extrañar puesto que la subunidad que une GTP y GDP es la subunidad α y la que une al metionil-tRNA_i es la subunidad γ . (Barrieux y Rosenfeld, 1977).

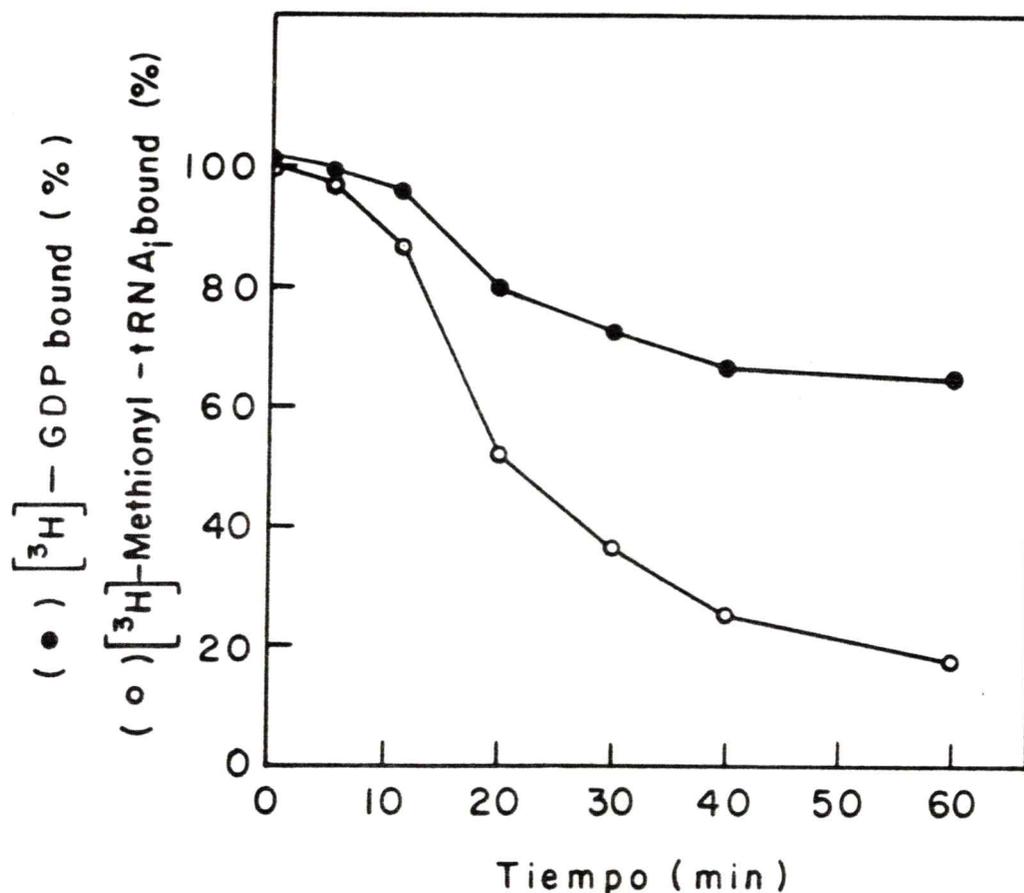


Figura 16: Efecto de la preincubación de eIF₂ a 37° sobre la formación de complejo ternario y complejo binario.

8 µg de la fracción DE-120 (preparación B) se incubaron a 37° por diferentes tiempos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que contenían 0,5µg de eIF₂ y se midió la formación de complejo ternario en presencia de GTP y [3H]-metionil-tRNA (○), o de complejo binario en presencia de [3H]-GDP (●). Se cuantificaron ambas reacciones como se indica en los métodos.

III. INTERACCION DEL FACTOR eIF₂ CON NUCLEOTIDOS DE GUANOSINA

A. Presencia de GDP unido a eIF₂ purificado

Luego de haber cumplido su función en la formación del complejo de iniciación 40s, el factor eIF₂ es liberado de los ribosomas produciéndose la hidrólisis del GTP. De esta forma se ha encontrado que el eIF₂ purificado de reticulocitos tiene unido GDP en una relación de 0,5 a 0,7 pmoles por pmol de eIF₂. (Siekierka y col, 1983).

Para estudiar la presencia de GDP unido al factor eIF₂ de ovario se trató éste con la enzima nucleósido difosfato quinasa, en presencia de [γ -³²P] ATP. De esta forma el GDP unido a eIF₂ es fosforilado, transformándose en GTP el que fue identificado en una cromatografía en PEI celulosa. Como se muestra en la figura 17 la fracción que contiene eIF₂ muestra la presencia de GTP radiactivo sólo cuando es incubado en presencia de nucleósido difosfato quinasa, indicando que el factor eIF₂ de ovario purificado tiene unido GDP. Además se ven en esta autorradiografía dos manchas contaminantes, una

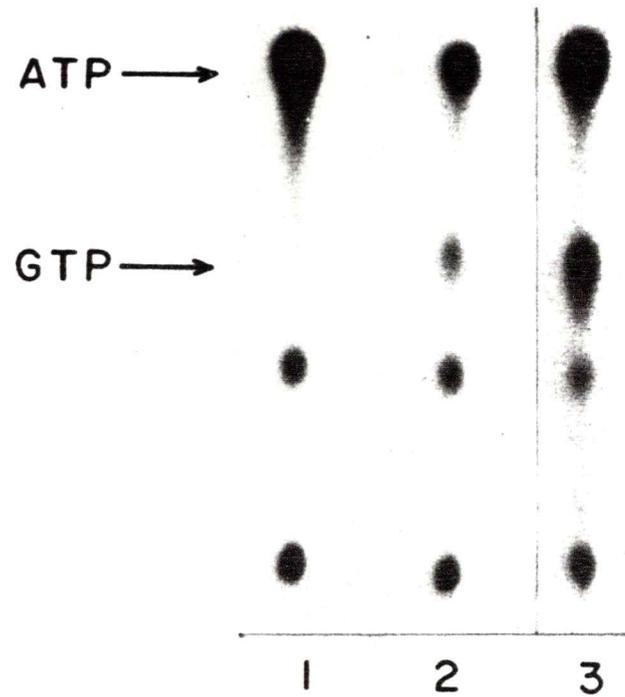


Figura 17: Determinación de la presencia de GDP unido a eIF₂

3 μg (21 pmoles) de eIF₂ (DE-120) se incubaron en presencia de 3 unidades de nucleósido difosfato quinasa (NDK) y [γ -³²P] ATP 10 μM (2.000 cpm/pmol), en una solución que contenía además: Hepes 20 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; KCl 100 mM. (volumen final 10 μl). Se incubó la mezcla a 30°C durante 30 minutos y 1 μl de esta se sometió a una cromatografía en PEI-celulosa utilizando KH₂PO₄ 1 M, pH 3,5, como solvente. Se realizó una autorradiografía de la placa cromatográfica que se muestra en esta figura. Para la cuantificación del GTP presente se cortó la mancha correspondiente y se determinó la radiactividad presente en un contador de centelleo líquido.

canal 1: 21 pmoles de eIF₂; canal 2: 21 pmoles de eIF₂ + NDK; canal 3: 30 pmoles de GDP + NDK.

que pertenece al origen de corrida de la muestra y otra que se ve en los tres canales que corresponde a un contaminante del [γ - 32 P] ATP.

Este resultado es de gran importancia en cuanto a la regulación de la iniciación de la síntesis protéica, como se discutió en la introducción.

Con el fin de cuantificar el GDP unido a eIF₂, se realizaron los cálculos que se indican en la tabla 6. Según estos cálculos el 40% del eIF₂ purificado de ovario tiene fuertemente unido GDP, lo que concuerda con los resultados antes obtenidos para eIF₂ de reticulocitos por Siekierka y col. (1983).

B. Determinación de las K_D aparentes para GDP y GTP

El hecho de que GDP esté fuertemente unido a eIF₂ aún después de su purificación, indica una alta afinidad de este nucleótido por eIF₂. Además el hecho de que se haya encontrado una diferencia de afinidad de 100 veces entre GDP y GTP para el factor eIF₂ de reticulocitos (Walton y Gill, 1975), llevó a determinar las K_D para GDP y GTP para eIF₂ de ovario. En la figura 18 se muestran las gráficas de Scatchard para la unión de ambos nucleótidos, a partir de las cuales se calcularon las

TABLA 6
CUANTIFICACION DE GDP UNIDO A eIF₂

SUSTRATO	PMOLES	RADIATIVIDAD ASOCIADA A GTP		GDP TOTAL (pmoles)	RAZON GDP:eIF ₂ O GDP ESTANDAR	
		(cpm)	(pmoles)		calculada	corregida
eIF ₂	21	1270	0,64	6,4	0,30	0,41
GDP	30	4030	2,02	20,2	0,67	1.00

La cantidad de GDP asociada a eIF₂ se calculó basándose en que el [γ -³²P] ATP colocado en el ensayo tenía una radiactividad específica de 2.000 cpm/pmol, y que se cuantificó sólo el 10% del total de la mezcla de reacción.

La razón GDP:eIF₂ se corrigió tomando en cuenta que la reacción ocurrió sólo en un 67% al colocar GDP como sustrato, de manera que sólo se logró cuantificar aproximadamente el 67% del GDP unido por fosforilación.

K_D . Como se puede apreciar la K_D para GDP resultó ser de $7,2 \cdot 10^{-8}$ M y para GTP de $3,8 \cdot 10^{-6}$ M. Por lo tanto en existe una diferencia apreciable en la afinidad para ambos nucleótidos que es de 53 veces. Cabe hacer notar que los valores de K_D calculados se realizaron en presencia de Mg^{+2} 1 mM ya que en esas condiciones y al tiempo de incubación ensayado, el intercambio del GDP que se encuentra unido a eIF₂ por el GDP libre es despreciable, como se muestra más adelante en la figura 23 D.

C. Inhibición competitiva por GTP y compuestos análogos de GDP y GTP, en la formación de complejo binario.

La interacción del factor eIF₂ con los nucleótidos de guanosina es una etapa muy importante en la iniciación de la síntesis protéica así como en la regulación de ella. Además la afinidad del factor eIF₂ por GDP y por GTP es significativamente diferente como se muestra en la figura 18. Pareció interesante estudiar la afinidad relativa de diferentes análogos de guanosina por el eIF₂. Para ello se incubó el factor eIF₂ en presencia de [³H] GDP 1 μ M en presencia de diferentes análogos de guanosina y se estudió su efecto

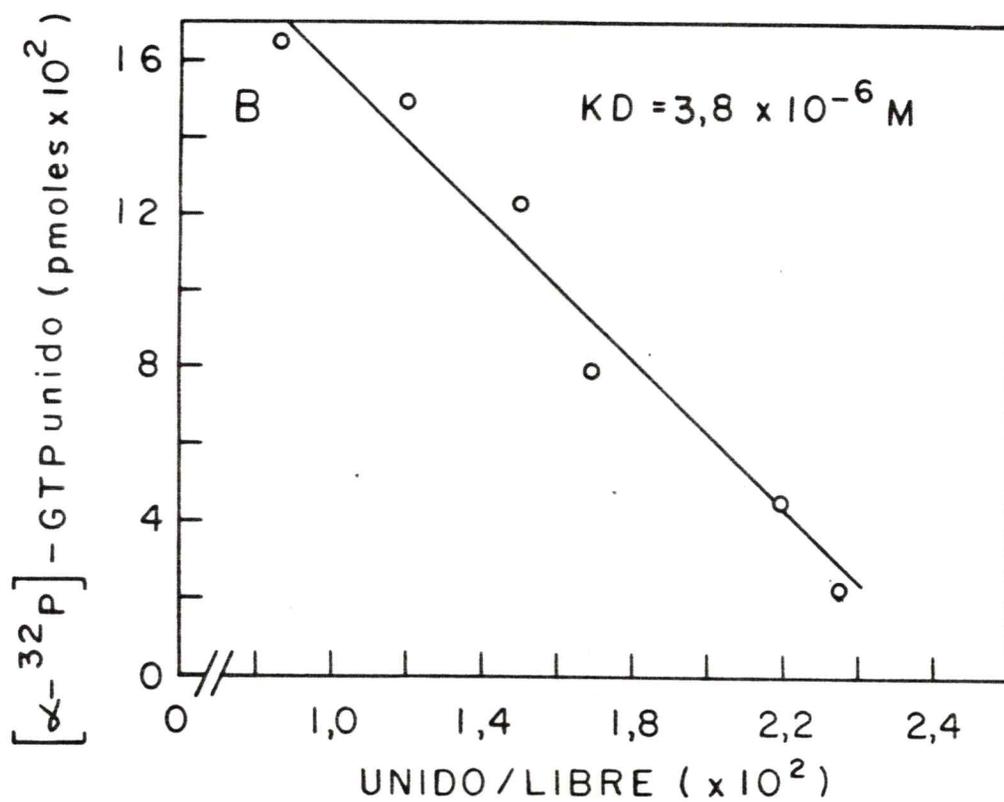
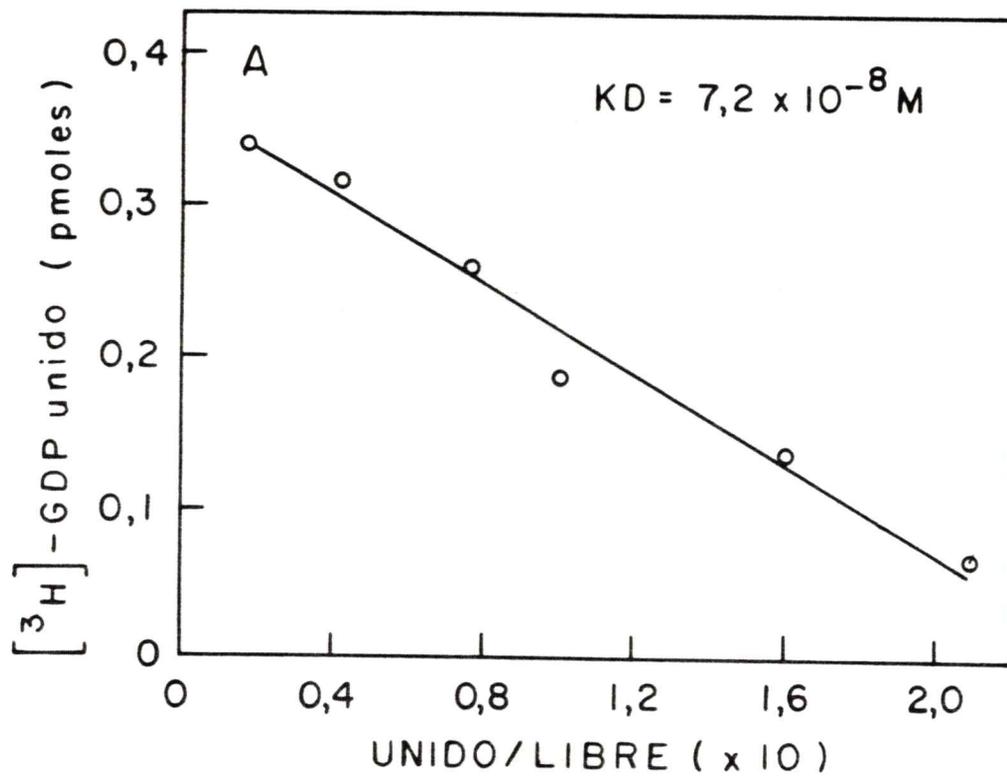


