

ESTUDIOS SOBRE UN INHIBIDOR DE LA ELONGACION DE LA
SINTESIS PROTEICA OBTENIDO DE OVARIO DE X.LAEVIS

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Raul Errázuriz Tagle

Diciembre, 1979

Patrocinante: Dr. Jorge E. Allende



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
Sede Santiago - Oriente

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

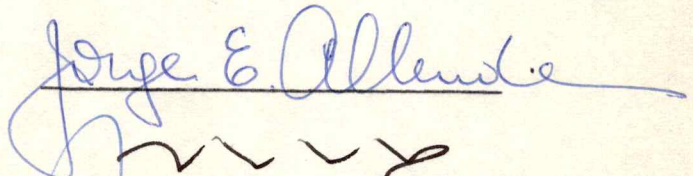
T E S I S D E D O C T O R A D O

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

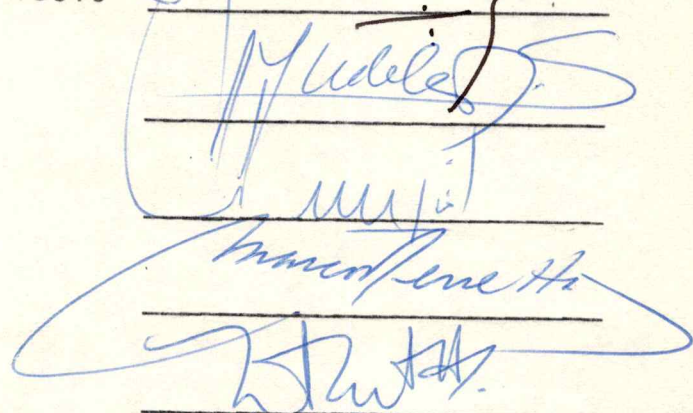
Raúl Errázuriz Tagle

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el 27 de Diciembre de 1979.

Patrocinante de Tesis



Comisión Informante de Tesis





AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma especial al Dr. Jorge E. Allende por haberme brindado la excelente oportunidad de realizar este trabajo bajo su eficaz y diligente dirección.

A Catherine Allende, mi gratitud por su constante apoyo moral y profesional.

Deseo además expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que contribuyeron a la materialización de esta tesis. A riesgo de cometer alguna omisión involuntaria, quiero testimoniar en forma explícita mi agradecimiento:

- A Adela Tarragó, por su gran aporte en la revisión de esta tesis en todas sus etapas;
- A Carmen Gonzalez por su especial cuidado en la revisión de figuras y tablas;
- A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo;
- A Marta Arteaga por su colaboración en la transcripción del texto;
- A José Mondaca, por su gran dedicación en la confección de las figuras.



INDICE DE MATERIAS

	Pag.
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	ix
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
 Introducción	
Regulación post-transcripcional de la síntesis de proteínas	
- Modificación de los mRNA	1
Procesamiento nucleolítico de los precursores de mRNA	2
Poliadenilación del mRNA en el extremo 3'	3
"Capping" y metilación del RNA	5
Metilación interna del RNA	7
- Modificación de los componentes de traducción ..	8
Regulación de la síntesis proteica por hemina ..	8
Inhibición de síntesis proteica en células tratadas con interferón	11
Fosforilación de proteínas ribosomales	12
Otros factores que pueden afectar la traducción ..	14
- Estudios de síntesis proteica en huevos y embriones de erizo de mar	15
Disponibilidad de mRNAs	16
Estudios con ribosomas	20
- Síntesis proteica en oocitos, huevos y embriones de <u>Xenopus laevis</u>	23
Estudios de disponibilidad de mRNAs en oocitos ..	25
Estudios de la actividad de ribosomas en oocitos y embriones tempranos de <u>X.laevis</u>	28



	iv
	Pag.
Métodos	34
Obtención de ovario de <u>X.laevis</u>	34
Obtención de oocitos de <u>X.laevis</u> de diferentes estados de desarrollo	34
Estudios <u>in vivo</u> de síntesis proteica en oocitos de <u>X.laevis</u>	34
Incorporación de aminoácidos en oocitos	35
Determinación del contenido de ribosomas en oocitos de estados 1 y 6 de desarrollo	35
Preparación y purificación del inhibidor de la síntesis proteica	36
Preparación y purificación de ribosomas de ovario de <u>X.laevis</u>	38
Preparación de fracción sobrenadante de 150.000 x <u>g</u> y ribosomas de germen de trigo	39
Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo	40
Formación del complejo EF-1: $[^3\text{H}]$ GTP	41
Determinación del factor de elongación EF-2 por ADP-ribosilación catalizada por la toxina diftérica ...	41
Unión enzimática de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas	42
Unión no enzimática de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas	42
Síntesis de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina	43
Preparación de polisomas de hígado de rata	43
Síntesis de proteínas en un sistema que emplea polisomas aislados de hígado de rata	43
Preparación y purificación de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA	44
Preparación de N-acetil $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA ...	46
Síntesis de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-puromicina	46
Síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP	47
Medición de actividad GTPásica del factor de elongación EF-2	48
Medición de actividad de la peptidil transferasa	48
Análisis de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-fenilalanina por cromatografía en capa fina	49

	v
	Pag.
Análisis de [¹⁴ C] fenilalanil-fenilalanina por cromatografía descendente en papel Whatman N° ..	
Solución de Barth	51
Líquido de centelleo para contar muestras sólidas	51
Materiales	52
Fuente de los materiales	52
 Resultados	
Capítulo primero	
Características del inhibidor de la síntesis proteica	
Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por un factor presente en homogeneizados de ovario y lavados de ribosomas de ovario de <u>X.laevis</u>	54
Purificación del inhibidor de la elongación de la síntesis proteica	57
Determinación del peso molecular del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina por filtración en columnas de Sepharosa 6B	65
Evidencias de la naturaleza proteica de E1	69
Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina	74
Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica	76
 Capítulo segundo	
Sitio de acción del inhibidor de la síntesis proteica	
Inhibición de la síntesis proteica en sistemas procarióticos y eucarióticos	78
Reversión de la inhibición por la adición de un exceso de ribosomas	80
Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo	85
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre las reacciones catalizadas por el factor de elongación EF-1	87
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la reacción de translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A del ribosoma al sitio P del ribosoma	94

	Pag.
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad GTPásica del factor de elongación EF-2	97
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad de la peptidil transferasa .	97
 Capítulo tercero	
Posible rol fisiológico del inhibidor de la síntesis proteica	
Ausencia de actividad inhibitoria en fracciones sobrenadantes de hígado y músculo esquelético de <u>X.laevis</u>	107
Síntesis proteica en oocitos de diferentes estados de desarrollo en ovarios de <u>X.laevis</u>	107
Estudios de síntesis proteica en función de pH en un homogeneizado proveniente de ovario de <u>X.laevis</u>	113
Discusión	116
Bibliografía	124

adulto semivivato
Xenopus laevis

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla I	
Sistemas homólogos y heterólogos de síntesis de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina	55
Tabla II	
Efectos de RNasa pancreática y tripsina sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina	71
Tabla III	
Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina	75
Tabla IV	
Inhibición de sistemas procarióticos y eucarióticos	79
Tabla V	
Efecto de la adición de un exceso de $[^{14}\text{C}]$ -fenilalanil tRNA sobre la inhibición de la síntesis de polifenilalanina	84
Tabla VI	
El inhibidor de la síntesis de polifenilalanina no afecta la unión de $[^3\text{H}]$ GTP al factor de elongación EF-1 de germen de trigo	90
Tabla VII	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la unión de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas catalizada por el factor de elongación EF-1	91
Tabla VIII	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la unión no enzimática de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas	93

	Pag.
Tabla IX	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina .	95
Tabla X	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad GTPásica del factor de elongación EF-2 dependiente de ribosomas	98
Tabla XI	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la formación de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina	103
Tabla XII	
Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la formación de [^4C] fenilalanil-fenilalanina	106
Tabla XIII	
Actividad inhibitoria de extractos de hígado y músculo esquelético de <u>X.laevis</u>	108
Tabla XIV	
Síntesis proteica en oocitos de diferentes estados de desarrollo	110
Tabla XV	
Síntesis proteica <u>in vivo</u> y contenido de ribosomas en oocitos de estados de desarrollo 1 y 6 ..	112

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1	
Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por una fracción sobrenadante de ovario de <u>X.laevis</u>	56
Figura 2	
Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por el lavado ribosomal de ovario de <u>X.laevis</u> ..	58
Figura 3	
Cromatografía en DEAE-celulosa del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina	60
Figura 4	
Filtración del inhibidor de la síntesis proteica en columnas de Sephadex G-200	63
Figura 5	
Filtración del inhibidor de la síntesis proteica en columnas de Sepharosa 6B	66
Figura 6	
Calibración de la columna de Sepharosa 6B	68
Figura 7	
Efecto de la preincubación del inhibidor a dife- rentes temperaturas	70
Figura 8	
Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina	77
Figura 9	
Reversión de la inhibición de la síntesis pro- teica por la adición de ribosomas lavados de ovario de <u>X.laevis</u>	81

Figura 10		x
Reversión de la inhibición de la síntesis de polifenilalanina por la adición de polisomas aislados de hígado de rata		82
Figura 11		
Reversión de la inhibición de la síntesis proteica por la adición de ribosomas lavados de ovario de <u>X.laevis</u> o de germen de trigo		83
Figura 12		
Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo por filtración en columnas de Sephadex G-200		86
Figura 13		
Determinación de la actividad del factor de elongación EF-1 de germen de trigo		88
Figura 14		
Determinación de la actividad del factor de elongación EF-2 de germen de trigo		89
Figura 15		
Purificación del [¹⁴ C] fenilalanil-tRNA por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa benzoilada		100
Figura 16		
Separación de fenilalanina y N-acetilfenilalanina por electroforesis en papel		102
Figura 17		
Separación de fenilalanina y difenilalanina por cromatografía en papel		105
Figura 18		
Síntesis proteica en un homogeneizado de ovario de <u>X.laevis</u> en función del pH		114
Figura 19		
Efecto del pH sobre la síntesis de [¹⁴ C] poli-fenilalanina		115

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₂₆₀	: Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	: Absorbancia a 280 nm
ATP	: Adenosintrifosfato
BD-celulosa	: DEAE-celulosa benzoilada
Ci	: Curie
DEAE-celulosa	: Dietilaminoetilcelulosa
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
GTP	: Guanosintrifosfato
KAc	: Acetato de potasio
NAD ⁺	: Nicotinamida-adenindinucleotido
NEM	: N-etilmaleimida
MgAc ₂	: Acetato de magnesio
phe	: Fenilalanina
phe-tRNA	: Fenilalanil-tRNA
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
TCA	: Acido tricloroacético
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-Ac	: Tris-acetato

RESUMEN

En esta tesis se presenta la purificación parcial y la determinación del sitio de acción de un inhibidor (EI) obtenido de homogeneizados de ovario de la rana X.laevis, que actúa en la etapa de elongación de la síntesis proteica.

La purificación del inhibidor se realizó a partir de un sobrenadante de 150.000 x g de ovario de X.laevis incluyendo etapas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columnas de DEAE-celulosa y filtración en columnas de Sephadex G-200. El peso molecular de este factor determinado por filtración en columnas de Sepharosa 6B es de aproximadamente 380.000 daltones. Este inhibidor de la síntesis proteica es de naturaleza proteica como se evidencia por el hecho que su actividad no es afectada por preincubación con RNasa, es inestable cuando se incuba a temperaturas sobre 40° y es inhibido por N-etilmaleimida.

Se estudió el efecto de este inhibidor sobre las distintas etapas del proceso de elongación de la síntesis proteica utilizando poli U para dirigir la síntesis de polifenilalanina a partir de ¹⁴C phe-tRNA. En estos experimentos se ha comprobado que EI no tiene actividad inhibitoria sobre las reacciones de unión de GTP al factor de elongación EF-1, la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas y la translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P del ribosoma. Se ha podido determinar, sin embargo, que este inhibidor afectaría la elongación mediante la inhibición de la enzima peptidil transferasa presente en la subunidad mayor del ribosoma. Este resultado concuerda con el hecho que un exceso de ribosomas causa la reversión del efecto inhibitorio de EI.

Este inhibidor tiene actividad frente a ribosomas de eucariotes y procariotes así como también frente a polisomas aislados de hígado de rata. Su actividad inhibitoria no se ha detectado en otros tejidos del anfibio X.laevis como son hígado, corazón y músculo esquelético.

Los estudios in vitro e in vivo de síntesis proteica en oocitos de X.laevis han demostrado que esta reacción presenta un valor óptimo entre pH 8,0 y 8,3. Este máximo de actividad coincide con la pérdida total de la actividad del EI a pHs por sobre 7,5. Se ha demostrado que en el proceso de fertilización del huevo de erizo de mar se produce un aumento de entre 5 y 30 veces el nivel de síntesis proteica existente en el huevo no fertilizado y se produce un cambio del pH interno del huevo hacia la zona alcalina de alrededor de 0,5 unidades. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la incubación de oocitos de X.laevis en soluciones de pH alcalino produce la maduración espontánea de los oocitos. Con estas evidencias hemos planteado que posiblemente la actividad in vivo del inhibidor, estaría modulada por el pH interno del oocito y por lo tanto un aumento en este pH causaría un aumento de la síntesis proteica debido a la pérdida de actividad del inhibidor.

ABSTRACT

The characterization of a protein synthesis inhibitor present in Xenopus laevis ovary tissue was undertaken. After partial purification, the site of action of this factor was studied and was shown to affect the elongation step of protein synthesis.

The purification was carried out using a 150,000 x g supernatant solution of ovary extract and includes ammonium sulphate precipitation, DEAE-cellulose chromatography and filtration through Sephadex G-200 column. A molecular weight of 380,000 was determined by filtration of the inhibitor through Sepharose 6B column. This inhibitor was of a protein nature as judged by its thermal stability and the absence of activity after incubation with trypsin. The inhibitor activity is not affected by preincubation with RNase and is completely destroyed after N-ethylmaleimide treatment.

The different steps of the elongation process were tested for inhibition and two of these, the aminoacyl-tRNA binding to ribosomes and the translocation of peptidyl-tRNA from the ribosomal site A to the ribosomal site P, were not affected by the inhibitor. The synthesis of the peptide bond catalyzed by the peptidyl transferase was seriously affected by the elongation inhibitor. This result is in agreement with the fact that an excess of ribosomes in the reaction media causes the reversion of the inhibition. This inhibitory activity affects protein synthesis when using procaryotic and eucaryotic ribosomes as well as rat liver polysomes.

The inhibitory activity was absent in other X.laevis tissues such as liver, heart and skeletal muscle.

The in vivo and in vitro protein synthesis in X.laevis oocytes shows that the optimal pH for the process is between 8.0 and 8.3. These values are coincident with the complete loss of the inhibitor activity observed over pH 7.5. Recent reports have shown that the increase in protein synthesis after fertilization is related in part to an increase of the intracellular pH. This increase is approximately 0.5 pH units. Results from our laboratory show that the incubation of isolated oocytes in alkaline solutions results in the spontaneous maturation of the oocytes. It is also known that this maturation process is accompanied by an increase in protein synthesis.

We postulate that the in vivo inhibitor activity is modulated by the internal pH of the oocyte. This rise in the pH upon fertilization causes an increase in protein synthesis with the subsequent loss of the inhibitory activity.

INTRODUCCION

REGULACION POST TRANSCRIPCIONAL DE LA SINTESIS DE PROTEINAS

El proceso de regulación de la biosíntesis proteica puede ser ejercido en dos niveles, uno de los cuales involucra el proceso de transcripción en donde se sintetiza el mRNA o precursor de mRNA y el otro, el proceso de traducción en que el mRNA sintetizado, junto con otros componentes de la maquinaria biosintética de la célula, darán origen a las proteínas. Este último es el llamado control post-transcripcional de la síntesis proteica, que puede ocurrir a nivel del procesamiento y maduración del RNA mensajero, o por modificaciones de los otros componentes que actúan en la síntesis proteica como los factores proteicos, ribosomas u otros.

Modificación de los mRNA.

Los estudios de una gran cantidad de autores han demostrado que la mayoría de los RNA mensajeros celulares y RNA virales, provienen de precursores de alto peso molecular. El proceso de transcripción produce un pre-RNA que probablemente sirve de sustrato a una serie de enzimas como ribonucleasas, ligasas, metilasas, enzimas que poliadenilan el extremo 3' del mRNA y otras, que lo convertirán en un mensajero apto para entrar en el proceso de traducción. El procesamiento y modificación del mRNA es un proceso muy importante para la futura funcionalidad del mRNA, por lo que cualquier control a este nivel, significará como consecuencia, un control en el proceso de biosíntesis

proteica. Estudiaremos, a continuación el procesamiento del mRNA en forma detallada.

Procesamiento nucleolítico de precursores del mRNA.-

Los estudios más demostrativos de la existencia de un pre-mRNA se han realizado en sistemas de reticulocitos y en adenovirus. En estos sistemas se ha determinado que existe un pre-mRNA de globina y un RNA de alto peso molecular que dará origen al RNA viral. Los trabajos de Lingrel y col(1) demostraron que al incubar células eritroides nucleadas en presencia de [³H]uridina, era posible aislar un RNA que hibridizaba con cDNA de globina. Al tratar este híbrido RNA-cDNA con proteinasa K, se obtenía un trozo de RNA con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 9S, muy similar al que presenta el mRNA de globina maduro. En el caso de RNA de adenovirus, se puede observar que el pre-RNA sintetizado formaba asas (2,3) que contenían secuencias que posteriormente eran eliminadas del precursor, y luego, mediante la acción de ligasas específicas se producía la unión de los segmentos vecinos a la zona eliminada, produciéndose de este modo un RNA de menor tamaño. Se postuló entonces un modelo mediante el cual el mRNA maduro se produciría a partir de una molécula de alto peso molecular (4) por eliminación de ciertas secuencias de este último. Este modelo suponía la existencia de enzimas específicas que produjeran los cortes en el pre-mRNA y la posterior unión de los fragmentos que contenían las secuencias aprovechables. Hurwitz y col.(5) demostraron que en timo de ternera existe una ribonucleasa específica para mRNAs de alto peso molecular. Esta enzima rompía en forma endonucleolítica RNAs precursores como el RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) de núcleos de reticulocito de pato y el RNA precursor 45S de núcleos de hígado

de rata. La ruptura de este último por la RNAsa de timo de ternera producía fragmentos de 33S, 29S, y 19S. En procariotes se encontró una enzima que se denominó RNAsa III (6,7) que participaba en el procesamiento del RNA ribosomal de E. coli (8) y también en el de RNA temprano de alto peso molecular del bacteriófago T₃ y T₄ (9,10). Esta enzima era también capaz de procesar el RNA nucleolar de células eucarióticas (11). El procesamiento del mRNA adquiere mayor importancia por el hecho de que muchos DNA poseen una gran cantidad de secuencias intercaladas como es el caso del gen de ovoalbúmina. Los estudios de O'Malley y col. (12) han demostrado que este gen contiene 7 secuencias intercaladas entre las secuencias estructurales y más aún, el mRNA correspondiente a este gen presenta un tamaño tres veces mayor que el existente en el mRNA maduro.

El proceso de ruptura, eliminación de parte de la secuencia y posterior unión de los fragmentos resultantes determinará la secuencia nucleotídica del mRNA y como tal, aparece como una etapa donde puede ser ejercido un control post-transcripcional.

Poliadenilación del mRNA en el extremo 3'.

La mayoría de los mRNA de eucariotes y virales poseen unida al extremo 3' un segmento de poli A que puede tener entre 30 y 200 residuos de adenosina (13). Este segmento de poli A se incorpora al RNA después de la transcripción, antes o después del procesamiento del hnRNA en el núcleo (14,15,16). Esta estructura está ausente en muchos RNAs como mRNAs de histonas (17,18), de reovirus (19) y de virus de plantas como TMV y TRV (20). Nos podemos preguntar entonces si este segmento de poli A es necesario para la función del mRNA en la célula.

Los estudios de traducción en sistemas libres de células han demostrado que este segmento de poli A no es necesario para la traducción del mRNA. Jacobs-Lorena y col.(20) han demostrado que el mRNA de histonas y el mRNA de globina al que se le ha sacado enzimáticamente el segmento de poli A, se traducen con la misma eficiencia que el mRNA intacto de globina en un sistema libre de células de germen de trigo(22).

Sin embargo, Sorecq y col.(23) y Williamson y col.(24) han obtenido conclusiones diferentes demostrando que el mRNA intacto de globina traducido en un sistema libre de células proveniente de células ascíticas de Krebs, es más estable a tiempos largos de incubación que el mRNA al que se le extrajo el segmento de poli A con la enzima polinucleótido fosforilasa. Resultados similares se han obtenido al microinyectar mRNA de globina intacto y sin poli A a oocitos de Xenopus laevis, donde se ha podido observar que el mensajero sin poli A es considerablemente menos activo que el intacto (25). Esta disminución en la actividad fue atribuida a una menor estabilidad del mensajero que no tiene poli A (26). Cuando se determinó el contenido de mRNA de globina 56 horas después de la microinyección, se encontró que un 85% del mRNA sin poli A había sido degradado; en cambio el mRNA nativo no había sufrido cambios apreciables. Los mismos autores demostraron que la longitud mínima del segmento de poli A que se requería para la estabilidad del mensajero era de 30 nucleótidos (27) y que el mRNA desadenilado era destruido en el oocito por un proceso dependiente de la traducción (28). Se demostró también mediante microinyección en oocitos de anfibio que la adición del segmento de poli A al mRNA desadenilado, restauraba su funcionalidad (29).

Los estudios de Huez y col.(30) demostraron que el mRNA de histonas inyectado en oocitos de rana era inestable como el mRNA de globina desadenilado y que después de 20 horas de

incubación no se detectaba síntesis de histonas; en cambio si el mensajero de histonas era poliadenilado enzimáticamente, su vida media determinada por inyección en oocitos, aumentaba a más de 48 horas (31).

Otra evidencia en favor de la necesidad del segmento de poli A fue dada por Doel y col.(32) que demostraron que el mensajero desadenilado de ovoalbúmina era menos eficientemente traducido que el mRNA intacto. Se pudo establecer que la menor eficiencia se debe a que su secuencia iniciadora tendría menor afinidad por los ribosomas.

La mayoría de los experimentos citados han demostrado la necesidad de la presencia del segmento de poli A en el terminal 3' del mRNA. Se piensa que la unión de ciertas proteínas a este segmento protegería al mRNA de ser degradado por nucleasas (33).

"Capping" y metilación del RNA.

La mayoría de los RNA mensajeros de eucariotes, RNA virales y los precursores de mRNAs contienen nucleótidos metilados, ya sea en su secuencia interna o en el extremo 5', donde poseen una estructura denominada "cap" que contiene una guanina metilada en la posición 7. Esta estructura "cap" tiene una estructura $m^7G^{5'}ppp^{5'}XmYm...$. La mayoría de los estudios relacionados con la metilación de mRNAs han tratado de dilucidar el papel de esta 7 metil guanosina en la funcionalidad de los mensajeros.