Figura 18: Determinación de K_D para GDP y GTP

18A: 1,2 pmoles de eIF₂ (DE-120) se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de [³H] GDP (8.000 cpm/pmol), y se midió la formación de complejo binario como se indica en los métodos, en presencia de MgCl₂ 1 mM. Se realizó una gráfica de Scatchard, y a partir de la pendiente de la recta obtenida se calculó la K_D para GDP.

18B: 0,5 pmoles de eIF₂ (DE-120) se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de [α -³²P] GTP ($1,2 \cdot 10^6$ cpm/ensayo), y se midió la formación de complejo binario como se indica en los métodos, en presencia de MgCl₂ 1 mM. Se realizó una gráfica de Scatchard, y a partir de la pendiente de la recta obtenida se calculó la K_D para GTP.

inhibitorio sobre la formación de complejo binario. Como se muestra en la figura 19 GDP- β -S tiene una afinidad 5 veces menor que GDP, y el GDP- β -F tiene una afinidad 20 veces menor. Por otra parte GTP- γ -S inhibe en un 50% la unión de [3 H] GDP a una concentración de 15 μ M, y pppGpC a una concentración de 40 μ M. De estos dos análogos GTP- γ -S presenta claramente una afinidad 3 a 4 veces mayor que GTP. GMP.P(NH)P, (GppNHp), inhibe un 50 % la unión de [3 H] GDP a una concentración (extrapolada) de 200 μ M, cuatro veces mayor que GTP. En resumen la afinidad relativa que presentan estos nucleótidos por eIF₂ es: GDP > GDP- β -S > GTP- γ -S > GDP- β -F > pppGpC > GTP > GppNHp.

Con el fin de completar estos resultados, se estudió la afinidad relativa de otros compuestos análogos de guanosina, con modificaciones en la ribosa, en la base nucleotídica y en la cadena de fosfatos. Para esto se utilizó una sola concentración que equivalía, en el caso de análogos de GDP, a la concentración de GDP que inhibe la formación de complejo binario (eIF₂-GDP) en un 80%; y para los análogos de GTP, a la concentración de GTP que inhibe la formación de complejo binario (eIF₂-GDP) en un

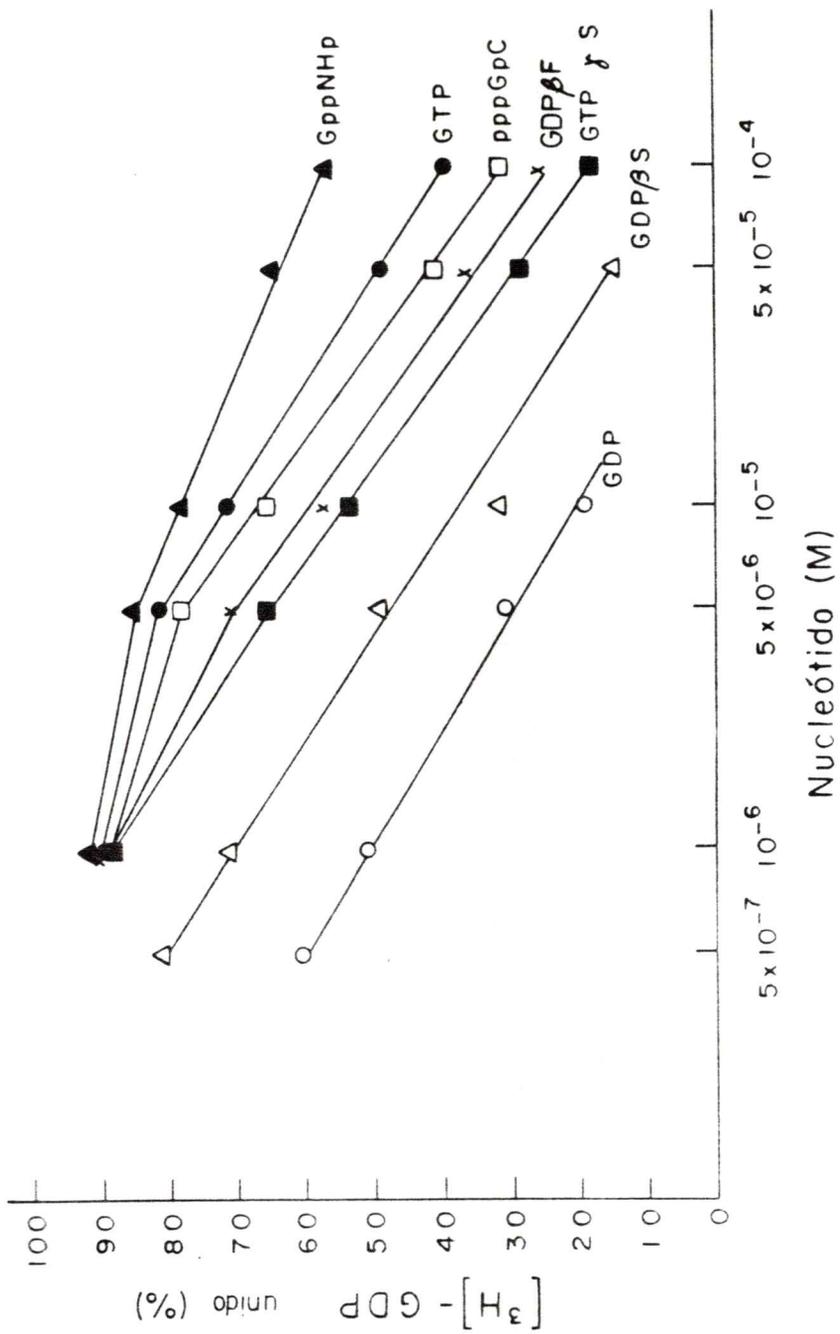


Figura 19: Inhibición competitiva por GTP y por análogos de GDP y GTP en la formación de complejo binario.

0,6 ug de eIF₂ (DE-120) se incubaron en presencia de [³H] GDP 1 uM (8.000 cpm/pmol) y diferentes concentraciones de GDP (○), GDP-β-S (Δ) GDP-β-F (x), GTP-γ-S (■), GTP (●), pppGpC (□), GppNHp (▲). Se midió la formación de complejo binario eIF₂-[³H] GDP como se indica en los métodos, en presencia de MgCl₂ 1 mM.

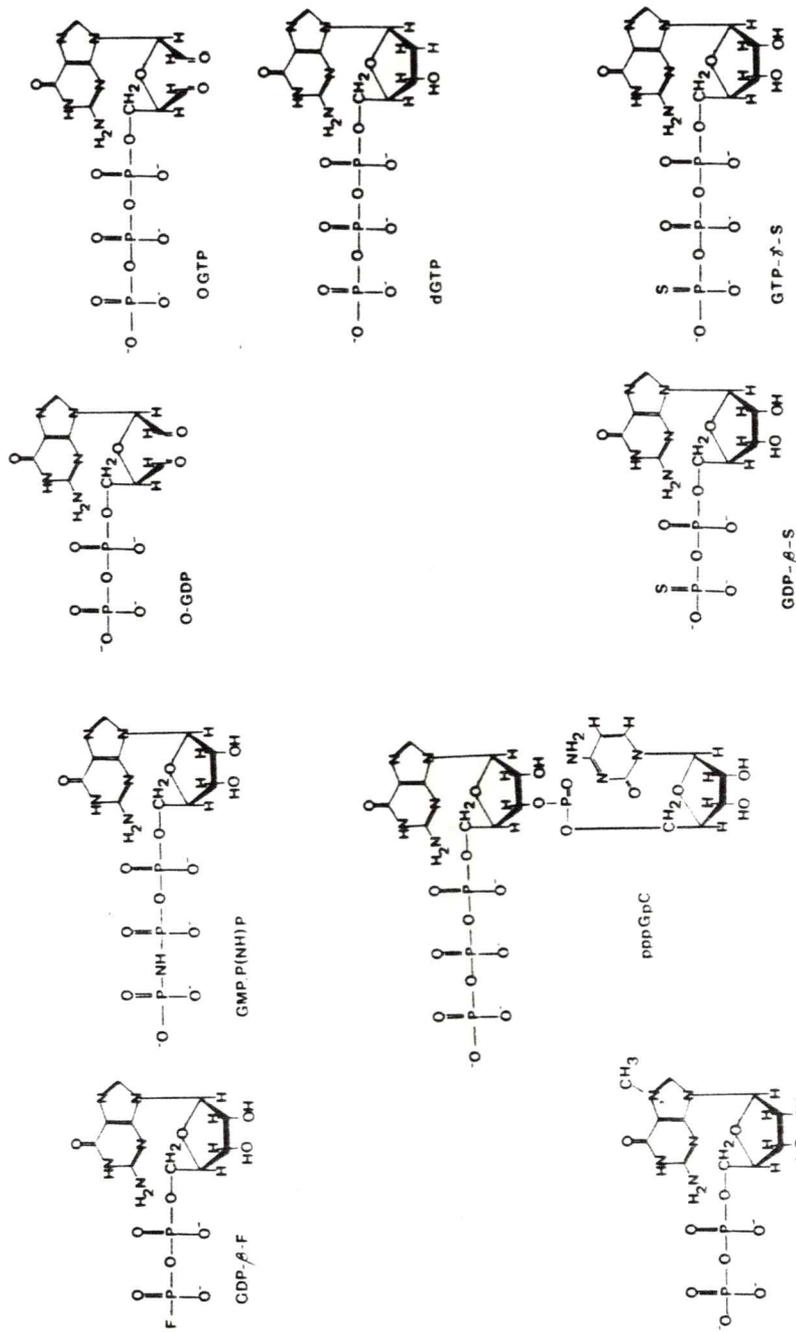


Figura 20

TABLA 7
 COMPETENCIA DE NUCLEOTIDOS DE GUANOSINA
 POR LA FORMACION DE COMPLEJO BINARIO

NUCLEOTIDO AGREGADO	[³ H] GDP UNIDO (pmoles)	% CONTROL
nada	0,8	100
GDP (10 μ M)	0,16	20
7mGDP (10 μ M)	0,73	92
α GDP (10 μ M)	0,46	57
UDP (50 μ M)	0,75	94
ADP (50 μ M)	0,76	95
GTP (100 μ M)	0,28	35
dGTP (100 μ M)	0,27	34
α GTP (100 μ M)	0,6	76

0,6 μ g de eIF₂ (DE-120) se incubaron en presencia de [³H] GDP 1 μ M y diferentes análogos de guanosina. Se midió la formación de complejo binario eIF₂-[³H]-GDP como se indica en los métodos, en presencia de MgCl₂ 1 mM.