Shatkin y col.(34) demostraron que la traducción in vitro de mRNAs de reovirus y del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en un sistema de germen de trigo, era dependiente de la presencia de la 7 metil guanosina en el terminal 5' de estos mRNAs. Los estudios in vivo de Rose y Lodish (35) demostraron que en células infectadas por el virus VSV, los mensajeros con un terminal 5' trifosfato no se unían a los ribosomas

mientras que los mensajeros de VSV que se encontraban formando parte de polisomas tenían la estructura $m^7G^{5'}pppX..$ en el extremo 5'. Otros autores han demostrado que la traducción in vitro de mRNAs a los que se les ha sacado enzimáticamente el "cap" no presenta variaciones considerables con respecto a los controles (36,37). Existe también una serie de mRNAs que no poseen la estructura "cap" en el terminal 5' como son el RNA de virus polio (38) el RNA del virus de la encefalomiocarditis (39) y el mRNA del virus de la necrosis del tabaco (STNV) (40). Estos mensajeros se traducen eficientemente en un sistema libre de células proveniente de germen de trigo (41,42).

Se han postulado dos funciones del "cap" para explicar su rol en la traducción del mRNA. Una de ellas plantea que el terminal 7 metil guanosina sería reconocido por los factores de iniciación y la otra plantea que esta estructura protegería al mensajero de la digestión por exonucleasas. Los experimentos planteados anteriormente han demostrado que la pérdida del "cap" produce una disminución de la estabilidad en el mensajero y por lo tanto una menor eficiencia en el proceso de traducción.

El papel del "cap" en el reconocimiento del RNA mensajero en la iniciación de la síntesis proteica queda de manifiesto por varios experimentos de los cuales citaremos algunos. Los estudios de unión de mRNA de reovirus a ribosomas de germen de trigo han demostrado que los mensajeros que contienen el terminal 7 metil guanosina en el extremo 5', se unen preferentemente a la subunidad 40 S de los ribosomas (43,44); más aún, los análogos de "cap" como el m^7Gp , m^7GTP y $m^7GpppXm$ inhiben la traducción de mensajeros que tienen "cap" en un sistema libre de células provenientes de germen de trigo, reticulocito y células L de ratón (45,46). Los mensajeros que no poseen esta estructura como mRNA de

STNV, mRNA de la encefalomiocarditis, mRNA de T₄ u otros son insensibles a los análogos de "cap" (47,48).

Los trabajos recientes de Patterson y col. (49) han demostrado que la eficiencia de traducción de mRNAs procarióticas como el mRNA monocistrónico 8S croλmRNA del fago λ en un sistema de germen de trigo aumenta aproximadamente 10 veces cuando se agrega en forma enzimática la estructura "cap" al mRNA del fago sintetizado in vitro. Estos autores también demuestran que el aumento en la eficiencia traductora producido por la adición de "cap" a un mRNA policistrónico está restringida sólo al primer gen del operón (50).

Podríamos concluir que la presencia del "cap" en el terminal 5' del mRNA confiere ciertas propiedades a esta macromolécula que la hacen más estable y más fácil de reconocer por la maquinaria biosintética de la célula aumentando su eficiencia en la traducción; sin embargo hay ciertas especies de mRNAs que no poseen esta estructura terminal y son traducidos en forma similar a los que la poseen. Es importante hacer notar que los requerimientos de la existencia del terminal 5' 7 metil guanosina pueden variar de acuerdo a la procedencia de los factores de iniciación (51), en función de la concentración de potasio (52) y de la temperatura (53).

Metilación interna del RNA

Se ha demostrado que existe una metilación de residuos de adenosina en posiciones internas de mRNAs provenientes de células animales y de virus (54,55,56); aunque las posiciones exactas no han sido establecidas, éstas no ocurren en el segmento de poli A (57).

Los estudios en células L de ratón (58), en virus del sarcoma de aves (59) y en el mRNA tardío de SV 40 (60) han demostrado que la metilación ocurre en la posición 6 de una

adenina que está predominantemente en la secuencia Apm^6 $\text{ApC}..$ y Gpm^6 $\text{Apc}...$. Estas secuencias que contienen la base metilada se conservan durante el procesamiento del hnRNA (61).

Los estudios conducentes a determinar el rol de estas metilaciones han demostrado que estos eventos no serían necesarios para la traducción del mRNA, aunque se ha postulado que podrían aumentar la afinidad del mRNA por el ribosoma o tal vez lo protegerían contra el ataque de nucleasas, pero aquí nuevamente surge el problema de que muchos mRNA no poseen metilaciones internas (62).

Modificación de los Componentes de Traducción.

Regulación de la síntesis proteica por hemina.

Los trabajos de los grupos de London (63), Hunt (64) y y Ochoa (65) sobre síntesis proteica en lisados de reticulocitos, han demostrado que esta síntesis disminuye abruptamente cuando el medio de incubación no contiene hemina. Se piensa que en ausencia de hemina se formaría un inhibidor de la iniciación de la síntesis de proteínas, a partir de un proinhibidor latente de peso molecular similar (66). Los estudios con este inhibidor y con factores de iniciación purificados de reticulocitos han demostrado que el inhibidor reduce la proporción de met-tRNA iniciador unido a la subunidad ribosomal 40 S (67,68), etapa que es indispensable para formar el complejo de iniciación que luego se unirá a la subunidad ribosomal 60 S y de ese modo permitir la elongación de la cadena polipeptídica.

Kaempfer y Clemens (69,70) han encontrado que la inhibición de la traducción en lisados de reticulocitos observada en

ausencia de hemina, o en presencia de hemina cuando se agrega el inhibidor, es desplazada cuando se agrega cantidades crecientes del factor de iniciación eIF-2, lo que sugiere que este inhibidor actuaría interfiriendo de algún modo la función de este factor.

Resultados similares han obtenido otros autores (71, 72) demostrando que la inhibición observada en ausencia de hemina puede ser desplazada al agregar un lavado ribosomal rico en factores de iniciación, obtenido por tratamiento de estas partículas con alta fuerza iónica. Se descubrió que la actividad del inhibidor era dependiente de la presencia de ATP (73), lo que indicaba que esta inhibición podía ocurrir por la fosforilación de algún componente del sistema de biosíntesis de proteínas. La purificación de este inhibidor denominado inhibidor controlado por hemina (HCl), demostró que las preparaciones altamente purificadas del inhibidor poseían una actividad de proteína quinasa independiente de cAMP que catalizaba la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 a expensas de ATP. Gross y Mendelewsky (74) incubaron eIF-2 purificado con HCl en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y demostraron por electroforesis en SDS que se fosforilaba la subunidad menor de eIF-2 que tenía un peso molecular de 38.000. Se demostró que esta fosforilación no alteraba la capacidad de eIF-2 para formar el complejo ternario con met-tRNA y GTP (75), por lo que se pensó que la inhibición de la iniciación observada en presencia de HCl comprometía la actividad de otros factores relacionados con la actividad de eIF-2. En lavados ribosomales provenientes de embriones de A.salina y de reticulocitos de conejo existe un factor que aumenta la capacidad de eIF-2 para formar el complejo de iniciación cuando este último no está fosforilado, pero no tiene actividad sobre el factor fosforilado (76). Este factor se denominó proteína

ESP indispensable para la formación del complejo ternario eIF-2:GTP:met-tRNA_i en condiciones fisiológicas. En este contexto, la adición de hemina impediría la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP que activa la quinasa de eIF-2, por lo que no se produce la fosforilación de este factor y la síntesis proteica ocurrirá normalmente.

Inhibición de síntesis proteica en células tratadas con interferón.

Se ha demostrado que la infección viral de células animales o el tratamiento de estas células con RNAs de doble hélice (dsRNA) como poli I-poliC llevan a la producción de una glicoproteína denominada interferón que impide la traducción de mRNAs virales y en menor proporción, la traducción de mensajeros endógenos (78). La traducción de mensajeros virales como el mRNA del virus EMC en extractos libres de células tratadas con interferón (IF) es fuertemente inhibida al agregar pequeñas cantidades de dsRNA (79,80).

La adición de dsRNA y ATP a un sobrenadante de células tratadas con interferón activa una proteína quinasa que fosforila, entre otros componentes, una proteína de peso molecular 38.000 que ha sido identificada como la subunidad menor del factor de iniciación eIF-2 (81,82). Los efectos causados por la presencia de interferón desaparecen cuando la síntesis del RNA del huésped es inhibida por actinomicina D, o la síntesis proteica con cicloheximida, lo que sugiere que la acción del IF no se debe a la activación de una proteína(s) quinasa(s) preexistente(s), sino que a la inducción de la síntesis de esta(s) proteína(s). Por otro lado se ha descrito que la adición de dsRNA y ATP a extractos de células tratadas con interferón produce la

activación de una nucleasa que degrada RNA de una hebra como el RNA de reovirus y del fago R₁₇ (83,84). Se ha encontrado además que el tratamiento de células con interferón produce una inhibición de la metilación del "cap" presente en el terminal 5' del RNA de reovirus (85,86). Otros autores sugieren que la inhibición de la traducción en células tratadas con interferón se debería a la deficiencia de una o más especies de tRNA, ya que aparentemente su adición causa el restablecimiento de la traducción a sus niveles normales (87).

Además de la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 en extractos de células tratadas con interferón a las que se les ha agregado dsRNA y ATP, se produce también la fosforilación de dos proteínas asociadas a ribosomas denominadas P₁ y P_f (88). La fosforilación de estas proteínas estaría relacionada con la aparición de un inhibidor de la traducción de estructura pppApApA (pppA2'p5') A2'p5'A (89,90,91), el que a su vez sería el activador de la endonucleasa responsable de la degradación de los mensajeros virales (92).

Fosforilación de proteínas ribosomales.

La incubación de ribosomas o de subunidades ribosomales de eucariotes como por ejemplo levadura, hígado de rata o reticulocitos, con una variedad de quinasas, produce la fosforilación de alrededor de 10 proteínas en la subunidad 60 S y 24 en la subunidad 40 S (93,94); sin embargo, al administrar fosfato marcado con ³²P a animales de experimentación, sólo se observa la fosforilación de una o dos proteínas en la subunidad ribosomal menor (95,96), la que aumenta al administrar previamente glucagón o cAMP (97).

La proteína ribosomal que se fosforila en respuesta a cAMP y glucagón fué identificada como la proteína S_6 de acuerdo a la nomenclatura de Wool y Gressner (98). Esta proteína es también la única que se fosforila in vitro al incubar subunidades ribosomales de reticulocitos de conejo con una proteína quinasa dependiente de cAMP (99, 100).

Los estudios realizados con el propósito de determinar si esta fosforilación estaría acompañada de algún cambio en la actividad de los ribosomas, han dado en su mayor parte resultados negativos (101); sin embargo hay evidencias que podrían indicar algún papel de la fosforilación en la regulación de la traducción. El aumento de la fosforilación de una proteína en la subunidad menor del ribosoma producido después de la administración de glucagón, está acompañado de un aumento en la secreción de insulina, lo que podría indicar que la fosforilación de una proteína ribosomal fuera capaz de afectar la secreción de otra proteína, posiblemente a través de un cambio en la unión del ribosoma a la membrana. Se ha demostrado también que la fosforilación de una proteína ribosomal de 30.000 dalton presente en la subunidad 40 S, mediante una quinasa dependiente de cAMP, inhibe la formación del complejo de iniciación 40 S (102). Evidentemente es necesario efectuar un estudio más profundo en relación al rol fisiológico de estas fosforilaciones pero hay ciertas evidencias experimentales que podrían apoyar el hecho de que el proceso de fosforilación de proteínas ribosomales tendría algún papel en el proceso de regulación de la síntesis proteica.

Otros factores que pueden afectar la traducción.

Se ha descrito que en la fracción proveniente del lavado de ribosomas de algunas células eucarióticas existen inhibidores de la traducción, de bajo peso molecular. En A. salina Lee Huang y col. (103) han encontrado un inhibidor de la traducción que es un oligonucleótido de peso molecular 6.000 que pertenece al grupo de los denominados tcRNA (translational control RNA). Este oligonucleótido inhibe la traducción de mRNAs homólogos y heterólogos y es activo tanto en sistema de eucariotes como de procariones. La reacción mas sensible a la inhibición es la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas catalizada por el factor de elongación EF-1 en presencia de GTP. El inhibidor está unido al ribosoma y es posiblemente liberado o inactivado cuando ocurre el proceso de hidratación que inicia el desarrollo del embrión (104).

Los estudios de Chen y Siddiqui (105) en Bombyx mori han demostrado que los niveles de tRNA pueden ejercer un control sobre la síntesis proteica ya que encontraron que la población de tRNA existente en estados desarrollados de Bombyx mori está constituida en un 85% por 4 especies de tRNA que son ala-tRNA, ser-tRNA, tyr-tRNA y gli-tRNA siendo este último un 50% del porcentaje ya citado. La mayor síntesis de estas especies de tRNA obedece al aumento de la síntesis de una proteína denominada fibroína que está compuesta en su mayor parte por glicina, alanina, serina y tirosina. La población de tRNA presente en la glándula de seda posterior del gusano B. mori está adaptada para la síntesis de una proteína denominada fibroína, regulando de este modo la expresión génica a los requerimientos existentes en un cierto estado de desarrollo.

Estudios de síntesis proteica en huevos y embriones de erizo de mar.

Los primeros estudios de síntesis proteica durante la oogénesis fueron hechos por Inmers (106) inyectando una mezcla de aminoácidos amrcados con ^{14}C a hembras de Paracentrotus lividus. Este autor encontró que los oocitos de etapas tempranas de la oogénesis presentaban una mayor incorporación de los aminoácidos en proteínas, en comparación con los oocitos de estados mas avanzados y Monroy y Maggio (107) demostraron que esta diferencia en la incorporación de aminoácidos no era debido a un cambio en la permeabilidad de los oocitos más desarrollados.

Se demostró también que el proceso de fertilización producía un gran aumento de la síntesis proteica, aún en presencia de actinomicina D (108) lo que sugería que el huevo no fertilizado contenía suficiente mRNA como para llegar a estados tempranos de la embriogénesis. Se pensó que este mRNA materno podía estar de algún modo enmascarado de tal forma que se impediría su interacción con los otros componentes de la maquinaria biosintética, hasta el momento de la fertilización en que por algún mecanismo se produciría la activación de estos mensajeros con el consiguiente reestablecimiento de su capacidad de templados. Con el uso de sistemas libres de células se inició el estudio detallado de la síntesis proteica a nivel molecular, analizando las diferentes etapas de este proceso así como sus componentes con el fin de determinar cuál o cuáles de éstos eran responsables de la baja síntesis proteica observada en el huevo no fertilizado. En 1960 Hultin y Bergstrand (109) estudiaron por primera vez la incorporación en proteínas de aminoácidos marcados en un sistema libre de células proveniente de erizo de mar. Estos autores demostraron que los ribosomas

provenientes de huevos no fertilizados del erizo P. *militaris* eran incapaces de sintetizar proteínas en un sistema libre de células provenientes de hígado de rata. Resultados similares se obtuvieron al usar sobrenadante de huevos no fertilizados. Cuando se usaron ribosomas de huevos fertilizados se encontró gran actividad tanto con sobrenadante de huevos fertilizados como de no fertilizados. Esta fue la primera evidencia de que el impedimento de la síntesis proteica en huevos no fertilizados se debía a una inactividad de los ribosomas. Estudiando este problema Nemer (110) demostró que los ribosomas provenientes de huevos no fertilizados de erizo de mar eran activos en la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U. Resultados similares obtuvieron Wilt y Hultin (111) sugiriendo la posibilidad de que la falta de mensajero en el huevo no fertilizado podría ser un posible mecanismo para bloquear la síntesis proteica antes de la fertilización.

La disponibilidad de mensajeros en el huevo no fertilizado y la inactividad de los ribosomas fueron estudiados por una serie de autores en forma independiente, con el fin de determinar cuál de estas dos posibilidades podría explicar la existencia de una baja síntesis proteica en estos huevos no fertilizados y a qué podría deberse el gran aumento en la síntesis observado después de la fertilización aún en condiciones en que la síntesis de RNA estaba bloqueada. Analizaremos a continuación ambas posibilidades en forma separada.

Disponibilidad de mRNAs.

La primera idea que surgió para explicar la baja síntesis proteica observada en huevos no fertilizados de erizo de mar fue la falta de mRNA. Esta idea fue rechazada por las experiencias de varios autores que estudiaron la fertilización y desarrollo del embrión en condiciones en que la

síntesis de RNA estaba inhibida, como ocurre con irradiación por rayos X (112), incorporación de análogos de bases (113), tratamiento con actinomicina D o en huevos anucleados, y demostraron que el desarrollo del embrión se producía normalmente hasta blástula tardía. La síntesis de proteínas mostraba un comportamiento normal y caía bruscamente en blástula tardía (114). Resultados similares fueron encontrados por Gross y col. (115) al tratar huevos no fertilizados del erizo A. punctulatta con actinomicina D durante 5 horas antes del proceso de fertilización. Se demostró que 10 minutos después de la fertilización se producía una inhibición de la síntesis de RNA de alrededor de un 90%; en cambio la síntesis proteica medida por la incorporación de [^{14}C] valina se mantenía en niveles normales durante aproximadamente 5 a 8 horas después de la fertilización, tiempo que era suficiente para alcanzar el estado de blástula.

Estos experimentos sirvieron de base para postular la idea de que en el huevo no fertilizado existía una baja disponibilidad de mensajeros producida no por la ausencia de éstos, sino por su incapacidad de dirigir la síntesis proteica. Se habló entonces de la existencia de mensajeros enmascarados que serían sintetizados durante la ovogénesis y se guardarían como material de reserva para las etapas iniciales de la embriogénesis. Los primeros estudios hechos con el fin de aclarar esta idea fueron realizados por Monroy y Maggio (107) y Slater y Spiegelman (116). Estos últimos estudiaron la capacidad traductora del RNA extraído de huevos no fertilizados de erizo de mar por comparación con la traducción de un mensajero conocido como el mRNA del virus MS-2, en un sistema libre de células de E. coli. Se encontró que la proporción de mRNA traducible que estaba presente en huevos no fertilizados de erizo de mar era aproximadamente dos veces mayor que la

cantidad de mRNA presente en células normales de E. coli creciendo en fase logarítmica por lo que el aumento de síntesis proteica después de la fertilización era perfectamente explicable en términos de mensajeros preexistentes. Los mismos autores comprobaron la capacidad traductora de mRNAs provenientes de huevos de erizo no fertilizados, con la de mRNAs provenientes de embriones en estado de gástrula, y encontraron que la incorporación de [¹⁴C]serina era prácticamente igual en ambos casos. Resultados similares fueron obtenidos por Stavy y Gross en 1969 (117) al estudiar la disponibilidad de mRNAs en huevos de erizo de mar que habían sido incubados en presencia de actinomicina D.

Ya que se ha comprobado que los mensajeros extraídos de oocitos son capaces de dirigir la síntesis proteica in vitro y existen en tal exceso que permiten el desarrollo del embrión hasta blástula, se pensó que estos mensajeros estarían de algún modo formando parte de estructuras ribonucleoproteicas como los informosomas descritos por Spirin y Nemer (118). Este mRNA sería incapaz de ser traducido dentro del huevo en condiciones normales, y solo lo haría cuando bajo cierto estímulo se rompiera la partícula ribonucleoproteica liberando el mRNA. En 1966, Spirin (119) e Infante y Nemer posteriormente (120) encontraron que en el citoplasma de huevo no fertilizado de erizo de mar y embriones tempranos existían unas partículas ribonucleoproteicas que sedimentaban más lentamente que los ribosomas. El año siguiente Nano y Hiroshi (121) estudiaron este problema, para lo cual prepararon varias fracciones a partir de huevos fertilizados y no fertilizados de erizo de mar, midiendo la capacidad de templado de cada fracción en presencia y ausencia de tripsina. Se observó que en extractos provenientes de huevos fertilizados la mayor capacidad de templado estaba en una fracción que precipitaba a 12.000 x g que se denominó

fracción M. Al estudiar la fracción M en extractos de huevos no fertilizados se demostró que esta fracción aumentaba en 5 veces su capacidad de templado al ser tratada con bajas concentraciones de tripsina. Jenkins y col. (122) demostraron que entre 5 a 10 minutos después de la fertilización del huevo de erizo de mar hay un gran aumento de una actividad proteásica cuyo pH óptimo es de 8,0 y está asociada con la fracción M anteriormente descrita. En extractos provenientes de células no fertilizadas no se detecta esta proteasa. Los autores plantearon que aparentemente esta actividad proteásica causaría la ruptura de la partícula ribonucleoproteica produciendo la liberación del mRNA y el aumento en la biosíntesis de proteínas; sin embargo la evidencia posterior directa en relación a que el mRNA extraído de huevos no fertilizados era traducido cuando se usaba ribosomas de otras fuentes como E.coli e hígado de rata; y la evidencia indirecta de varios autores que encontraron una falla en el sistema traductor del huevo no fertilizado, principalmente en los ribosomas, descartaron por algún tiempo la idea de la existencia de mensajeros enmascarados como un posible factor regulatorio de la biosíntesis proteica durante la ovogénesis y embriogénesis temprana de erizo de mar. Los estudios de este problema continúan y las evidencias obtenidas no permiten aún una conclusión clara a este respecto.

En relación a la modificación de mRNA en huevos no fertilizados de erizo de mar, Slater y col. (123) demostraron que existe una activación de la poliadenilación y procesamiento de mRNAs maternos después de la fertilización de huevos de erizo de mar. Se demostró también que el poli A asociado a ribosomas aumentaba en un 68% después de la fertilización, reduciéndose también el poli A existente en la fracción post-ribosomal.

Los estudios de "capping" y metilación de RNA después de la fertilización han demostrado que existe una disminución de la metilación de tRNA que es máxima en huevos no fertilizados y disminuye a un 30% después de 48 horas de producida la fertilización (124)

Estudios con ribosomas.

El hecho de que se observara un aumento de la síntesis proteica después de la fertilización, independiente de la síntesis de RNA (Gros y Cousineau (115)) y la evidencia de que este aumento se observó aún cuando la síntesis de RNA estaba inhibida, llevaron a pensar que este aumento era causado por la modificación de algún componente preexistente del sistema traductor.

Los estudios de Ceccarini y col. (125) en enzimas activantes de aminoácidos demostraron que en huevos fertilizados del erizo de mar P. lívidus, la actividad de valil-tRNA sintetasa aumenta al doble en tiempos cortos después de la fertilización. Se demostró también que la cantidad de tRNA presente en los huevos no fecundados era suficiente como para alcanzar el estado de blástula. Sin embargo, Glisin y Glisin (126) al estudiar la sintetasa de leucina y fenilalanina observaron que la actividad de estas enzimas no sufría cambios apreciables después de la fertilización.