65%. Como se muestra en la tabla 7, 7mGDP prácticamente no inhibe la unión de GDP a una concentración a la cual GDP inhibe en un 80%. oGDP inhibe a esta misma concentración sólo en un 43%. dGTP presenta un comportamiento similar a GTP inhibiendo la unión de GDP en un 66%, sin embargo oGDP lo hace con menor eficiencia llegando a un 24% de inhibición solamente.

D. Inhibición de la formación de complejo ternario por análogos de GDP

Se estudió el efecto de GDP y sus análogos sobre la formación de complejo ternario. Como se muestra en la figura 21, GDP inhibe la formación de complejo ternario en un 63%, GDP- β -S en un 58%, oGDP sólo en un 25% y 7mGDP no inhibe la formación de complejo ternario a las concentraciones estudiadas. Estos resultados corroboran aquellos obtenidos en la figura 19 y en la tabla 7, indicando una afinidad relativa para los análogos de GDP de: GDP > GDP- β -S > oGDP >> 7mGDP. Sin embargo la inhibición observada con estos nucleótidos es menor que la esperada tomando en cuenta su afinidad relativa con GTP.

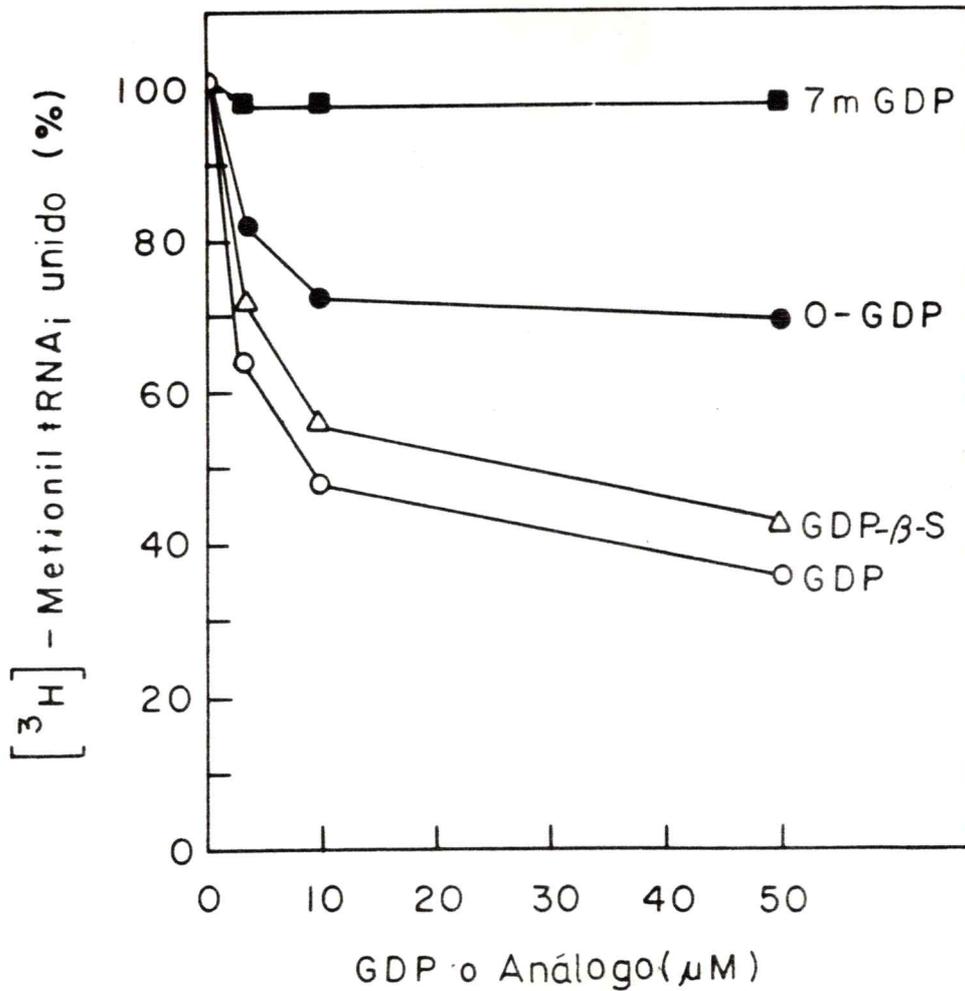


Figura 21: Inhibición de la formación de complejo ternario por análogos de GDP

1,4 μg de eIF₂ (DE-120), se incubaron en presencia de [³H]-metionil tRNA_i y GTP, agregando diferentes concentraciones de : GDP (o), GDP- β -S (Δ), oGDP (●) y 7mGDP (■). Se midió la formación de complejo ternario eIF₂-GTP-[³H]-metionil - tRNA, como se indica en los métodos.

E. Formación de complejo ternario utilizando diferentes análogos de GTP

Pareció también necesario determinar la eficiencia de los análogos de GTP en la formación de complejo ternario, que es el primer paso en la iniciación de la traducción. Como se muestra en la figura 22, GTP, GppNHp, GTP- γ -S y dGTP forman complejo ternario con eIF₂ y metionil-tRNA_i con eficiencias muy similares. oGTP forma complejo ternario con una eficiencia relativa de un 70% aproximadamente con respecto a GTP, sin embargo pppGpC, que presenta una afinidad relativa similar a GTP en la formación de complejo binario, muestra una eficiencia relativa de sólo un 55% en la formación de complejo ternario. A este respecto debe mencionarse que las mediciones de complejo ternario fueron realizadas con incubaciones de 5 minutos, tiempo en el cual la reacción ha llegado al equilibrio, al menos cuando se utiliza GTP como sustrato.

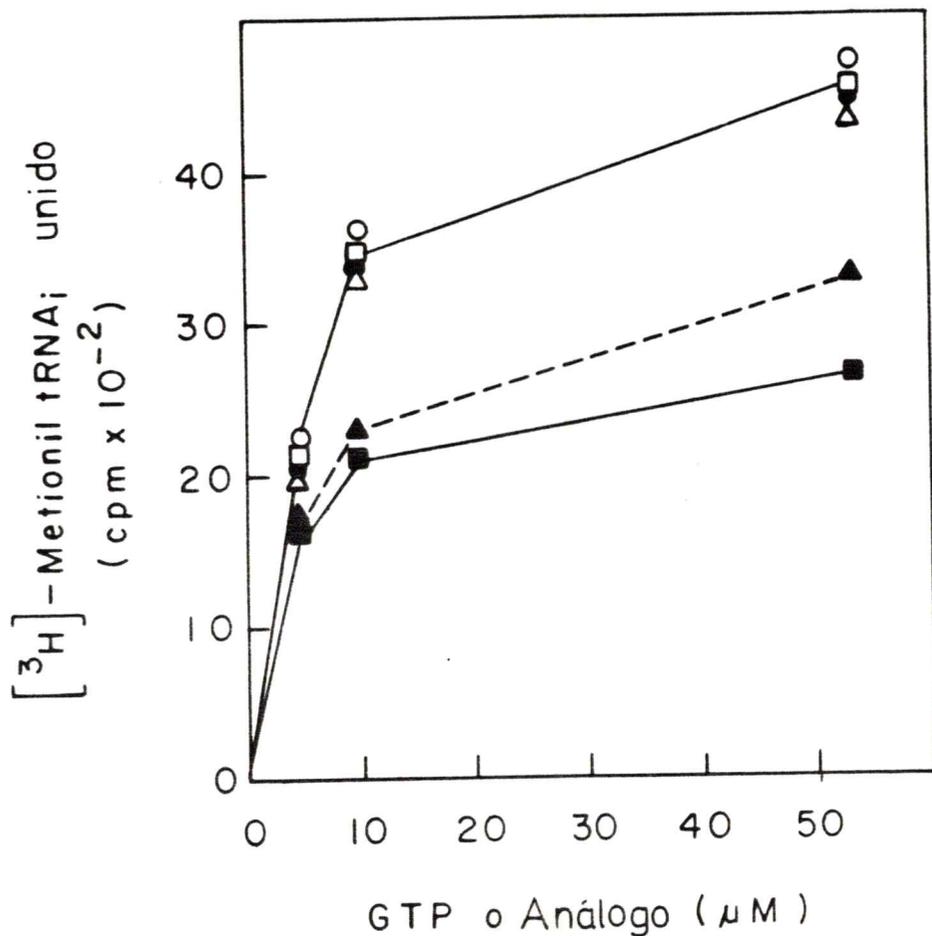


Figura 22: Formación de complejo ternario utilizando diferentes análogos de GTP como sustrato

1,4 μg de eIF₂ se incubaron en presencia de [³H]-metionil-tRNA_i y diferentes concentraciones de GTP (●), GTP- γ -S (○), dGTP (◻), GppNHp (△), oGTP (▲) y pppGpC (■). Se midió la formación de complejo ternario eIF₂-[³H]-metionil-tRNA-nucleotido, como se indica en los métodos.

F. Recambio de nucleótidos unidos al factor eIF₂ de ovario.

1. Inhibición de la formación de complejo ternario por Mg⁺².

Estudios realizados con eIF₂ de reticulocitos han determinado que el Mg⁺² causa una inhibición de la formación de complejo ternario y que esta inhibición puede ser revertida al agregar el factor protéico llamado Co-eIF₂ (Das y col 1979).

Pareció importante, del punto de vista de la regulación de la síntesis protéica en oocitos, estudiar el efecto de Mg⁺² en dos preparaciones de eIF₂ de oocitos: una fracción parcialmente purificada (HS-500) y la fracción mas pura (DE-120). Como se muestra en la figura 23 la formación de complejo ternario medida en la preparación mas pura (DE-120) fue inhibida en un 80% a una concentración de Mg⁺² de 1mM, mientras que la preparación menos pura (HS-500) no mostró una inhibición por Mg⁺².

Estos resultados, similares a aquellos encontrados para eIF₂ de reticulocitos, sugieren que en la preparación mas cruda podría existir algún factor que revierta la inhibición causada por el Mg⁺².

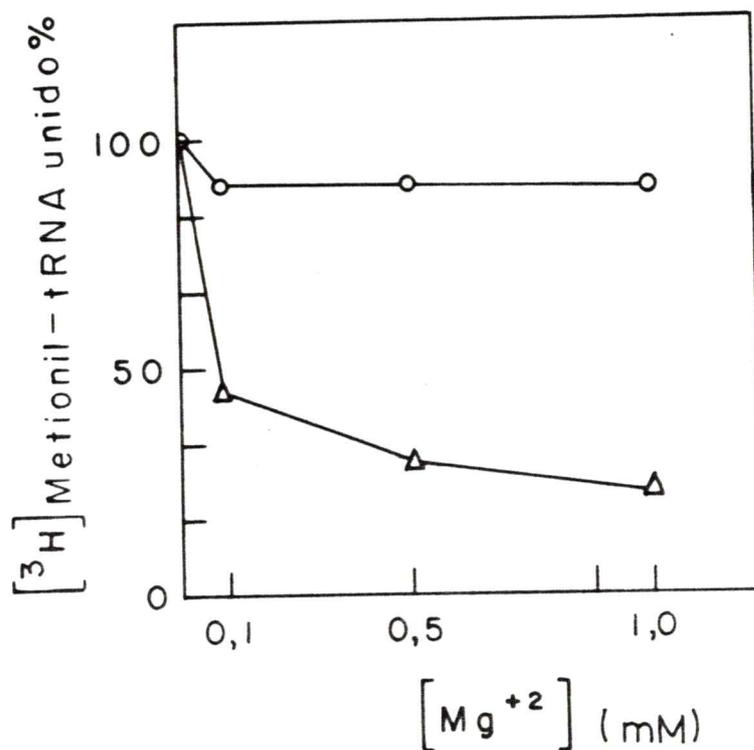


Figura 23: Inhibición de la formación de complejo ternario por Mg^{+2}

1,4 μg de eIF_2 , DE-120 (Δ) o HS-500 (\circ), se incubaron en presencia de $[^3\text{H}]$ -metionil-tRNAi y GTP, a diferentes concentraciones de Mg^{+2} entre 0,1 y 1 mM. Se midió la formación de complejo ternario como se indica en los métodos.

2. Estudios de intercambio de GDP en fracciones de diferente grado de purificación que contienen eIF₂

Como ha sido mostrado previamente el factor eIF₂ de ovario tiene GDP unido en un 40% de sus moléculas. Además este factor posee una afinidad por GDP 50 veces mayor que por GTP. Como la primera etapa en la iniciación de la traducción es la formación del complejo ternario y para ello se requiere del intercambio de GDP por GTP, pareció importante estudiar el intercambio de estos nucleótidos en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg⁺².

Para estudiar el intercambio de guanosina se utilizó GDP en reemplazo de GTP dado que como ha sido demostrado por Chauduri y col. (1981), el complejo binario de eIF₂ con GTP es muy inestable en ausencia de metionil-tRNA_i.

Se realizó este estudio en cuatro fracciones de la purificación B de ovario: LR40-60, CM-360, HS-500 y DE-120.