En 1963 Monroy y Tyler (127) demostraron que la cantidad de polisomas aumentaba con la fecundación. Estos resultados fueron confirmados por Infante y Nemer (120) y posteriormente por Humphreys (128). Maggio y col. (129) demostraron que los ribosomas provenientes de huevos no fertilizados de P. lívidus no eran capaces de traducir mRNAs endógenos de una fracción proveniente de hígado de rata. En cambio, los ribosomas provenientes de blástula tardía traducían los mensajeros en forma similar a la realizada por

el sistema homólogo de hígado de rata. Resultados similares fueron obtenidos por Brachet y col. (130). La incapacidad de estos ribosomas de traducir mRNAs naturales no se observaba cuando se estudió la traducción del mensajero sintético poli U. A este respecto Nemer (131) demostró que los ribosomas provenientes de huevos no fertilizados presentaban una gran capacidad para la traducción de poli U, y esta capacidad era constante después de la fertilización hasta blástula.

La idea de que los ribosomas de huevos no fertilizados tenían algún componente que disminuía su capacidad traductora fue confirmada por Monroy y col. (132) estudiando la traducción de mRNAs naturales y sintéticos en un sistema de hígado de rata. Estos autores demostraron que los ribosomas de huevos no fertilizados no traducían mensajeros naturales y la capacidad para traducir poli U era muy baja. Cuando se trataba estos ribosomas con tripsina a bajas concentraciones y luego se medía la capacidad traductora de mRNAs, se encontró que la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U aumentaba 6 veces y la traducción de mensajeros naturales aumentaba aproximadamente 20 veces. Los autores concluyeron que los ribosomas eran inactivos porque poseían una cubierta proteica que era destruida por la acción de proteasas y a la vez se observó que existían proteasas que aumentaban después de la fertilización. En 1968 Maggio y col. (133) demostraron que los ribosomas provenientes de huevos no fertilizados eran muy resistentes a la disociación al dializarlos en soluciones sin Mg^{++} . Se demostró que después de 5 horas de diálisis un 50% de los ribosomas de huevos no fertilizados estaban como 80 S y el resto como un componente de 65 S y otro de 30 S. Los ribosomas de embriones sometidos a iguales condiciones de diálisis estaban un 10% como 80 S y el resto como 58 S y

30 S. Cuando se trataba ribosomas de huevos no fertilizados con tripsina y posteriormente se los dializaba en las condiciones antes señaladas se observaba que estos ribosomas se comportaban de igual forma que los provenientes de embriones tempranos. Las conclusiones de estos autores fueron esencialmente las mismas obtenidas por Monroy y Maggio(107).

Los Estudios posteriores de Metáfora y col. (134) demostraron que los ribosomas de huevos de erizo de mar no fertilizados contienen un inhibidor de la síntesis de polifenilalanina en un sistema libre de células que emplea factores de elongación EF-1 y EF -2 purificados de hígado de rata. Al lavar estos ribosomas con soluciones de alta fuerza iónica se producía el restablecimiento de su capacidad traductora. Se demostró también que la adición a este sistema, de la fracción sobrenadante obtenida al lavar los ribosomas provenientes de huevos no fertilizados con soluciones de alta fuerza iónica, inhibía en un 90% la síntesis de polifenilalanina. Esta inhibición se producía a nivel de la unión de poli U a ribosomas de embriones, así como también en la unión de fenilalanil-tRNA a los mismos ribosomas. Este inhibidor perdía un 60% de su capacidad inhibitoria al incubarlo a 50° durante 4 minutos y no contenía actividad de RNasa. La inhibición también se observaba cuando se usaba ribosomas eucarióticos de otras fuentes como reticulocito de conejo, hígado de rata y germen de arveja, o cuando se usaba ribosomas de E.coli. Resultados similares fueron obtenidos por Gambino y col. (135) demostrando que el inhibidor asociado a ribosomas también inhibía la incorporación de $[H^3]$ leucina en un sistema de reticulocito de conejo que contenía RNA nativo. Se demostró que este inhibidor impedía la disociación de polisomas observada al incubar los controles durante 5 minutos a 37°.

Estudiando la presencia de este inhibidor en etapas posteriores a la fertilización, Hille (136) demostró que el lavado ribosomal proveniente de ribosomas de huevos no fertilizados y de blástula, tenía un efecto inhibitorio de la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U así como también sobre la traducción de mensajeros endógenos, aunque en el lavado de ribosomas provenientes de blástula la inhibición era de un 20% menor que la obtenida al usar el lavado ribosomal proveniente de huevos no fertilizados. Se demostró que los lavados de ribosomas de estados más avanzados en la embriogénesis contenían niveles del inhibidor que disminuían a medida que progresaba el desarrollo embrionario. Al estudiar la presencia del inhibidor en tejidos no embrionarios como hígado se encontró que existía una actividad inhibitoria mínima de entre 1 a 5% de la existente en el estado de blástula. Se concluyó que había una pérdida gradual de la inhibición a medida que progresaba el desarrollo y esta pérdida gradual daría cuenta del aumento continuo en la velocidad de incorporación de aminoácidos en proteínas observada a medida que avanza la embriogénesis.

Síntesis proteica en oocitos, huevos y embriones de *Xenopus laevis*.

En forma similar a la observada para la oogénesis de erizo de mar, Shih y col. (137) han demostrado que la síntesis proteica en oocitos de *X.laevis* es menor a medida que avanza la oogénesis, para alcanzar el nivel mínimo en el oocito totalmente crecido. Durante los primeros estados de la oogénesis ocurre una gran síntesis de ácidos ribonucleicos como RNA mensajero, RNA de transferencia y RNAs ribosomales que se acumulan en el citoplasma del oocito crecido (138). Esta síntesis disminuye en forma abrupta

hacia los estados finales de la ovogénesis.

Los estudios de maduración de oocitos por estímulos hormonales y de fertilización in vitro han demostrado que en estas condiciones se produce un estímulo de la síntesis proteica en ausencia de la síntesis de RNA (139). Monroy (139) ha demostrado que esta estimulación de la síntesis de proteínas después de la fertilización se producía unos minutos después de la adición de espermios al medio en que estaban los oocitos, a pesar de que la síntesis de RNA no era apreciable hasta un estado posterior a blástula (139), que en X.laevis ocurre aproximadamente 4 horas después de la fertilización (140). Conclusiones similares han sido obtenidas usando huevos anucleados que han sido estimulados por hormonas (141) demostrando que en estas condiciones también se observa el aumento en la síntesis proteica.

Iguales resultados se han obtenido al incubar huevos fertilizados en presencia de actinomicina D en condiciones en que se bloquea la síntesis de RNA, demostrando que el desarrollo del embrión continúa normalmente hasta blástula tardía.

Todos estos experimentos nos llevan a la conclusión de que el oocito sintetiza grandes cantidades de material de reserva durante la ovogénesis, que le permite llegar hasta un estado de desarrollo posterior a blástula durante la embriogénesis. Cox y col. (142) han demostrado que el oocito de X.laevis totalmente crecido contiene 10^{12} ribosomas lo que es una cantidad enorme en relación al contenido habitual de 3×10^6 ribosomas por célula en otros tejidos. Brown y Gurdon (143) calcularon que el huevo crecido de X.laevis contiene ribosomas suficientes como para 30.000 células. De esta alta población de ribosomas, más del 90% están inactivos para la síntesis proteica (144) y se ha demostrado que después de la fertilización y hasta la etapa de blástula tardía todos los ribosomas usados para

la síntesis de proteínas son de origen materno.

El hecho de que el huevo no fertilizado tenga un exceso de mRNA y de ribosomas contrasta con la observación de que su síntesis proteica es mínima con respecto al huevo fertilizado y a los estados tempranos de la oogénesis donde todavía no se ha reanudado la síntesis de RNA y ribosomas. Para explicar este hecho se ha postulado la existencia de mensajeros enmascarados que estuvieran incapacitados de servir como templados y la existencia de una población de ribosomas inactivos que serían guardados para actuar en los estados posteriores a la fertilización, donde serían activados por algún mecanismo no conocido. Analizaremos a continuación las evidencias que existen en relación a cada uno de estos postulados.

Estudios de disponibilidad de mRNAs en oocitos.

El hecho de que el desarrollo embrionario continúe en condiciones en que no existe síntesis de RNA (139) hizo pensar en la posibilidad de que el RNA estuviera sintetizado de antemano en el huevo y de alguna forma "guardado" de modo que se impidiera su participación en el proceso de síntesis proteica. A este respecto los estudios son escasos y no dan mucha información acerca de la existencia de partículas citoplasmáticas que contengan mRNA.

Los estudios de Crippa y col. (145) demostraron que la gran cantidad de RNA sintetizado en el oocito durante las etapas tempranas de la oogénesis es guardado como un tipo de mRNA informosomal, que es detectado en el citoplasma del oocito aún después de la fertilización y en etapas tempranas del desarrollo. Posteriormente ocurre un cambio y una fracción del RNA informosomal desaparece del embrión convirtiéndose en un mRNA apto para entrar en el proceso de síntesis proteica, en forma similar a la observada en huevos y embriones de erizo de mar.

Otra evidencia en relación a la existencia de mRNA guardado durante la oogénesis fue dada por Raff y col. (146) demostrando que el mensajero de tubulina utilizado en las primeras etapas del desarrollo embrionario estaba ya presente en el huevo no fertilizado.

Estudiando el proceso de poliadenilación de mRNA en oocitos de X.laevis Robash y Ford (147) demostraron que el mensajero heredado por el huevo fertilizado es sintetizado en su mayor proporción en estados pre-vitelogénicos y vitelogénicos tempranos de la oogénesis. Se demostró que el 5% del RNA maduro de oocitos contiene poli A y está presente en partículas ribonucleicas citoplasmáticas no ribosomales. Hay evidencias de que el RNA sintetizado en la oogénesis es de alto peso molecular, por lo que se piensa que el mRNA maduro derivaría de un procesamiento de este RNA que incluiría una poliadenilación. Resultados similares han sido obtenidos por Felicetti y col. (148) en A.salina, demostrando la presencia de partículas citoplasmáticas que contienen poli A y poseen un rango de sedimentación de entre 10 y 40 S y se encuentran en el sobrenadante post-mitocondrial de un homogeneizado de huevos fertilizados.

Estudiando el fenómeno de poliadenilación durante la oogénesis de X.laevis, Cabada y col. (149) demostraron que el RNA con poli A se sintetiza y acumula hasta el inicio de la vitelogénesis para después permanecer constante hasta la fertilización.

Al inducir el desarrollo de huevos de A.salina hay una disminución del "pool" de RNA citoplasmático y un aumento paralelo en el mRNA unido a ribosomas. Este cambio en la distribución del RNA, de partículas subribosomales a ribosomas ocurre sin un cambio apreciable en el contenido de mRNA con poli A por embrión, al menos durante 5 horas después de la

inducción del desarrollo, por lo que se deduce que la poliadenilación no sería en este caso importante para la "activación" del RNA mensajero. Los trabajos de Darnbrough y Ford (150) estudiando la capacidad de templado de mRNAs con poli A presentes en los diferentes estados de la oogénesis demostraron que la traducción de estos mensajeros en un sistema libre de células proveniente de germen de trigo era igual y que todos los mensajeros presentaban igual capacidad para servir como templados.

Un enfoque diferente para estudiar la capacidad traductora de oocitos y huevos no fertilizados ha sido usado por Moar y col. (151) mediante el uso de la técnica de microinyección de mRNA de globina. Estos autores han demostrado que en el oocito de X. laevis existe una gran capacidad traductora y que la baja síntesis proteica endógena estaría aparentemente causada por una baja disponibilidad de mRNAs. Resultados similares han sido obtenidos por una serie de autores (152,153,154) estudiando la capacidad traductora del oocito por microinyección de mensajeros. Los resultados obtenidos por microinyección de mRNA de globina, RNA 14 S de cristalino de ternera, RNA del virus de la encefalomiocarditis, mRNA de la cadena liviana de inmunoglobulina de rata y mRNA de interferón entre otros, han demostrado que el oocito es capaz de traducir estos mensajeros sin que se produzca una competencia con la traducción de mRNAs endógenos, salvo en el caso en que se inyecta cantidades sobre saturantes como ocurre cuando se inyecta grandes cantidades de mRNA de globina (155,156).

La mayor parte de los estudios presentados llevan a la conclusión que el oocito posee una gran capacidad traductora aproximadamente 10 veces superior a la de cualquier otra célula eucariótica (155), además de una gran cantidad de mRNA y por lo tanto la baja síntesis proteica que se

observa en estas células se debería a una deficiencia en la disponibilidad de mRNAs o de algún otro componente de la síntesis proteica.

Estudios de la actividad de ribosomas en oocitos y embriones tempranos de Xenopus laevis.

Los primeros estudios de actividad de ribosomas de X.laevis fueron realizados por Furd en 1966 (157). Estudió la síntesis proteica in vitro e in vivo comparando la eficiencia de ribosomas provenientes de hígado y ovario en la incorporación de [¹⁴C] leucina a proteínas. La incorporación in vitro era aproximadamente 12 veces mayor cuando se usaba ribosomas de hígado. Esta diferencia no se observaba al estudiar la síntesis proteica con polisomas en lugar de ribosomas. Los estudios de incorporación in vivo por microinyección de [¹⁴C] leucina a hembras de X.laevis, demostraron que la síntesis proteica en homogeneizados de hígado era 9 veces mayor que la obtenida en homogeneizados de ovario. Se demostró también que en este último órgano la mayoría de los ribosomas están en forma de monómeros inactivos en el proceso de síntesis proteica.

Estos estudios fueron los primeros que plantearon la idea de que la mayoría de los ribosomas presentes en el oocito estaban de algún modo inactivados y guardados para su uso en etapas posteriores del desarrollo.

Los estudios de Cox y col. (158) tendientes a caracterizar los ribosomas de ovario de X.laevis demostraron que estos ribosomas presentan una capacidad de síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U comparable a la descrita para otros ribosomas provenientes de mamíferos o bacterias; sin embargo estos autores demuestran que la síntesis proteica endógena del oocito es muy baja, por lo que ellos piensan que existiría una falla en la disponibilidad de mRNAs.

Al estudiar las propiedades de estos ribosomas y su disociación en subunidades, demostraron que los ribosomas de ovario tienen un coeficiente de sedimentación y una disociación en subunidades similar a las encontradas para ribosomas provenientes de otras células por lo que la baja síntesis proteica de estos ribosomas no se debería a una modificación de los mismos. Pratt y Cox. (159) demostraron también que la disociación de ribosomas en condiciones de baja sal donde sólo se produce la disociación de ribosomas que no están en polisomas, produce la disociación de un 85 a 90% de los ribosomas presentes en ovario de X.laevis, lo que demuestra que estos ribosomas están inactivos en el proceso de síntesis proteica.

Estudios muy detallados de Moar y col. (160) demostraron que la deficiencia del sistema traductor de oocitos no era causada por la falta de mRNAs; ellos microinyectaron RNA mensajero de globina en oocitos de X.laevis y demostraron que con cantidades saturantes de mRNA, se producía una competencia entre la traducción de este mRNA y de los mensajeros endógenos del oocito, pero la traducción total de mRNA siempre era constante. Se demostró que oocitos a los que se les inyectaba polisomas de reticulocito sintetizaban grandes cantidades de globina y en este caso no se observaba el fenómeno de saturación de la traducción que ocurría al inyectar mRNA de globina. Se demostró también que los oocitos saturados con polisomas de reticulocitos sintetizaban globina con una velocidad 5 veces mayor que la observada para oocitos que habían sido microinyectados con cantidades saturantes de mRNA de globina. La explicación a esta saturación de la capacidad traductora del oocito que no es observada al inyectar polisomas puede ocurrir, pero según los autores, por una deficiencia en los factores de iniciación del oocito;

por la existencia de bajos niveles de tRNA o por la existencia de una población muy pequeña de ribosomas activos. Los estudios hechos por Lingrel y Woodland (161) demostraron que la síntesis de globina en oocitos de X.laevis microinyectados con mRNA de globina no estaba limitada por los factores de iniciación del oocito y observaron que la cantidad de ribosomas en polisomas es de un 2,5%, porcentaje que no varía al inyectar cantidades saturantes de mRNA de globina, lo que hace pensar la posibilidad de que en el oocito exista una gran población de ribosomas no activos en el proceso de síntesis proteica, por lo que su capacidad traductora sería fácilmente saturable.

En relación a la población de tRNA presente en el oocito, Denis y col. (162) demostraron que la mayoría de los tRNA presentes en oocitos crecidos difiere en comportamiento cromatográfico con el tRNA extraído de otras células a pesar de que el tRNA presenta un comportamiento similar en variadas especies.

Esta diferencia de comportamiento del tRNA proveniente de ovario de X.laevis estaría dada por un procesamiento incompleto que podría ser un modo de regular la síntesis proteica.

Los estudios de Gatica y Allende(163) en relación a la aminoacilación de tRNA microinyectado en oocitos de X.laevis han demostrado que al inyectar una mezcla de tRNA de levadura en que la cantidad de tRNA sobrepasa 2,5 veces los niveles existentes en el oocito, la aminoacilación de estos tRNAs ocurre en forma eficiente. Resultados similares se obtuvieron al microinyectar tRNA puro de fenilalanina y estudiar la formación de fenilalanil-tRNA. Estos experimentos indican que las sintetetasas o al menos la sintetasa de fenilalanina estarían presentes en cantidades saturantes en el oocito.

Los estudios de Woodland (164) tendientes a demostrar la existencia de una población de ribosomas inactivos fueron bastante concluyentes al estudiar el contenido de ribosomas y polisomas en oocitos y embriones de X.laevis en diferentes estados de desarrollo. Se observó que en el oocito totalmente crecido el porcentaje de ribosomas en polisomas es un 1% y este valor aumenta a un 2,8% en la maduración. El proceso de fertilización causa un aumento inmediato de este porcentaje que se eleva a un 17% después de 45 minutos, para llegar finalmente a un 85% - 90% en el estado 41 que ocurre alrededor de 3 días después de la fertilización. El cambio observado en el porcentaje de ribosomas en polisomas después de la fertilización, está en relación directa al cambio en la velocidad de síntesis proteica observado en esas condiciones. Se observó que los ribosomas eran movilizados a polisomas en tres fases muy definidas, una de ellas ocurre en el proceso de transformación del oocito a huevo, la segunda con un rápido aumento después de la fertilización que permanece constante hasta el fin de mórula y finalmente la tercera alrededor de los estados 25 a 30 donde el porcentaje aumenta rápidamente para llegar entre un 85 a 90% en el estado 40 a 41. Woodland plantea que estos ribosomas serían de origen materno, lo que concuerda con los resultados de Cox y col. (142) que demuestran que el oocito tiene un exceso de 10^6 ribosomas sobre los existentes en otras células, los que serían suficientes para unas 30.000 células y también suficientes para llegar al estado 42 del desarrollo embrionario. Una confirmación a este planteamiento fue dada por Elsdal y col. (165) demostrando que los mutantes anucleados de X.laevis que no sintetizan rRNA muestran graves defectos metabólicos sólo alrededor del estado 40 en la embriogénesis.

Este fenómeno de movilización de ribosomas a polisomas ha sido observado también en otros sistemas como A.salina.

En este sistema los extractos provenientes de quistes presentan una síntesis proteica muy baja y la población ribosomal consta casi exclusivamente de monosomas. Con el proceso de hidratación del quiste, en que se inicia el desarrollo, la proporción de ribosomas en polisomas aumenta rápidamente. Bacharova y De León(166) demostraron que en huevos maduros de rata, aproximadamente el 10% de los ribosomas están en polisomas y el resto está en forma de subunidades ribosomales y monosomas, inactivos en la síntesis proteica dirigida por poli U; concluyen que aparentemente estarían guardados para su uso posterior en el desarrollo embrionario.

La idea de ribosomas "guardados" fue estudiada por Burkholder y col. (167) haciendo estudios de cortes de oocito de rata al microscopio electrónico, demostrando que en el citoplasma de estos oocitos existen unas estructuras muy ordenadas, semejantes a mallas cristalinas. La ruptura de estas estructuras producía la liberación de partículas muy similares a ribosomas que estaban constituidas por RNA y proteínas. Estas estructuras se destruían al realizar un tratamiento suave con tripsina, lo que hace pensar que estas estructuras están formadas probablemente por ribosomas unidos entre sí por proteínas y que permanecen en esta forma hasta después de la fertilización. Estructuras similares se han observado en oocitos de conejo y en oocitos de lagarto en hibernación en donde la síntesis proteica es muy baja y aumenta varias veces en el período de verano, al igual que se observa un desaparecimiento de estas estructuras cristalinas que están constituidas por monosomas y se encuentran en el citoplasma (168).

Estudios preliminares de Steinert y col. (169) han demostrado la presencia de estructuras citoplasmáticas muy ordenadas que aparentemente estarían constituidas por

ribosomas, y que desaparecen progresivamente después de la maduración siendo reemplazadas por retículo endoplásmico rugoso donde se observa una gran cantidad de ribosomas. Los autores no se pronuncian en relación a que estas estructuras citoplasmáticas sirvan de alguna forma para almacenar ribosomas y dar cuenta de la alta población de monómeros presentes en el oocito (95%); sin embargo los resultados obtenidos con otros sistemas hacen pensar que los ribosomas presentes en estas estructuras estarían de algún modo guardados para la fertilización y embriogénesis temprana.

Los estudios realizados en esta tesis se han enfocado hacia el estudio del control post-transcripcional del proceso de síntesis proteica. Con este fin se ha analizado la capacidad de síntesis proteica in vitro de diferentes fracciones provenientes de homogenizados de ovarios de Xenopus laevis y su actividad se ha comparado con la que presentan otros sistemas in vitro como germen de trigo y E. coli.

MÉTODOS

Obtención de ovario de *Xenopus laevis*.

Las ranas se anestesian sumergiéndolas en un baño de agua con hielo que contiene una pequeña cantidad de tricafna metosulfato (anestesia para animales de sangre fría) durante aproximadamente 30 minutos. Luego se operan haciendo una pequeña incisión en el abdomen para extraer el ovario; el animal se sutura, se deja un tiempo en agua a 4° y se devuelve al estanque original.

El ovario se mantiene en solución de Barth y puede conservarse en buen estado durante 4 a 5 días a 4°.

Obtención de oocitos de *X.laevis* de diferentes estados de desarrollo.

La obtención de oocitos en distintos estados de desarrollo se efectuó por tratamiento del ovario con colagenasa. Una hembra adulta de *X.laevis* se anestesió y se sacó el ovario, el que se cortó en trozos pequeños. Estos trozos se incubaron durante 3 horas a 25° con agitación suave y constante en solución de Barth adicionada de colagenasa en una concentración final de 5 mg/ml. Finalizada la incubación los oocitos se lavaron varias veces con solución de Barth sin colagenasa y se separaron de acuerdo con su tamaño, mediante tamices de malla nylon de diferente tamaño de poro, en oocitos de estado 1 y 2, oocitos de estado 3 y 4 y oocitos de estado 5 y 6. Los oocitos de cada estado se separaron manualmente de cada uno de estos grupos, obteniéndose así células aisladas de cada uno de los estados de la oogénesis.

Estudios in vivo de síntesis proteica en oocitos de *X.laevis*.