Como se muestra en la figura 24 las fracciones menos purificadas muestran un intercambio de GDP apreciable en el tiempo en que se realizó el ensayo, tanto en presencia como en ausencia de Mg⁺². Sin embargo la

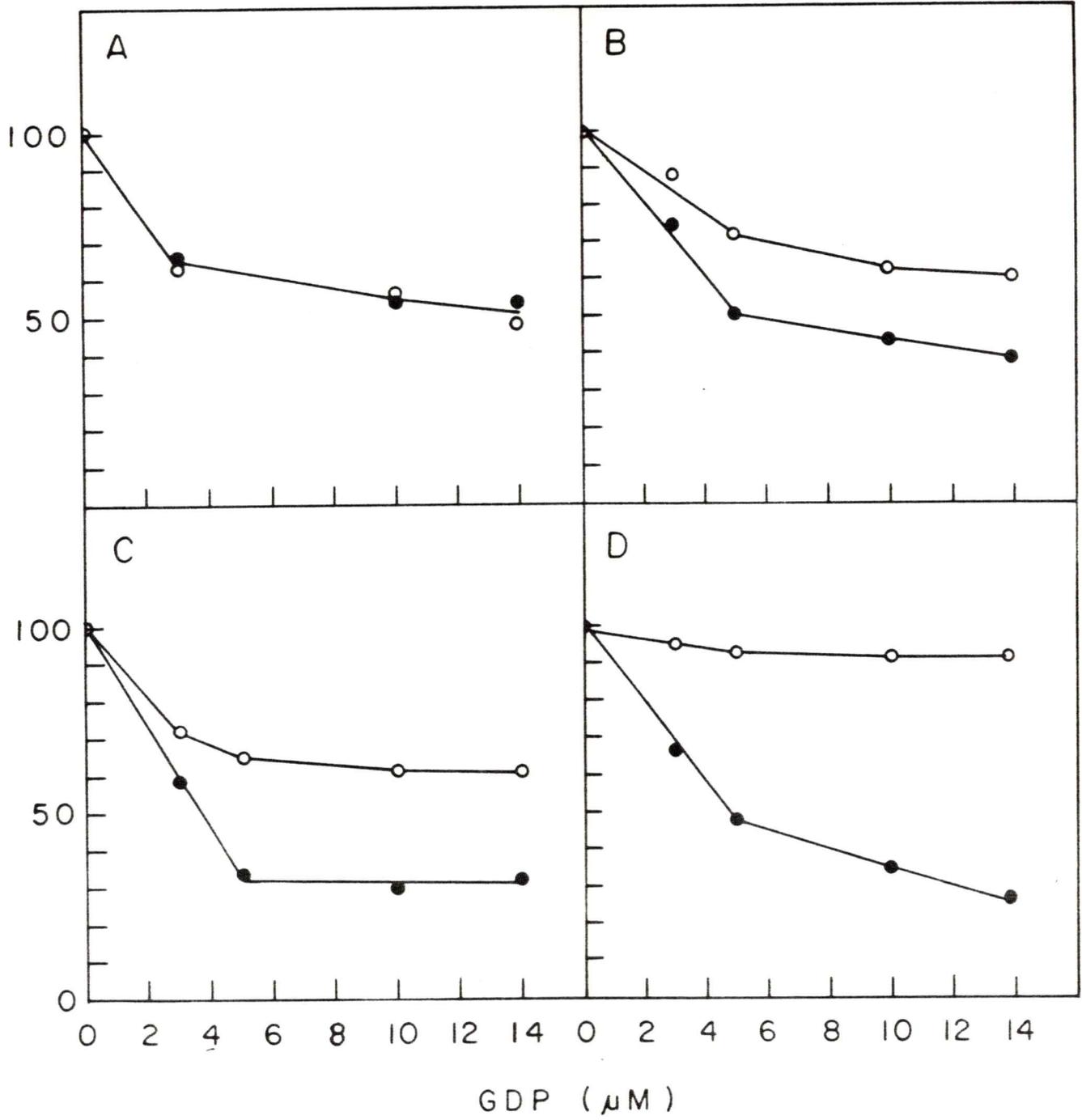


Figura 24: Intercambio de GDP en fracciones de diferente grado de purificación que contienen eIF₂

Se tomaron diferentes fracciones de la preparación B que contenían eIF₂ de ovario, y se incubaron en presencia de [³H] GDP 1 μM. A los 5 minutos de incubación se agregó diferentes concentraciones de GDP frío y MgCl₂ 1mM (○). Se midió la formación de complejo binario eIF₂-[³H] GDP remanente, como se indica en los métodos. Los controles fueron realizados en ausencia de MgCl₂ (●).

A: 100 μg de LR40-60, B: 20 μg de CM-360, C: 12 μg de HS-500 y D 0,6 μg de DE-120.

fracción mas purificada, DE-120, muestra una velocidad de intercambio apreciable sólo en ausencia de Mg^{+2} , siendo despreciable en ausencia de este catión.

3. Búsqueda de un probable factor de recambio de GDP en fracciones de ovario.

Los resultados anteriores llevaron a la búsqueda de un probable factor protéico responsable del intercambio de GDP en las fracciones menos purificadas. Con este fin se incubaron diferentes cantidades de la fracción no retenida de la columna de DEAE celulosa (NR-DE) en presencia de eIF₂ purificado (DE-120). Los resultados se muestran en la figura 25 e indican que la fracción NR-DE no es capaz de restablecer el intercambio de nucleótidos que se vió para la fracción proveniente de la etapa previa de purificación. Es probable que de existir un factor de recambio haya quedado retenido en la columna o se haya inactivado.

Se intentó buscar en una fracción menos purificada como CM-360 la existencia de un factor de recambio de nucleótidos. Para ello se midió el intercambio de [³H] GDP por GDP frío en la fracción CM-360 y en la fracción DE-120, en forma separada y luego juntando ambas fracciones. Como se muestra en la tabla 8 el intercambio

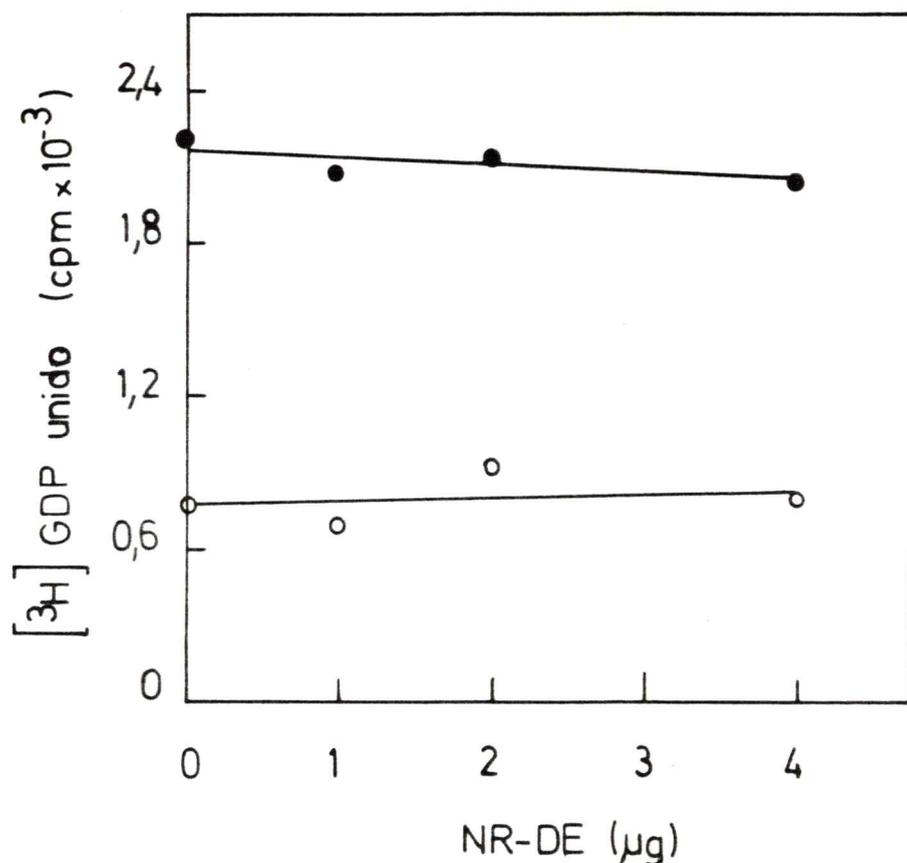


Figura 25: Búsqueda de un probable factor de recambio de GDP en la fracción no retenida de la DEAE-celulosa (B).

0,6 µg de eIF₂ purificado (DE-120) se incubaron en presencia de [³H] GDP 1 µM durante 5 minutos. Luego se agregó MgCl₂ 1 mM (●), diferentes cantidades de la fracción no retenida de la DEAE celulosa (NR-DE) entre 0,8 y 4 µg y GDP 15 µM. Se midió la formación de complejo binario eIF₂-[³H] GDP remanente como se indica en los métodos. Los controles se realizaron de la misma forma pero en ausencia de MgCl₂ (○).

TABLA 8
 BUSQUEDA DE UN PROBABLE FACTOR DE RECAMBIO EN
 LA FRACCION CM-360

FRACCION	[³ H] GDP UNIDO DESPUES DEL RECAMBIO (cpm)	
	en ausencia de GDP +Mg ⁺²	en presencia de GDP +Mg ⁺² -Mg ⁺²
DE-120	10692	9496 2418
CM-360	3178	1307 834
DE-120 + CM-360	13698	10349 2936
Valor teórico	13870	10803 3252

1 μg de DE-120 o 4,2 μg de CM-360, se incubaron en presencia de [³H] GDP 1 μM , en forma separada o ambos juntos, durante 5 minutos a 30°. Luego se agregó GDP frío 15 μM y MgCl₂ 1 mM a cada ensayo, y se midió la formación de complejo binario remanente eIF₂-[³H] GDP como se indica en los métodos. Se realizaron dos tipos de controles: a uno no se le agregó MgCl₂ durante la segunda incubación, y al otro no se le agregó GDP frío.

El valor teórico fue calculado sumando las dos primeras filas de resultados que contienen los valores obtenidos con ambas preparaciones por separado.

de GDP medido cuando se juntan las fracciones DE-120 y CM-360 se obtiene solamente un valor aditivo del recambio sin evidencias de algún factor en la fracción cruda que pudiera estimular el recambio de GDP de la fracción purificada (tabla 8). Resultados similares se obtuvieron al estudiar el recambio de GDP juntando eIF₂ purificado de reticulocitos de conejo y la fracción CM-360.

IV. ESTUDIOS SOBRE FOSFORILACION DE eIF₂, COMO UNA POSIBLE FUNCION REGULADORA DE LA SINTESIS PROTEICA

1. Presencia de una proteína-quinasa en extractos de ovario capaz de fosforilar eIF₂ de Artemia salina

Para la búsqueda de una eIF₂-quinasa en extractos de ovario se utilizó como sustrato eIF₂ purificado de Artemia salina, ya que en ese momento no se disponía de un eIF₂ de ovario, puro. Como se muestra en la figura 26 la subunidad de eIF₂ de Artemia salina, de peso molecular 40.000 es fosforilada por una proteína quinasa proveniente de diferentes fracciones de ovario. Cuando se ensayaron estas fracciones posteriormente con eIF₂ purificado de ovario, ya disponible, no se encontró fosforilación de la subunidad α de este eIF₂. Cabe hacer

notar que la subunidad α de eIF₂ de reticulocitos de conejo tampoco es fosforilada por estas fracciones.

Resultados similares han sido obtenidos por García-Mateu (comunicación personal) utilizando larvas de Drosophila melanogaster. Si bien el factor eIF₂ de Artemia salina es fosforilado por fracciones parcialmente purificadas de Drosophila melanogaster, el factor eIF₂ purificado de esta misma fuente no lo es.

2. Microinyección de HCl en oocitos aislados y su efecto en la síntesis protéica

Como fue mostrado anteriormente en la figura 10 el factor eIF₂ de ovario es fosforilado por HCl de reticulocitos en la subunidad α de peso molecular 38.000. Tomando en cuenta que la fosforilación por HCl es específica para eIF₂ en la subunidad α , pareció interesante estudiar el efecto de la microinyección de HCl en la síntesis protéica en oocitos aislados. Para ello se realizaron dos ensayos diferentes que se muestran en la tabla 9: uno, en el cual se microinyectó HCl intacto, y otro en el cual HCl fue inactivado previamente por medio de un tratamiento con oATP que es capaz de unirse covalentemente a algunas proteína-quinasas.

Antes de microinyectar HCI se comprobó que éste tuviera inhibida su actividad quinásica, para lo cual se realizó el ensayo que se muestra en la figura 27. Como se puede observar oATP inactiva en un 60% la actividad fosforilante de eIF₂ (canal 3), medido con respecto al control que fue tratado en las mismas condiciones pero sin agregar oATP (canal 2). Al compararlo con la actividad de HCI intacto (canal 1) la actividad quinasa de HCI tratado con oATP está inhibida en un 80%. Cabe hacer notar que la fracción de HCI que se utilizó en el canal 2 se diluyó a la mitad por efecto de la filtración por Sephadex, y por ello disminuyó también su actividad quinasa a la mitad.