Para el análisis de síntesis proteica en oocitos de

X.laevis, se incubaron grupos de 5 a 10 oocitos aislados manualmente, en 0,1 ml de una solución de Barth adicionada de un aminoácido marcado con ^3H en una concentración final de 1×10^{-5} M. La incubación se realizó a 22° y la reacción se detuvo agregando 1 ml de TCA al 5%. Los oocitos se homogenizaron con una varilla de vidrio y el homogenizado se filtró a través de filtros de fibra de vidrio GF/A. Estos filtros se secaron bajo una lámpara y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo empleando una solución de conteo para filtros.

Incorporación de aminoácidos en oocitos.

Para el análisis de incorporación de aminoácidos en oocitos, se incubaron los oocitos en forma similar a la realizada para determinar la incorporación de aminoácidos en proteínas. La reacción se detuvo agregando 2 ml de una solución de Barth fría sin aminoácidos; los oocitos intactos se transfirieron a filtros de fibra de vidrio, donde se lavaron exhaustivamente con esta solución, luego se doblaron los filtros y se aplastaron para romper los oocitos. Los filtros se secaron y se midió la incorporación total de aminoácidos radioactivos en la forma indicada anteriormente.

Determinación del contenido de ribosomas en oocitos de estados 1 y 6 de desarrollo.

El contenido de ribosomas en oocitos de estados 1 y 6 se determinó haciendo una homogenización de estos oocitos aislados en una solución que contenía Tris-HCl 30 mM pH 7,2 MgAc₂ 10 mM, KCl 50 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 250 mM. Los homogeneizados se centrifugaron 15 minutos a $20.000 \times g$ y la fracción sobrenadante se centrifugó durante 2 horas a $150.000 \times g$. El precipitado que contenía los

ribosomas, se resuspendió en una solución de NH_4Cl 0,5 M y se volvió a centrifugar del modo ya descrito. Finalizada la centrifugación, el precipitado se resuspendió en la misma solución usada para la homogeneización del tejido y se determinó la absorbancia de la solución a 260 nm. El porcentaje de ribosomas recuperados se calculó agregando, antes de la homogeneización, una pequeña alícuota de una solución de ribosomas de ovario marcados con ^{35}S metionina que se obtuvieron incubando trozos de ovario durante toda la noche en una solución de Barth con el aminoácido radioactivo a una concentración final de 10^{-6} M.

Preparación y purificación del inhibidor de la síntesis proteica.

Preparación de sobrenadante de 150.000 x g de ovario de Xenopus laevis.

Se homogeneizaron 30 g de ovario cortado en trozos pequeños en un homogeneizador de Dounce con 120 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,4, KCl 30 mM, MgAc_2 10 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 250 mM (solución de homogeneización). El homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 20.000 x g y el sobrenadante de esta centrifugación se filtró por gasa y se centrifugó durante 2 horas a 150.000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación se precipitó agregando sulfato de amonio sólido hasta tener un 40% de saturación, manteniendo el pH alrededor de 7,0 y se centrifugó durante 15 minutos a 20.000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación se precipitó entre 40 y 60% de saturación con sulfato de amonio, se centrifugó 15 minutos a 20.000 x g y el precipitado se resuspendió en la solución de homogeneización. Se agregó glicerol neutralizado hasta tener una concentración final de 50% y la solución

concentrada de proteínas se guardó a -20° .

Purificación del inhibidor de la síntesis proteica por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa.

Se preparó una columna de 1,6 x 13 cm de DEAE-celulosa DE-11 (Whatman) y se equilibró con 250 ml de una solución Tris-HCl 30 mM pH 7,2; KCl 30 mM y β -mercaptoetanol 2 mM. Se colocó una alícuota del líquido sobrenadante (70 mg de proteínas totales) obtenido de un homogeneizado de ovario de *X.laevis* centrifugado a $150.000 \times g$ precipitado con sulfato de amonio entre 40 y 60% de saturación y dializado contra la misma solución que se usó para equilibrar la columna; la columna se lavó con 75 ml de esta misma solución amortiguadora y se eluyó con 75 ml de una solución de KCl 100 mM y finalmente con 75 ml de una solución de KCl 200 mM. Se determinó la absorbancia a 280 nm de cada fracción y luego se ensayó actividad de inhibición de la síntesis de polifenilalanina dirigida por Poli U. Las fracciones que presentaron una mayor actividad inhibitoria se juntaron y precipitaron con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación; esta solución se centrifugó 15 minutos a $20.000 \times g$ y el precipitado se disolvió en una solución que contenía Tris-HCl 30 mM pH 7,2, DTT 1 mM y 50% de glicerol. Esta solución se guardó a -20° .

Purificación del inhibidor de la síntesis proteica por filtración en columnas de Sephadex G-200.

Se hizo una suspensión de Sephadex G-200 (tamaño de partícula 40 a 120 μ) en agua y se dejó hidratar durante tres días a temperatura ambiente. Se preparó una columna de 1,2 x 74 cm que se equilibró con solución de Tris-HCl 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y DTT 1 mM. En esta columna se

colocó una alícuota (7 mg de proteínas totales) de una preparación que contenía el inhibidor de la síntesis proteica purificado por DEAE-celulosa en la forma descrita en el párrafo anterior y se eluyó con la misma solución de equilibrio del gel. El flujo se ajustó a 6 ml/hora y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Se determinó la absorbancia a 280 nm y la actividad de inhibición de la síntesis de polifenilalanina de cada fracción. Las fracciones que presentaron una mayor actividad se juntaron y se concentraron por filtración por membranas de colodión que excluían partículas de peso molecular mayor de 70.000. La solución concentrada de proteínas se guardó a 4° con 10% de glicerol. En estas condiciones la preparación de inhibidor es estable alrededor de 4 días.

Preparación y purificación de ribosomas de ovario de *X. laevis*

Los ribosomas contenidos en el precipitado obtenido después de la centrifugación del homogenizado a 150.000 x g se resuspendieron en la solución de homogenización sin sacarosa y con cloruro de amonio 0,5 M y se centrifugaron durante 4 horas a 150.000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación, que denominaremos lavado ribosomal, se precipitó con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación en la forma descrita y se guardó con 50% de glicerol a -20°. El precipitado que contiene los ribosomas se resuspendió en la solución de homogenización y se centrifugó durante 2 horas a 150.000 x g. El precipitado se resuspendió nuevamente en solución de homogenización y se guardó a -20° en alícuotas de 100 µl, en una concentración final de 120 unidades A_{260} /ml. Con este procedimiento se obtienen los ribosomas que denominaremos "lavados". Para obtener ribosomas "crudos" se realizó el procedimiento ya descrito, pero los ribosomas no se lavaron con cloruro de amonio 0,5 M.

Preparación de fracción sobrenadante de 150.000 x g y ribosomas de germen de trigo.

En un mortero se homogeneizaron 120 g de germen de trigo comercial con 25 g de arena y 150 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,4, KCl 50 mM, MgAc₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 250 mM (solución de homogeneización). Finalizada la homogeneización, se centrifugó durante 20 minutos a 20.000 x g y el sobrenadante se filtró por gasa y se centrifugó durante 2 horas a 150.000 x g. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se precipitó con sulfato de amonio entre un 40 y 80% de saturación, manteniendo el pH alrededor de 7,0 mediante la adición de hidróxido de amonio. Se centrifugó durante 15 minutos a 20.000 x g y el precipitado se resuspendió en un mínimo volumen de la solución de homogeneización, agregando finalmente glicerol hasta llegar a una concentración final de 50%. Esta solución se guardó a -20°.

Purificación de ribosomas: El precipitado de ribosomas obtenido después de la centrifugación de 2 horas a 150.000 x g se resuspendió en solución de homogeneización, a la que se agregó previamente cloruro de amonio hasta tener una concentración final de 0,5 M y se centrifugó durante 4 horas a 150.000 x g. El sobrenadante se descartó y el precipitado que contenía los ribosomas se resuspendió en solución de homogeneización. Esta solución se centrifugó durante 2 horas a 150.000 x g y se resuspendió en un pequeño volumen de solución de homogeneización. Se tomó una alícuota de esta solución y se determinó la absorbancia a 260 nm. La solución de ribosomas se llevó a una concentración de 200 unidades A₂₆₀/ml y se guardó congelada a -20° en alícuotas de 100 μl.

Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo.

La purificación parcial de los factores de elongación EF-1 y EF-2 se realizó en dos etapas que incluyeron una cromatografía en columnas de Sephadex G-200 y una cromatografía posterior en columnas de DEAE-celulosa.

Cromatografía en columnas de Sephadex G-200: Se efectuó en una columna de Sephadex G-200 (1,8 x 66 cm) equilibrada con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 50 mM y β-mercaptoetanol 5 mM. Se colocó una alícuota (15 mg de proteínas totales de un sobrenadante de germen de trigo centrifugado a 150.000 x g y precipitado con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación que contiene los factores de elongación. El flujo de la columna se ajustó a 6 ml/hora y se recogieron fracciones de 2 ml. Se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm y en seguida se les determinó actividad de EF-1 y EF-2 en la forma expuesta a continuación.

Las fracciones que contenían la actividad de EF-1 se juntaron y precipitaron con sulfato de amonio a 80% de saturación y el precipitado se resuspendió en un mínimo volumen de solución de Tris-HCl 50 mM; β-mercaptoetanol 5 mM y 50% de glicerol y se guardó a -20°. Las fracciones con actividad de EF-2 se juntaron y se continuó la purificación mediante una cromatografía en DEAE-celulosa.

Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa: Se preparó una columna (1,6 x 10 cm) de DEAE-celulosa (DE-11) y se equilibró con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM y β-mercaptoetanol 5 mM. La fracción con actividad de EF-2 se colocó en la columna que se lavó con 50 ml de la solución de equilibrio. La actividad de EF-2 se eluyó de la columna mediante una solución de KCl

100 mM en el tampón indicado anteriormente. Las fracciones que presentaban esta actividad se precipitaron con sulfato de amonio a 80% de saturación, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en un pequeño volumen de solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y β -mercaptoetanol 5 mM. Se agregó 50% de glicerol y la solución se guardó a -20° .

Formación de complejo EF-1: $[^3\text{H}]$ GTP (1)

El complejo EF-1: $[^3\text{H}]$ GTP se formó incubando Tris-HCl 10 mM pH 7,2, MgAc_2 10 mM, KCl 100 mM, ^3H -GTP (actividad específica 1000 mCi/mmol) 20 μM , y 10 μg de sobrenadante de germen de trigo precipitado con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación o una fracción parcialmente purificada de EF-1 de germen de trigo. La reacción se incubó durante 5 minutos a 0° , se detuvo por dilución con 2 ml de una solución fría que contenía Tris-HCl 30 mM pH 7,4, KCl 30 mM y MgAc_2 10 mM y se filtró en filtros de nitrocelulosa los que se secaron y contaron en un sistema de centelleo.

Determinación del factor de elongación EF-2 por ADP-ribosilación catalizada por la toxina diftérica.

La reacción de ADP-ribosilación del factor de elongación EF-2 de germen de trigo catalizada por la toxina diftérica se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Collier y Traugh (171).

(1) EF-1: $[^3\text{H}]$ GTP = complejo binario entre el factor de elongación 1 y GTP.

La reacción, en un volumen de 0,1 ml contenía Tris-HCl 30 mM, pH 8,6, DTT 2 mM, EDTA 15 mM, 20 µg de toxina diftérica, [^3H]NAD⁺ (actividad específica 1000 mCi/mmol) 0,4 µM y cantidades variables de factor de elongación EF-2. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°, se detuvo agregando 1 ml de TCA al 5%, y se filtró por filtros de fibra de vidrio GFC que se colocaron en frascos con 3 ml del líquido de centelleo descrito en Materiales. La radioactividad retenida en los filtros se contó en un contador de centelleo (Delta 300, Searle Analytic Co.).