Como se muestra en la tabla 9 HCI intacto es capaz de inhibir la síntesis proteica in vivo en un 40 % en ambos casos. Cabe hacer notar que la misma cantidad de HCI que fue microinyectada en oocitos es capaz de inhibir la síntesis proteica en un sistema libre de células, de lisados de reticulocitos, en un 50%. Los resultados de la tabla 9 muestran también que HCI inactivado con oATP no es capaz de inhibir la síntesis proteica. En esta tabla se observa además que HCI que no ha sido tratado con oATP, y que sólo ha sido filtrado por Sephadex, aun es capaz de inhibir la síntesis proteica en un 28%.

Se intentaron estudios de fosforilación de eIF₂ de oocitos in vivo, microinyectando HCl en conjunto con [α -³²P]-ATP y realizando luego una electroforesis en presencia de SDS y autorradiografía, pero no fue posible detectar la fosforilación de la subunidad α de eIF₂, ni de ninguna otra proteína. Es probable que la cantidad de eIF₂ presente en el oocito sea muy pequeña para ser detectada en preparaciones tan crudas, y por ello no se logró detectar su fosforilación.

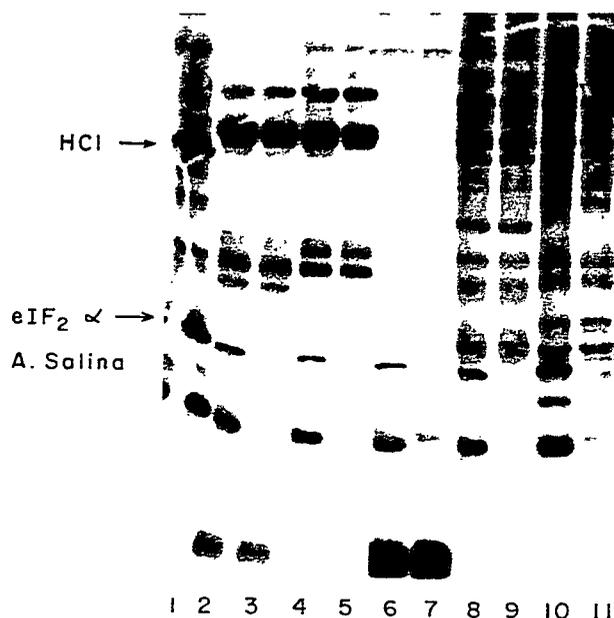


Figura 26: Fosforilación de eIF₂ de Artemia salina por fracciones de ovario.

Diferentes fracciones provenientes de ovario se incubaron en presencia (o ausencia) de 0,5 μg de eIF₂ de Artemia salina y [γ -³²P] ATP 100 μM , en un ensayo de fosforilación como se describe en los métodos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y posteriormente a autorradiografía, como se indica en los métodos.

Canal 1: eIF₂ A.salina + HCl, canal 2: eIF₂ A.salina + 40 μg de Lavado ribosomal de alta sal (ovario) canal 4: eIF₂ A.salina + 30 μg de LR40-60, canal 6: eIF₂ A.salina + 150 μg de sobrenadante 160.000*g, canal 8: eIF₂ A.salina + 80 μg de S40-60, canal 10: eIF₂ A.salina + 30 μg de DE-200 (preparación A). Los canales 3, 5, 7, 9 y 11, contienen las mismas fracciones de ovario que los canales 2, 4, 6, 8 y 10 sin eIF₂ de A.salina. Las flechas indican la autofosforilación de HCl (90.000d) y la fosforilación de la subunidad α de A. salina. (40.000).

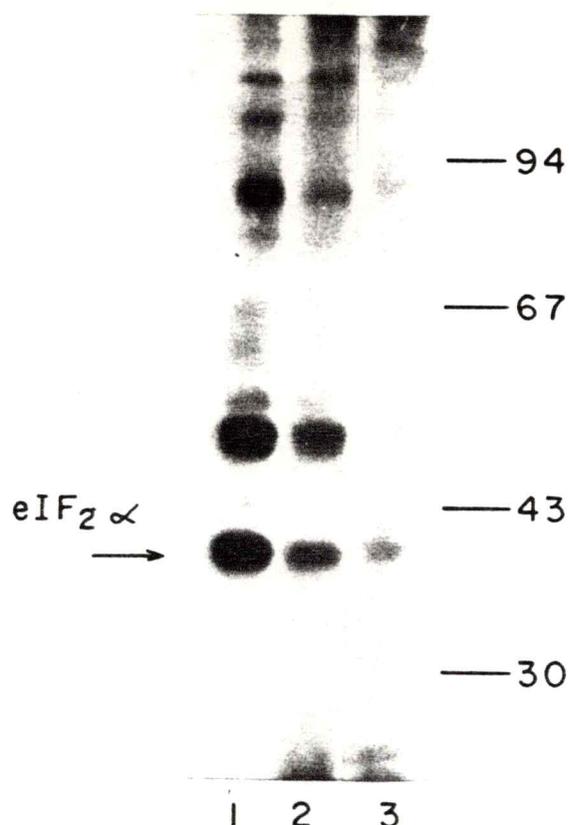


Figura 27: Fosforilación de eIF₂ de ovario por HCl y HCl inactivado por α ATP.

0,5 μ g de eIF₂ (DE-120) fueron incubados en presencia de HCl, HCl control o HCl inactivado y [γ -³²P] ATP en un ensayo de fosforilación como se describe en los métodos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, y posteriormente a autorradiografía. Canal 1: eIF₂ + HCl, canal 2: eIF₂ + HCl control canal 3: eIF₂ + HCl inactivado.

La inactivación de HCl se realizó preincubando la proteína en presencia de α ATP 300 μ M a 37 $^{\circ}$ durante 15 minutos y posteriormente filtrando esta fracción por Sephadex G-50 para la eliminación del nucleótido, como se describe en los métodos. HCl control, fue sometido a este mismo tratamiento pero sin agregarle α ATP.

TABLA 9
EFECTO DE LA MICROINYECCION DE HCI EN LA SINTESIS
PROTEICA EN OOCITOS AISLADOS

MICROINYECCION	[¹⁴ C]-LISINA INCORPORADA (pmoles)	% CONTROL
Ensayo 1:		
nada	3,2	100
amortiguador I	3,02	94
HCl (10 ng)	1,9	59
cicloheximida	0,9	28
Ensayo 2:		
nada	3,86	-
amortiguador I	3,04	100
HCl (10 ng)	1,83	60
HCl control (5ng)	2,23	72
HCl inactivado con oATP (5 ng)	2,98	98

Tabla 9: Efecto de la microinyección de HCl en la síntesis proteica en oocitos aislados.

Ensayo 1: se microinyectaron 50 nl de HCl (10 ng), o 50 nl de amortiguador I (amortiguador en el cual se encuentra HCl), y se incubaron los oocitos en grupos de 5 en solución salina de Barth por 30 minutos a 22°. Luego se agregó [14C]-lisina 20 μ M y se incubó nuevamente por otros 30 minutos a 22°. Se detuvo la reacción agregando ácido tricloroacético al 10% y se cuantificó la radiactividad como se indica en los métodos. Cada experimento se realizó en triplicado.

Ensayo 2: Las condiciones de incubación fueron iguales a las del ensayo 1. Se microinyectó en cada oocito 50 nl de HCl intacto (10 ng), 50 nl de amortiguador I, 50 nl de HCl control (tratado en las mismas condiciones que la fracción inactivada por oATP pero sin agregar el nucleótido) o 50 nl de HCl inactivado por oATP.

DISCUSION

I. PURIFICACION DEL FACTOR eIF₂ DE OVARIO DE Xenopus laevis

A. Comportamiento cromatográfico del factor eIF₂ de ovario.

El factor eIF₂ ha sido purificado de diferentes tejidos por diferentes métodos de purificación. Estos métodos incluyen normalmente cromatografías de intercambio iónico, como DEAE-celulosa, fosfocelulosa, carboximetil Sephadex e hidroxapatita; separación por peso molecular, como filtración por Sephadex y gradiente de glicerol; y también columnas de semiafinidad como heparina sefarosa y RNA celulosa. (Meth. Enzymol. 60). El tipo de cromatografía empleado en cada purificación y el orden en que se han utilizado varían en cada caso.

El comportamiento cromatográfico del factor eIF₂ de ovario en las diferentes etapas de las purificaciones A y B en general es similar al de los otros eIF₂ purificados, indicando que sus propiedades

electricas y su estructura, son similares.

Un hecho que llama la atención es el aumento del rendimiento durante la primera cromatografía, en ambas purificaciones. Este aumento podría deberse a la existencia en el extracto de un inhibidor específico de la formación de complejo ternario, o de un inhibidor inespecífico como ribonucleasas que hidrolicen al metionil-tRNAi, o bien desacilasas que descarguen al metionil-tRNA hidrolizando el enlace entre la metionina y la última base del tRNA. Este fenómeno, de aumento de rendimiento, no ha sido descrito para otras purificaciones de eIF2.

B. Rendimiento de ambas purificaciones y actividad específica

La actividad específica que se obtuvo a lo largo de toda la purificación e incluso con el factor que muestra una pureza electroforética de un 90%, es entre 2 y 7 veces menor que la actividad específica de la mayoría de los factores eIF2 purificados hasta el momento, como por ejemplo el de reticulocitos de conejo (Benne y col. 1976) y el de Drosophila melanogaster (G.Mateu, 1987). En general la actividad específica de otros factores eIF2 varía

entre 300 y 1500 unidades por mg de proteína. La actividad específica de este eIF₂ de ovario resultó ser de 192 unidades por mg de proteína. Esta actividad de eIF₂ de ovario se midió en condiciones óptimas de temperatura, pH, tiempo de incubación y concentración de los componentes de la reacción. Además el rendimiento total no indica una pérdida de actividad mayor que la de otras purificaciones de eIF₂, con mayor actividad específica. Tomando en cuenta todos estos hechos existen dos posibles explicaciones para la baja actividad específica obtenida desde el comienzo de la purificación: una, es que el factor eIF₂ se inactive en gran medida durante la homogeneización, y la segunda es que el eIF₂ de ovario posea alguna modificación química, fosforilación, metilación o ADP-ribosilación, por ejemplo, que mantenga inactivo gran parte de él, y que no permita cuantificarlo en la formación de complejo ternario. El oocito es una célula que debe tener una cantidad de material biológico de reserva para la posterior división celular y crecimiento, y por lo tanto es probable que tenga una parte del eIF₂ como material de reserva en forma inactiva. Con respecto a este punto cabe hacer notar que la actividad de formación de complejo binario muestra una actividad específica alrededor de 6 veces mayor que para la formación de complejo ternario

(tabla 5). La actividad específica obtenida en este caso es similar a la actividad específica obtenida en la formación de complejo ternario de eIF₂ de reticulocitos, por ejemplo.

El rendimiento real de la purificación de la actividad que forma complejo binario no puede calcularse debido a la existencia de otros factores que unen GDP, diferentes de eIF₂, y que se van perdiendo durante la purificación.

C. Comparación entre la purificación A y B y la estructura de eIF₂.

El hecho de obtener un factor eIF₂ con la subunidad β en la purificación B, comprueba los resultados de otros autores que han purificado un factor eIF₂ con tres subunidades. Además el hecho de que este resultado se obtenga al agregar benzamidina 30 mM sólo durante la homogeneización del tejido, lo que no se hizo durante la purificación A, apoya la idea de que la subunidad β sería especialmente sensible a proteólisis (Mitsui y col., 1981). La efectividad de la benzamidina como inhibidor de proteasas, ha sido demostrado por C. Connelly en nuestro laboratorio, en la purificación de la fosfodiesterasa de

nucleótidos cíclicos de ovario de Xenopus laevis, y por Loten y col. (1980), en la purificación de esta misma enzima en hepatocitos de rata.

No se pudo comparar ambos factores eIF₂ en alguna de sus propiedades principales en forma simultánea, debido a que estas dos preparaciones fueron realizadas con un año de diferencia. Sin embargo se ve claramente por los datos de peso molecular, (figuras 4 y 9), de electroforesis en geles desnaturantes (figuras 5 y 6) y por los estudios de fosforilación con HCl y caseína quinasa II, que el factor eIF₂ obtenido de la purificación A no tiene subunidad β y el de la purificación B si la tiene.

En cuanto a otras propiedades, se puede decir que ambos factores eIF₂ son capaces de formar complejo ternario con GTP y metionil-tRNA con la misma eficiencia, en vista de las actividades específicas obtenidas de ambas purificaciones (tablas 2 y 4). Para ambos factores la formación de complejo ternario es inhibida por Mg⁺². No se puede realizar una comparación de la actividad específica de los dos eIF₂ obtenidos a lo largo de la purificación ya que para cada una se siguió un esquema diferente de purificación.

Según muestra la figura 10, el factor eIF₂ proveniente de la purificación B, es al parecer mejor

sustrato para la fosforilación de su subunidad α por HCl que aquél proveniente de la purificación A. Esta diferencia podría arrojar alguna importancia a la subunidad β en la fosforilación de eIF₂, aunque habría que estudiar este efecto en mayor detalle.

Otra diferencia entre los dos eIF₂ (A y B) se refiere a su comportamiento en DEAE-celulosa. Claramente el factor eIF₂ eluye a 180 mM KCl en la preparación A, (figura 2), sin embargo en la preparación B el factor eluye a 120 mM KCl en esta misma cromatografía. Esto puede deberse a la presencia de la subunidad β en el segundo caso, o a que el orden en que se utilizó esta cromatografía no fue el mismo en ambas preparaciones. En todo caso la diferencia de conductividad no es extraordinaria ya que en las diferentes preparaciones descritas para eIF₂ de otras especies, este eluye en DEAE-celulosa a pH 7,5-7,6 entre 120 y 180 mM KCl.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis demuestran claramente que el factor eIF₂ de ovario de Xenopus laevis consta de tres subunidades, α de 38.000 d, β de 50.000 d, y γ de 52.000 d, determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS. El peso molecular para el factor nativo es de 160.000, determinado por electroforesis en gradiente

de poliacrilamida. De todas las purificaciones de eIF₂ descritas, esta es la primera que describe la obtención de dos factores eIF₂ con diferente estructura, para el mismo tejido y además complementa los resultados de Mitsui y col. (1981), que demostraron que la subunidad β es sensible a proteólisis.

Si bien está claramente demostrado que la subunidad β pertenece al factor eIF₂, en aquellos que poseen tres subunidades, la función de ésta no ha sido aún esclarecida. Además se sabe que la subunidad β es fosforilada por caseína quinasa II, sin alterar la función del eIF₂ en la traducción en lisados de reticulocitos o en la formación de complejo ternario (Tahara y col., 1978, y Siekierka y col. 1982).

Así como ocurre para el factor eIF₂ de reticulocitos nativo y parcialmente proteolizado, existe también una diferencia de estabilidad aparente para los dos factores eIF₂ purificados de ovario. Aunque no se realizó un estudio detallado con el factor purificado en A, se observó que este perdía un 50% de su actividad al ser guardado por 12 horas a 40°, y perdía el 90% de su actividad al incubarlo durante 30 minutos a 37°, lo que ocurría en menor grado para el factor eIF₂ proveniente de la purificación B.

II. UNIÓN DE eIF₂ A NUCLEÓTIDOS DE GUANINA

A. Determinación de K_D para GDP y GTP.

Los valores de K_D obtenidos para GDP y GTP (figura 18) concuerdan, en orden de magnitud, con aquellos obtenidos por Walton y Gill (1975) para el eIF₂ de reticulocitos, siendo éste el único valor de K_D publicado hasta el momento. Los valores de K_D calculados para eIF₂ de ovario son aproximados debido a que se ha comprobado que parte del eIF₂, 40%, tiene GDP unido. No se puede eliminar el GDP unido por los métodos descritos para otras proteínas ya que en esas condiciones el factor se inactiva rápidamente. De todas formas los estudios de unión se realizaron en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg⁺², ya que en esas condiciones la diferencia de afinidad del factor eIF₂ por GDP y GTP es de 100 veces. (Walton y Gill, 1975). En presencia de 1mM Mg⁺² el recambio de GDP unido a eIF₂ por GDP libre, es despreciable como se muestra en la figura 24-D, de manera que las K_D calculadas en estas condiciones tendrían un menor error.

Los datos de la literatura sobre K_D para otras proteínas que unen GDP y/o GTP con alta afinidad muestran valores de 10⁻⁸ M, del mismo orden de magnitud del valor encontrado para GDP en este estudio.

PROTEINA	K _D (M)	REFERENCIA
Tubulina	GTP: $2,2 \times 10^{-8}$ GDP: $5,5 \times 10^{-8}$	Zeeberg y Kaplow (1979)
Factor de elongación Tu	GDP: $3,0 \times 10^{-9}$	Miller y Weissbach (1970)
Proteína p21	GTP: $2,5 \times 10^{-8}$ GDP: $6,0 \times 10^{-8}$	Manne y col. (1984)
eIF ₂ de reticulocitos	GDP: $3,0 \times 10^{-8}$	Walton y Gill (1975)

B. Presencia de GDP unido a eIF₂

La alta afinidad que presenta el factor eIF₂ de ovario por GDP concuerda con el hecho de que este factor presente parte de sus moléculas unidas a GDP (figura 17).

Esto es muy importante en relación con la regulación de la iniciación de la síntesis protéica como se mencionó en la Introducción, y además es similar a lo que ocurre con el factor eIF₂ de reticulocitos (Siekierka y col. 1983), la proteína G_o de cerebro (Ferguson y col. 1986), la proteína p21 (ras) (Poe y col. 1985) y tubulina (Jacobs y col. 1974), entre otras. A diferencia de otras proteínas G, eIF₂ tiene sólo parte de sus moléculas unidas a GDF, que en el caso de eIF₂ de ovario es un 40 %. Esto es factible conociendo la función que desempeña este factor, como se muestra en el esquema I.

Valores similares se han descrito para eIF₂ de reticulocitos (Siekierka y col. 1983) y recientemente para eIF₂ de Drosophila melanogaster, por G. Mateu y col. (1987).

Existen otros métodos espectrofotométricos descritos para cuantificar nucleótidos unidos a proteínas pero en este caso no pudieron utilizarse debido a que se requiere una cantidad de eIF₂ que no se disponía. En todo caso el método utilizado, ha sido comparado con otros métodos clásicos y ha resultado ser eficiente para este caso (Siekierka y col. 1983)

C. Estudios de afinidad relativa con diferentes análogos de GDP y GTP

1. Análogos con modificación en la ribosa.

Entre estos análogos se estudió el dGTP que es un análogo natural, y que mostró una afinidad relativa muy similar a GTP. Sin embargo los dos análogos 2' y 3' dialdehído, oGDP y oGTP, mostraron una apreciable disminución de afinidad por eIF₂, tanto en la formación de complejo binario, en la inhibición de la formación de complejo ternario y en la formación de complejo ternario (Tabla 7 y figuras 21 y 22). Según estos resultados se puede sugerir que la integridad del anillo furanosílico de la ribosa, cumple un papel importante en la afinidad del nucleótido por la proteína. Si bien la afinidad de ambos nucleótidos es menor que GDP y GTP respectivamente, el hecho de que estos dos nucleótidos se unan a eIF₂ podría ser de gran utilidad para realizar estudios de marcación por afinidad, o inactivar el factor. Se ha observado que este tipo de derivados una vez ligado al sitio de unión específico de la enzima o proteína, puede formar uniones covalentes de tipo base de Schiff entre un grupo aldehído y el grupo ϵ -amino de una lisina (Easterbrook-Smith, 1976).

Otro tipo de modificación en la ribosa que se estudió fue la adición de una citosina en posición 3'OH para formar el dinucleótido pppGpC. Los resultados de las figuras 19, 21 y 22 muestran que este análogo tiene una muy buena afinidad en la formación de complejo binario, similar a GTP. Sin embargo pppGpC forma complejo ternario con menor eficiencia siendo de un 65% de la afinidad del GTP. La razón de esta diferencia puede deberse a que su mayor tamaño y carga negativa adicional podría alterar la unión del metionil-tRNA_i al eIF₂. Cabe hacer notar que con el factor de elongación-1 ocurre algo muy similar. Este factor tiene una afinidad por pppGpC similar a GTP para formar complejo binario, pero sin embargo al utilizarlo en la formación de complejo ternario su eficiencia es un 40% menor que la de GTP (Allende y col. 1978). El factor de elongación Tu sin embargo muestra una afinidad menor por pppGpC que por GTP en la formación de complejo binario.

2. Análogo metilado

La metilación del GDP en la posición 7 causa un efecto dramático en cuanto a su afinidad por eIF₂. Como se muestra en la tabla 10 y en la figura 21 el 7mGDP parece no interactuar con el factor eIF₂ en el sitio que

une GTP y GDP. Esta modificación es de especial interés pues ocurre fisiológicamente en la estructura "cap" del extremo 5' de la mayoría de los mRNA de eucariontes. Se ha detectado que alguna subunidad del factor eIF4-F tiene afinidad por estos análogos metilados 7mGDP y 7mGTP y probablemente también por la estructura "cap". Este factor tendría como función la unión del terminal 5' de los mRNA permitiendo una correcta iniciación de la traducción. (Moldave, 1985).

Se sabe que el eIF2 interactúa con los mRNA, ya que es capaz de permitir la síntesis de diferentes mensajeros en forma selectiva (Rosen y col. 1982), sin embargo no se tienen evidencias concretas de que interactúe con la estructura "cap". En todo caso es claro según los resultados de la tabla 10 y de la figura 22, que el factor eIF2 no interactúa prácticamente con el 7mGDP, al menos en el sitio de unión de GDP y GTP.

3. Modificaciones en la cadena de fosfatos

Según estudios realizados con el factor de elongación Tu de E. coli (Jurnak., 1985 y Wittinghofer 1982), la cadena de fosfatos del GDP interactúa con el factor Tu a través de una unión salina con Mg^{+2} . Los

estudios realizados por Wittinghofer (1982), revelan una menor afinidad del GDP- β -S por el Tu, así como ocurre con eIF₂. La explicación dada para este análogo en el caso de Tu es que el azufre interfiere en la unión de la cadena de fosfatos al sitio de unión. Esta explicación sería valedera para el eIF₂ de ovario en el caso del GDP- β -S. Sin embargo con el otro análogo azufrado ocurre lo contrario. Como se muestra en la figura 19 GTP- δ -S presenta claramente una mayor afinidad que GTP. Este análogo no ha sido estudiado con el factor Tu, pero se ha descrito un efecto similar para la transducina (Yamanaka y col. 1986) y para el factor de elongación G (Eckstein y col. 1975). En estos casos sin embargo no se ha descrito el comportamiento de GDP- β -S. De los resultados con los análogos azufrados se deduce que el azufre colocado en posición β produce un efecto contrario al colocado en la posición δ . Esto podría ser de importancia en relación a la diferencia de afinidad encontrada para GTP y GDP para eIF₂. Con respecto al efecto que produce el cambio de un oxígeno por un azufre, se sabe que en el caso del ATP- δ -S el pKa del fosfato δ disminuye de 6,8 a 5,3., por lo tanto es probable que ocurra algo similar con GTP- δ -S.

El GDP- β -F se diferencia del GDP y del GDP- β -S, en que este tiene una carga negativa menos. Como se ve

en la figura 19 el GDP- β -F tiene una afinidad relativa 10 veces menor que GDP, indicando que la supresión de una carga negativa en la posición β disminuye la afinidad del eIF₂. La supresión de la carga negativa en este análogo no ocurre en el caso de GTP- δ -S, ya que el fosfato δ sufre tautomerización debido a la resonancia electrónica entre el azufre y el oxígeno. Un efecto similar de GDP- β -S se observó con el factor de elongación G (Eckstein y col. 1975).

El GMP.P(NH)P presentó una afinidad relativa 10 veces menor que GTP según se muestra en la figura 19. Este hecho también fue observado en el caso de la unión de este nucleótido a transducina (Yamanaka y col. 1982). Estos mismos autores han descrito que el reemplazo de un oxígeno en el enlace $\beta\delta$ por un grupo NH produce un aumento del valor del pKa del fosfato δ de 6,8 a 8,2. Se podría por lo tanto postular que la afinidad de los derivados trifosfato variaría conforme a la acidez del fosfato δ . A menor pKa mayor afinidad por el eIF₂.

Los estudios con análogos de nucleótidos podrían revelar mucha información acerca del mecanismo de unión de los nucleótidos y la función de las proteínas G, pero se requiere aún de más estudios.

Cabe hacer notar que la inhibición causada por

los análogos de GDP en la formación de complejo ternario es menor que la esperada. Esto puede deberse a que la formación de complejo binario se midió en presencia de 1 mM Mg^{+2} y la formación de complejo ternario se realizó en ausencia de Mg^{+2} , por la inhibición que causa este catión en dicha reacción. También sin duda debe de haber una influencia de la presencia del metionil-tRNA_i, ya que este reacciona sólo con el complejo eIF₂-GTP. De esta forma su presencia puede desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de complejo ternario y favorecer la interacción del eIF₂ con el GTP.

D.Efecto inhibitorio del Mg^{+2} sobre la formación de complejo ternario.

Como ha sido descrito anteriormente para el factor eIF₂ de reticulocitos, el Mg^{+2} entre 1 y 5 mM inhibe en un 70 a 80% la formación de complejo ternario (Das y col. 1979) y también la formación de complejo binario (Siekierka y col. 1982). El efecto que causa el Mg^{+2} ha sido explicado por el hecho de que el factor eIF₂ tiene un 40 a 50% de sus moléculas unidas a GDP y

que en presencia de Mg^{+2} el GDP no se intercambia con el nucleótido libre. (Siekierka y col. 1982). De esta forma una parte del eIF₂ queda inhabilitado para la formación de complejo ternario. El efecto del Mg^{+2} sobre la formación de complejo ternario es revertido al agregar a la preparación el factor de recambio de nucleotidos GEF, llamado Co-eIF₂ (Das y col. 1979) o SF (Siekierka y col. 1982).

Los estudios realizados con eIF₂ de ovario indican que el Mg^{+2} causa un efecto inhibitorio sólo en la fracción mas purificada de ovario, DE-120 (Figura 23). Este efecto no es observado en la fracción HS-500, lo que podría implicar que en esta fracción el GDP unido a eIF₂ puede intercambiarse con GTP, en presencia de Mg^{+2} , y permitir la formación de complejo ternario.

Como se ha visto en el caso del factor de elongación Tu, el GDP se une al sitio nucleotídico formando una unión iónica con el Mg^{+2} estabilizando éste su unión. Si ocurriera algo similar con el factor eIF₂, lo que es altamente probable, la alta afinidad de eIF₂ por GDP en presencia de Mg^{+2} podría explicarse de esta forma. Obviamente aunque GTP también puede interactuar con Mg^{+2} en el sitio de unión, el efecto del catión no parece ser el mismo.

Un hecho que se repite para todos los factores eIF₂ estudiados, reticulocitos (Das y col. 1979), gérmen de trigo (Osterhout y col. 1983), tumor de células ascíticas (Panniers 1983), Drosophila melanogaster (G. Mateu 1987) y también para eIF₂ de ovario (figura 23), es que la formación de complejo ternario se inhibe entre un 70 a 80%, en presencia de Mg⁺², mas de lo esperado por la cantidad de eIF₂ que tiene unido GDP. En los primeros tres casos el efecto inhibitorio se restablece en un 100% al agregar un factor proteico del mismo tejido. En el caso de reticulocitos se sabe que el efecto de este factor proteico, GEF, es permitir el intercambio de nucleótidos, en el factor eIF₂ en presencia de Mg⁺², pero en los otros sistemas no se ha esclarecido su papel.

La mayor inhibición por Mg⁺², en la formación de complejo ternario podría explicarse por un efecto de este catión en otros sitios de la molécula de eIF₂ o del metionil-tRNA. Otra posibilidad es que la fracción de eIF₂ que tiene unido GDP conserve el sitio para la unión de metionil-tRNA mas estable que el factor que no tiene unido el nucleótido.

E. Intercambio de nucleótidos y posible factor de recambio

En la figura 24 se muestra que existe una clara diferencia entre la velocidad de intercambio de GDP unido a eIF₂ por GDP libre, en presencia de Mg⁺², en las fracciones provenientes de diferentes etapas de la purificación B. El hecho de que eIF₂ puro no intercambie GDP en presencia de Mg⁺² corrobora lo observado en los estudios de formación de complejo ternario en presencia de este catión, y la posible explicación a la inhibición observada.

El intercambio de nucleótidos observado en las fracciones menos puras y realizado en presencia y en ausencia de Mg⁺², es claramente diferente a lo que se observa en la fracción mas pura de eIF₂. Sin embargo este hecho no puede atribuirse a la existencia de un factor que facilite el recambio de GDP en presencia de Mg⁺², hasta no realizar un estudio mas completo. También es probable que ya que el ensayo de formación de complejo binario no es específico para eIF₂, lo observado en las fracciones menos puras sea debido a otras proteínas que unen GDP como el factor de elongación-1.

Habría sido interesante disponer del factor GEF de reticulocitos para comprobar que la inhibición de la formación de complejo ternario y del recambio de GDP causadas por el Mg^{+2} se deben a una inactivación del eIF₂ por el GDP unido.

Recientemente resultados obtenidos por G. Mateu y Sierra (manuscrito en preparación), indican que el recambio de nucleótidos por el factor eIF₂ de D. melanogaster puro es también inhibido por Mg^{+2} , y que este efecto es revertido por GEF de reticulocitos. Además si se fosforila este factor eIF₂ con HCl de reticulocitos, el recambio de nucleótidos facilitado por GEF es ahora inhibido por Mg^{+2} , indicando un mecanismo similar al descrito para eIF₂ de reticulocitos (Esquema 2). Sin embargo en este sistema no se ha encontrado un factor tipo GEF aún.

Los esfuerzos realizados para buscar un probable factor de recambio de GDP en extractos de ovario fueron negativos. Sin embargo aún se conoce muy poco sobre como actúan estos factores en otros sistemas, aparte de reticulocitos, y es probable que su mecanismo de acción sea complejo. Además es probable que de existir haya sufrido una inactivación durante la purificación y por ello no haya

sido posible detectarlo al realizar reconstitución de fracciones como se ve en la figura 25.

De todas formas el hecho de que la concentración fisiológica de Mg^{+2} sea de 2 a 3 mM, implica la necesidad de un mecanismo que facilite el intercambio de nucleótidos dada la diferencia de afinidad entre GTP y GDP. Este mecanismo puede ser un factor proteico, o una regulación por la carga energética y la variación de las concentraciones de GDP y GTP por la nucleósido difosfato quinasa, como ha sido propuesto por Hucul y col. (1985).

III.FOSFORILACION DE eIF₂ Y SU POSIBLE FUNCION REGULADORA DE LA SINTESIS PROTEICA EN OOCITOS.

A.Fosforilación de eIF₂ de ovario de Xenopus laevis.

Uno de los objetivos de esta tésis fue el de estudiar la probable fosforilación de eIF₂ y su posible función reguladora en la síntesis proteica del oocito. Este hecho es el que ha dado gran importancia al factor de iniciación 2 como uno de los factores reguladores de la traducción en reticulocitos. Si bien este mecanismo no ha

sido descrito en otros sistemas, se han purificado eIF₂ quinasas de germen de trigo (Ranu 1980), hígado de rata (Delauney y col., 1977) y en tumor de células ascíticas (Clemens y col. 1976), pero no se ha descrito un papel regulatorio a la fosforilación de eIF₂ de estos sistemas. El hecho de que la quinasa activada por hemina (HCI) que es muy específica para la subunidad α del factor eIF₂ de reticulocitos, fosforile a la subunidad α del eIF₂ de ovario (figura 10), hizo pensar que podría existir en estas células un mecanismo regulatorio que implicara a la fosforilación de eIF₂, en la inhibición de la iniciación de la traducción en los oocitos. Además el hecho de que HCI microinyectado en oocitos crecidos inhiba la síntesis proteica, es un resultado positivo que indica además que el efecto de HCI se debe a una actividad fosforilante.

Sin embargo no se ha detectado en los extractos de oocitos una actividad fosforilante de la subunidad α del eIF₂ homólogo. El hecho de que exista en los oocitos una proteína quinasa que fosforile a la subunidad α de eIF₂ de A. salina (figura 26) es un resultado al que no puede otorgársele un significado fisiológico. Por otra parte Thoen y Slegers (1975) han

descrito que eIF₂ purificado de A. salina es fosforilado por una proteína-quinasa de esta misma especie. Esta proteína-quinasa presenta claramente un comportamiento de caseína quinasa II y fosforila a las subunidades α y β de eIF₂. Los autores discuten la posibilidad de que no sea la subunidad α realmente la que se fosforila sino una proteína contaminante, del mismo peso molecular, aunque el factor está altamente purificado. Con estos antecedentes, es probable que la fosforilación de eIF₂ de A. salina por extractos de ovario no sea realmente mediada por una quinasa capaz de regular la actividad de eIF₂.

El hecho de no haber encontrado una eIF₂ quinasa en extractos de ovario, no es tampoco evidencia suficiente como para descartar la existencia de un mecanismo regulatorio que incluya a la fosforilación-desfosforilación de eIF₂. Es posible que la actividad de esta enzima requiera de cofactores específicos o que éste sea inactivo en las condiciones en que se realiza la purificación de eIF₂. Su ausencia no se puede explicar por la presencia de fosfatasas muy activas por el hecho de que HCl es capaz de fosforilar eIF₂ de ovario en los extractos crudos.

CONCLUSIONES

El trabajo experimental de esta tesis logró cumplir con la mayor parte de los objetivos que se presentaron en la Introducción.

1) Se logró purificar y caracterizar el factor eIF₂ de ovario de Xenopus laevis. En este acápite se contribuyó a aclarar la discrepancia que existe en la literatura en cuanto al número de subunidades que componen a este factor. El factor eIF₂ de ovario contiene tres subunidades, siendo la subunidad β susceptible de proteólisis.

2) Se estudió con cierta profundidad la interacción de eIF₂ de ovario con nucleótidos de guanina. Se estableció que GDP tiene una afinidad 50 veces más alta que GTP por esta proteína, y que además un 40% del eIF₂ tiene GDP fuertemente unido. Estos resultados, junto con el efecto observado del Mg⁺² en el intercambio de nucleótidos, sugieren la necesidad de un factor que facilite el intercambio de GDP por GTP. Usando análogos de GDP y GTP se logró precisar el efecto de varias modificaciones estructurales, tanto en la ribosa como en la cadena de fosfatos y en la base nucleotídica, sobre la interacción con eIF₂.

3) Finalmente se obtuvo una evidencia experimental que sugiere que la fosforilación de eIF2 en su subunidad α por una quinasa específica (HCl), podría inhibir la síntesis proteica en los oocitos. Sin embargo los esfuerzos por encontrar una enzima en los extractos de ovario que fuese capaz de fosforilar al eIF2 homólogo, fueron infructuosos.

BIBLIOGRAFIA

- Allende, C.; Allende., J. (1975)
The activities of oligonucleotides containing guanosine 5' triphosphate in protein synthesis.
J.Biol.Chem. 250:2056-2061
- Allende,J.; Tarrago,A., Shatkin, A (1978)
Interaction of wheat protein synthesis elongation factor-1 with GTP analogs. Arch. Biochem. Biophys. 187:335-338
- Allende,J.E. (1982)
The binding, hidrolylis and release of GTP and GDP as a mechanism that regulates the reversible association of macromolecules. A comparison of four different systems.
Arch.Biol.Med.Exp, 15:347-355.
- Ahmad, M.; Nasrin,N.; Banerjee, A.; Gupta,N.(1985)
Purification and properties of eukaryotic initiation factor 2 and its ancillary protein factor (Co-eIF₂-A) from yeast *S. cerevisiae*. J. Biol.Chem.260:6955-6959
- Baan,R.; Keller,P.; Dahlberg,A. (1981)
Isolation of eukaryotic initiation factor 2 from yeast *S.cerevisiae*. J.Biol.Chem. 256:1063-1066
- Barrieux,A.; Rosenfeld,M. (1977)
Characterization of a GTP dependent Methyonil-tRNA binding protein. J.Biol.Chem.252:3843-3847
- Bergmann,J.; Lodish,H. (1979)
A kinetic model of protein synthesis
J.Biol.Chem. 254:11927-11937.
- Benne,R.; Wong,C.; Luedi,M.; Hershey,J. (1976)
Purification and characterization of initiation factor IF-E2 from rabbit reticulocytes. J.Biol.Chem.251:7675-7681

Bravo,R. (1977)

Tesis de Doctorado: Estudios sobre la sintesis de proteinas y efecto de hormonas en oocitos de Xenopus laevis

Bravo,R.; Otero,C.; Allende,C.; Allende,J. (1978)

Amphibian oocyte maturation and protein synthesis related inhibition by cAMP, Theophylline and papaverine.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:1242-1246

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal.Biochem.72:248-254

Chaudhuri,A.; Stringer,E.; Valenzuela,D.; Maitra,U. (1981)

Characterization of initiation factor 2 containing two polypeptide chain Mr=48.000 and 38.000

J.Biol.Chem.256:3988-3994

Clanton,D.; Hattori,S.; Shih,T. (1986)

Mutations of the ras gene product p21 that abolish guanine nucleotide binding. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:5076-5080

Clemens,M.; Pain,V.; Henshaw,E.; London,I. (1976)

Characterization of a macromolecular inhibitor of polypeptide chain initiation from Erlich ascites tumour cells. Biochem.Biophys.Res.Comm.72:768-775

Das,A.; Ralston,R.; Grace,M.; Roy,R.; Dastidar, G.; Das,H.K.; Yaghmai,B.; Palmieri,S.; Gupta,N. (1979)

Protein synthesis in reticulocytes: mechanism of protein synthesis inhibition by heme-regulated inhibitor

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:5076-5079

- Delauney, J.; Ranu, R.; Levin, D.; Ernst, V.; London, I. (1977)
Characterization of a rat liver factor that inhibits
initiation of protein synthesis in rabbit reticulocytes
lysates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:2264-2268
- Erikson, E.; Maller, J. (1986)
Purification and characterization of a protein kinase from
Xenopus laevis eggs highly specific for ribosomal protein
S6. J. Biol. Chem. 261:350-355
- Easterbrook-Smith, S.B.; Wallace, J.C. y Keech, D.
(1976). Pyruvate-carboxylase: affinity labeling of the
magnesium-adenosine triphosphate binding site.
Eur. J. Biochem. 62, 125-130.
- Eckstein, F.; Bruns, W.; Parmeggiani, A. (1975)
Synthesis of guanosine 5' Di and Triphosphate derivatives
with modified terminal phosphates: Effect on ribosome
elongation factor G dependent reactions.
Biochemistry 14, 5225-5232
- Farrell, P.; Balkow, K.; Hunt, T.; Jackson, R.; Trachsel, H. (1978)
Phosphorylation of initiation factor eIF₂ and the control
of reticulocyte protein synthesis. Cell 11:187-200
- Ferguson, K.; Smigel, M.; Gilman, A. (1986)
The influence of bound GDP on the kinetics of guanine
nucleotide binding to G proteins.
J. Biol. Chem. 261:7393-7399
- Filipowicz, W.; Sierra, J.; Ochoa, S. (1975)
Polypeptide chain initiation in eukaryotes: initiation
factor MP in Artemia salina embryos
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3947- 3951

- Flockart, D.; Corbin, J. (1982)
Regulatory mechanisms in the control of protein kinases.
CRC. Crit.Rev.Biochem. 12:133-186
- Foulkes, J.; Ernst, V.; Levin, D. (1983)
Separation and identification of type-1 and type-2 protein
phosphatases from rabbit reticulocyte lysates.
J.Biol.Chem. 258:1439-1443
- G.Mateu, M.; Vicente, O.; Sierra, J. (1987)
Protein synthesis in Drosophyla melanogaster embryos.
Purification and characterization of polypeptide initiation
factor 2. Eur.J.Biochem. 162:221-229
- Golden, I.; Shafer, V.; Rosbach, J. (1980)
Accumulation of individual poli A+ RNAs during oogenesis of
Xenopus laevis. Cell. 22:835-844
- Gross, M.; Knish, W.; Kwan, A. (1981)
Rabbit reticulocytes double stranded RNA activated protein
kinases and the hemin controlled translational repressor
phosphorylate the same Mr 1.500 peptide of eukaryotic
eIF₂. Febs.Lett. 125:223-226
- Hall, a.; Self, A. (1986)
The effect of Mg⁺² on the guanine nucleotide exchange
rate of p21N-ras. J.Biol.Chem. 261:10963-10965
- de Haro, C.; Datta, A.; Ochoa, S. (1978)
Mode of action of the hemin controlled inhibitor of protein
synthesis. ProcNatl.Acad.Sci.USA 75:243-247
- de Haro, C. y Ochoa, S. (1979a). Further studies on the
mode of action of the heme-controlled translational
inhibitor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 76, 1741-1745.

de Haro, C. y Ochoa, S. (1979b). Further studies on the mode of action of the heme-controlled translational inhibitor: stimulating protein acts at level of binary complex formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76, 2163-2164.

Harbitz, I.; Hauge, J. (1979)
Purification and properties of eIF₂ from pig liver.
Meth. Enzymol. 60:240-246

Hedrick, J. y Smith, A. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.

Huchon, D.; Ozon, R.; Demaille, J. (1981a)
Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation. Nature 294:358-359

Huchon, D.; Ozon, R.; Fisher, E.; Demaille, J. (1981b)
The pure inhibitor of cAMP dependent protein kinase initiates Xenopus oocyte maturation.
Mol. Cell. Endocrinol. 22:211-222

Hucul, J.; Henshaw, E.; Young, D. (1985)
Nucleoside diphosphate regulation of overall rates of protein biosynthesis acting at the level of initiation
J. Biol. Chem. 260:15585-15591

Jurnak, F. (1985)
Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the aminoacids homologous to ras oncogene proteins
Science 230:32-36

Kerr, I.; Brown, R.; Clemmens, M.; Gilbert, C. (1976)
Interferon mediated inhibition of cell free protein synthesis in response to double stranded RNA.
Eur. J. Biochem. 69:551-561

Kimshi, A.; Zilberstein, A.; Schmidt, A.; Shulman, L.; Revel, M. (1979). The interferon induced protein kinase PK-i from mouse L-cells. *J. Biol. Chem.* 254, 9846-9853

Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Levin, D.; Ranu, R.; Ernst, V.; London, I. (1976)

Regulation of protein synthesis in reticulocytes lysates: Phosphorylation of methionyl-tRNA^f binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from heme deficient lysates.

Proc. Natl. Acad. Sci. 73:3112-3116

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951).

Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Maller, J.; Wu, M.; Gerhart, J. (1977)

Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.* 58:295-312

Maller, J.; Krebs, E. (1977)

Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes: induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of cyclic AMP dependent protein kinase
J. Biol. Chem. 252:1712-1718

Maller, J.; Butcher, F.; Krebs, E. (1979)

Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3',5' monophosphate in *Xenopus laevis* oocytes
J. Biol. Chem. 254:579-582

Maller, J.; Smith, D. (1985)

Two dimensional polyacrilamide gel analysis of changes in protein phosphorylation during maturation of Xenopus oocytes. Dev. Biol. 109:150-156

Manne, V.; Yamazaki, Sh.; Kung, H. (1984)

Guanosine nucleotide binding by highly purified Ha-ras encoded p21protein produced in E. coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6953-6957

Medynski, D.; Sullivan, K.; Smith, D.; Bourne, H. (1985).

Aminoacid sequence of the . subunit of transducin deduced from the cDNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6687-6691

Miller, D.; Weissbach, H. (1970)

Studies on the purification and properties of factor Tu from E. coli. Arch. Biochem. Biophys. 141:26-37

Mitsui, K.; Datta, A.; Ochoa, S. (1981)

Removal of . subunit of the eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2 by limited proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4128-4132

Morril, G.; Schatz, F.; Kostellow, A.; Poupko, J. (1977)

Changes in cAMP levels in the amphibian ovarian follicle following progesterone induction of meiotic maturation
Differentiation 8:97-104

Morril, G.; Murphy, J. (1972)

Role for protein phosphorylation in meiosis and in early cleavage phase of amphibian embryonic development
Nature (London) 238:282-284

Moldave, K. (1985)

Eukaryotic protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 54:1109-1149

- Nielsen,P.; Thomas,G.; Maller,J. (1982)
Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during
meiotic maturation of Xenopus oocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79:2937-2941
- Northup,J.; Smigel,M.; Gilman A. (1982)
The guanine nucleotide activating site of the regulatory
component of adenylate cyclase. J.Biol.Chem.257:11416-11423
- O'Connor,C.; Smith,L. (1979)
Xenopus oocyte cAMP dependent protein kinases before and
during progesterone-induced maturation.
J.Exp.Zool.207:367-374
- Ochoa,S. (1983)
Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes
Arch.Biochem.Biophys.223:325-349
- Osterhout,J.; Lax,S.; Raver,J. (1983)
Factors from wheat germ that enhance the activity of eIF₂
J.Biol.Chem.258:8285-8289
- Otero,C.; Bravo,R.;Rodriguez,C.;Paz,B.;Allende,J. (1978)
The stimulatory effect of human chorionic gonadotropin on
aminoacid uptake by amphibian follicles.
Dev.Biol. 63,213-223
- Panniers,R.; Henshaw,E. (1983)
A GDP/GTP exchange factor esencial for eukaryotic
initiation factor 2 cycling in Ehrlich Ascites tumour cells
and its regulation by eukaryotic eIF₂ phosphorylation
J.Biol.Chem. 258:7928-7934

Penefsky, H. (1977). Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* 252, 2891-2899.

Petryshyn,R.; Levin,D, London,I. (1982)
Regulation of double stranded RNA activated eukaryotic initiation factor 2 kinase by type 2 protein phosphatase in reticulocytes lysates. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:6512-6516

Poe,M.; Scolnick,E.; Stein,R. (1985)
Viral Harvey ras p21 expressed in *E.coli* purifies as a binary one to one complex with GDP
*J.Biol.Chem.*260:3906-3908

Proud,C. (1986)
Guanine nucleotide, protein phosphorylation and the control of translation. *T.I.B.S.* 11:73-77

Proud,C.; Pain,V. (1982)
Purification and phosphorylation of initiation factor eIF₂ from rabbit skeletal muscle.
Febs.Lett. 143:55-59

Ranu,R, London,I. (1979)
Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocytes
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:2537-2540

Ranu,R. (1980)
Isolation of a translational inhibitor from wheat germ with protein kinase activity that phosphorylates eIF₂
Biochem.Biophys.Res.Comm. 97:1124-1132

- Richter, J.; Smith, D. (1981)
Differential capacity for translation and lack of competition between mRNA that segregate to free and membrane bound polysomes. Cell 27:183-191
- Richter, J.; Wasserman, W.; Smith, D. (1982)
The mechanism for increased protein synthesis during Xenopus oocyte maturation. Dev. Biol. 89:159-177
- Rosen, H.; Segni, G.; Kaempfer, R. (1982)
Translational control by mRNA competition for eukaryotic initiation factor 2. J. Biol. Chem. 257:946-952
- Schorderet-Slatkine, S.; Schorderet, M.; Boquet, F.; Godeau, F.; Baulieu, E. (1978)
Progesterone induced meiosis in Xenopus laevis oocytes: A role for cAMP at the maturation promoting factor. Cell 15:1269-1275
- Schorderet-Slatkine, S.; Baulieu E. (1973)
Progesterone induced maturation in oocytes of Xenopus laevis. Appearance of a maturation promoting factor of soluble proteins in Xenopus laevis oocytes in vitro Cell 15: 1269-1275
- Seal, S.; Schmidt, A.; Marcus, A. (1983)
Wheat germ eIF₂ and Co-eIF₂
J. Biol. Chem. 258:10573-10576
- Siekierka, J.; Mauser, L.; Ochoa, S. (1982)
Mechanims of polypeptide chain initiation on eukaryotes and its control by phosphorylation of the α subunit of initiation factor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2537-2540

Siekierka, J.; Manne, V.; Mauser, L.; Ochoa, S. (1983)
Polypeptide chain initiation in eukaryotes: reversibility
of the ternary complex forming reaction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1232-1235

Siekierka, J.; Manne, V.; Ochoa, S. (1984)
Mechanism of translational control by partial
phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation
factor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:352-356

Smith, L.; (1981)
Frog oocytes and sea urchin eggs. Steroid hormones and sperm
induce similar events. In Progress in developmental Biology

Spemulli, L.; Walthall, B.; Lax, S.; Ravel, J. (1977)
Purification and properties of a methionyl-tRNA^f binding
factor from wheat germ. Arch. Biochem. Biophys. 178:565-575

Stanley, W. M. Jr. (1972)
Preparation and analysis of L-[³⁵S]-methionine labeled
transfer ribonucleic acids from rabbit liver
Anal. Biochem. 48, 202-216.

Stringer, E.; Chaudhuri, A.; Valenzuela, D.; Maitra, U. (1980)
Rabbit reticulocyte initiation factor 2 contains two
polypeptide chain of molecular weights 48,000 and 38,000
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3356-3359

Stringer, E.; Chaudhuri, A.; Maitra, U. (1979)
Purified eukaryotic initiation factor 2 from calf liver
consist of two polypeptide chains of 48,000 and 38,000 d
J. Biol. Chem. 254, 6845-6948

- Sullivan, K.; Liao, Y.; Alborzi, A.; Bourne, H. (1986)
Inhibitory and stimulatory G proteins of adenylate cyclase:
cDNA and amino acid sequence of the α chains
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6687-6691
- Spiegel, A. (1987)
Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins
Mol. Cell. Endocrinol. 49:1-76
- Tahara, S.; Traugh, J.; Sharp, S.; Lundak, T.; Safer, B.;
Merrick, W. (1978)
Effect of hemin on site specific phosphorylation of
eukaryotic initiation factor 2
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:789-793
- Thoen, C.; Slegers, H. (1985)
Ribosome associated cyclic independent protein kinase of
A. salina. Biochim. Biophys. Acta. 825:268-279
- Wasserman, W.; Richter, J.; Smith, D. (1981)
Protein synthesis during maturation promoting factor and
progesterone induced maturation in Xenopus oocytes
Dev. Biol. 89:152-158
- Wasserman, W. (1982)
The role of the maturation promoting factor in controlling
protein synthesis in Xenopus oocytes.
Dev. Biol. 90:445-447
- Walton, G.; Gill. (1975)
Nucleotide regulation of a eukaryotic protein synthesis
initiation complex. Biochim. Biophys. Acta. 390:231-245

Walseth, T.F. y Johnson, R.A. (1979). The enzymatic preparation of [α - 32 P]-nucleosides triphosphates, cyclic [α - 32 P]-AMP, and cyclic [α - 32 P]-GMP. *Bioch. Biophys. Acta* 562, 11-31.

Wittinghofer, A.; Goody, P.; Roesch, P.; Kalbitzer, R. (1982)
The structure of EF-Tu*GDP*Me⁺ complex
Eur. J. Biochem. 124:109-115

Wu, M.; Gerhart, J. (1980)
Partial purification and characterization of the maturation promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*
Dev. Biol. 79:465-477

Yamanaka, ag.; Eckstein, F.; Stryer, L. (1986)
Interaction of retinal transducin with guanosine triphosphate analogues: specificity of the δ -phosphate binding region. *Biochemistry* 25:6149-6153

Zeeberg, B.; Caplow, B. (1979)
Determination of free and bound microtubular protein and guanine nucleotide under equilibrium conditions.
Biochemistry 18:3880-3886