Unión enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas.

La mezcla de incubación contenía en un volumen de 0,1 ml, Tris-Ac 30 mM pH 7,2, MgAc₂ 7,5 mM, KCl 75 mM, DTT 1 mM, 0,5 a 2,0 unidades A₂₆₀ de ribosomas lavados, GTP 1 mM, [^{14}C] fenilalanil-tRNA (actividad específica 100 mCi/mmol) 25 pmoles y 10 µg de una fracción sobrenadante de germen de trigo precipitada con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación que contiene el factor de elongación EF-1. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con 3 ml de una solución que contiene Tris-Ac 30 mM pH 7,4, KCl 30 mM y MgAc₂ 10 mM, se filtró en filtros de nitrocelulosa, los que se secaron y se contaron en frascos con 3 ml de líquido de centelleo.

Unión no enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas.

La unión no enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas se realizó mediante una reacción igual a la descrita para la unión enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas, omitiendo el GTP y el sobrenadante de germen de trigo; la concentración de MgAc₂ se elevó a 15 mM

Síntesis de [¹⁴C] polifenilalanina.

43

La síntesis de [¹⁴C] polifenilalanina se realizó en un volumen de 0,1 ml que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, MgAc₂ 7,5 mM, KCl 75 mM, GTP 1 mM, DTT 2 mM, 50 µg de Poli U, 25 pmoles de [¹⁴C] fenilalanil-tRNA (actividad específica 100 mCi/mmol) y una alícuota de un sobrenadante de germen de trigo (10 µg de proteínas totales) preparado en la forma descrita anteriormente o los factores de elongación EF-1 y EF-2 parcialmente purificados de germen de trigo. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo agregando 1,5 ml de una solución de TCA al 5% frío. Los tubos se calentaron a 90° durante 15 minutos, se enfriaron y se filtraron en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A); los filtros se secaron y contaron en un sistema de centelleo.

Preparación de polisomas de hígado de rata.

Para la preparación de polisomas libres de hígado de rata se siguió la técnica descrita por Blobel y Potter (172) con las modificaciones introducidas por Ramsey y Steele (173).

Síntesis de proteínas en un sistema que emplea polisomas aislados de hígado de rata.

La síntesis proteica en un sistema que usaba polisomas aislados de hígado de rata se realizó en un volumen de 50 µl que contenía Hepes 20 mM pH 7,6, KAc 100 mM, MgAc₂ 4 mM, DTT 25 µM, ATP 1 mM, GTP 20 µM, creatínfosfato 7,5 µM, creatin-fosfoquinasa 40 µg/ml, tRNA total de hígado de rata 7,5 µg/ml, solución de aminoácidos fríos (sin metionina) 50 µM, [³⁵S] metionina (actividad específica 1330 Ci/mmol) 10 µCi, 10 µg (proteínas totales) de un sobrenadante obtenido por centrifugación de un homogenizado de hígado durante 2,5 horas a 150.000 x g, precipitado con sulfato de amonio entre 40 y 70% de saturación y dializado contra una solución de Tris-Ac 20 mM, pH 7,5 y 3 mM β-mercaptoetanol, y 1 a 2 unidades A₂₆₀ de polisomas aislados de hígado de rata. La reacción

se incubó durante 30 minutos a 30° y se detuvo agregando metionina fría para tener una concentración final de 1 mM y TCA al 5% frío. Esta reacción se calentó durante 15 min. a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

Preparación y purificación de ^{14}C fenilalanil-tRNA.

Preparación de ^{14}C fenilalanil-tRNA.

La reacción de aminoacilación de tRNA de fenilalanina se realizó en un volumen de 10 ml que contenía: Tris-HCl 100 mM pH 7,4; MgAc_2 10 mM, ATP 5 mM, DTT 3 mM, 20 mg de tRNA total de levadura, ^{14}C fenilalanina (actividad específica 100 mCi/mmol) 2×10^{-5} M y una alícuota (10 mg proteínas totales) de un sobrenadante de 150.000 x g de germen de trigo precipitado entre 40 y 60% de saturación con sulfato de amonio. Esta fracción enzimática que contiene la aminoacil-tRNA sintetasa de fenilalanina, se dializó durante 3 horas contra una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,5, MgAc_2 10 mM, y β -mercaptoetanol 2 mM.

La reacción se incubó durante 45 minutos a 30° y se detuvo agregando una solución de acetato de potasio al 20% pH 5,0 hasta una concentración final de 2%. Se agregó luego un volumen igual de fenol destilado (saturado con agua), se agitó fuertemente y se centrifugó durante 10 minutos a 20.000 x g. Se separó la fase acuosa y la fase fenólica se reextrajo con 10 ml de H_2O y 1 ml de acetato de potasio al 20% pH 5,0. La fase acuosa se juntó con la obtenida en la centrifugación anterior, se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20° y se dejó toda la noche a esa temperatura. Al día siguiente se centrifugó la solución durante 10 minutos a 20.000 x g y el precipitado se liofilizó a sequedad, para luego resuspenderlo nuevamente

en acetato de potasio 5 mM pH 5,0 y reprecipitarlo con etanol absoluto durante 4 horas a -20° . El precipitado se centrifugó nuevamente en la forma ya descrita, se liofilizó a sequedad y se resuspendió en solución de acetato de potasio 5 mM pH 5,0 a una concentración final de 2500 pmoles/ml de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA. Esta solución se guardó congelada a -20° .

Purificación de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA por cromatografía en DEAE-celulosa benzoilada.

La purificación del $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Rahaminoff y col. (174). La resina BD-celulosa se lavó previamente con una solución que contenía KAc 50 mM, pH 4,7, MgAc_2 10 mM, NaCl 1,5 M y etanol 15% (v/v). Se empleó una columna de 1,2 x 15 cm equilibrada con una solución que contenía KAc 50 mM, pH 4,7, MgAc_2 10 mM y NaCl 1 M. El $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA se disolvió en la misma solución de equilibrio de la columna en una concentración de 150 unidades A_{260}/ml ; se colocó en la columna y se lavó con la solución de equilibrio hasta que el eluido tuvo una absorbancia a 260 nm menor que 0,01. El $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA se eluyó con una solución que contenía KAc 50 mM pH 4,7; MgAc_2 10 mM; NaCl 1,5 M y etanol 15% (v/v). Se midió la absorbancia a 260 nm de las fracciones eluidas y también se determinó la radioactividad en una alícuota de cada fracción. Con estos datos se calculó la actividad específica de cada fracción, se juntaron las fracciones que presentaban la mayor actividad específica y se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20° , para después centrifugar y resuspender el precipitado en una solución de acetato de sodio 1 mM pH 5,0.

Preparación de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA.

La acetilación del [^{14}C] fenilalanil-tRNA se realizó en base a la técnica descrita por Haenni y Chapeville (175).

El [^{14}C] fenilalanil-tRNA (0,1 mg) se preparó en la forma ya descrita y se juntó con un volumen igual de acetato de potasio saturado pH 5,0 y se incubó a 0° agregando 100 μl de una solución concentrada de anhídrido acético en alícuotas de 20 μl cada 10 minutos hasta completar una hora de incubación. La reacción se detuvo agregando un volumen igual de agua bidestilada y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°. La mezcla de incubación se dejó durante 3 horas a -20° y luego se centrifugó durante 15 minutos a 20.000 x g. El precipitado de tRNA se disolvió en H_2O y se dializó toda la noche a 4° contra una solución de acetato de potasio 1 mM pH 5,0.

Para comprobar la acetilación, el N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA se desaciló incubándolo a pH 8,5 durante 15 minutos a 37° y se sembró en una hoja de papel Whatman N°1 (50 x 10 cm) para realizar una electroforesis a 1400 voltios durante 75 minutos usando una solución de electrodo de ácido fórmico 0,5 M. Finalizada la electroforesis se secó el papel, se reveló con una solución de ninhidrina al 0,3% en acetona, y se cortó en trozos de 1 cm de largo que se contaron individualmente en líquido de centelleo.

Síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina.

Se realizó una unión no enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas lavados de X.laevis en la forma descrita anteriormente incubando la reacción durante 15 minutos a 37°. Finalizado este período de incubación se agregó puromicina 10^{-4} M y EF-2 de germen de trigo y se incubó por otros 15 minutos a 37°. La reacción se detuvo agregando 1 ml de una solución de fosfato de potasio 0,1 M pH 8,0 y el [^{14}C] fenilalanil-puromicina se extrajo agregando 1,5 ml de una solución concentrada de acetato de etilo. Los

tubos se agitaron bien, se centrifugaron durante 10 minutos a $2000 \times g$ y luego se tomó 0,9 ml de la fase orgánica y se midió la radioactividad en una solución de centelleo para muestras líquidas (tritón-tolueno).

Síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP

La síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP se efectuó según la técnica descrita por Glenn y Chappel (176) usando como fuente de fosfato marcado una solución de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ que se evaporó en un evaporador rotatorio y se resuspendió en agua, repitiendo varias veces este proceso con el fin de eliminar totalmente el ácido.

La reacción de síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP se realizó en un volumen final de 2 ml que contenía 1 mCi de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$, Tris-HCl 50 mM pH 7,2, MgCl_2 10 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, EDTA 0,5 mM, NAD^+ 50 nM, ácido 3P-glicérico 0,5 mM, GTP 1 mM; NADH 5,5 nM, 600 μg de gliceraldehido -3P-deshidrogenasa y 38 μg de 3P-glicerato quinasa.

La reacción se incubó durante 60 minutos a 30° y se detuvo por calentamiento en un bañomaría a 100° por 1 min; luego se centrifugó y se descartó el precipitado. El sobrenadante se purificó en una columna de DEAE-Sephadex A25 (1 x 10 cm) lavada con agua bidestilada. El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP se eluyó de la columna con una gradiente continua de bicarbonato de trietilamina pH 7,4 entre 0 y 1 M. Las fracciones que cont el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP se liofilizaron a sequedad, el residuo se resuspendió en un mínimo volumen de agua bidestilada y se guardó a -20° .

La pureza del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP se comprobó realizando una cromatografía del producto en papel DEAE, usando como solvente una solución de formiato de amonio 0,6 M pH 3,1 y corriendo en forma paralela soluciones patrones de GTP,

GDP y GMP. Finalizada la cromatografía, se secó el papel y se cortó en trozos de 1 cm que se contaron en la forma acostumbrada.

Medición de actividad GTPásica del factor de elongación EF-2 dependiente de ribosomas.

La medición de la actividad GTPásica del factor de elongación EF-2 dependiente de ribosomas, se realizó incubando 10 minutos a 37° una mezcla de reacción que contenía en un volumen de 0,1 ml Tris-HCl 75 mM pH 7,6 KCl 30 mM, DTT 2 mM, 0,5 a 1 unidad A_{260} de ribosomas lavados de ovario de X.laevis, cantidades variables de factor de elongación EF-2 de acuerdo a la preparación usada y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP (7,6 cpm/pmol) 4×10^{-5} M. Finalizada la incubación la reacción se detuvo agregando 1 ml de una solución de carbón activado (NoritA) al 1% en H_3PO_4 0,1 M. Los tubos se agitaron durante 2 minutos en un Vortex y se centrifugaron 10 minutos a 2000 x g. Se tomó 0,5 ml del sobrenadante de la centrifugación y se determinó el ^{32}P -fosfato liberado contando esta alícuota en una solución para muestras líquidas que contiene líquido de centelleo y Tritón X-100 (2:1).

Medición de actividad de la peptidil sintetasa

La actividad de la peptidil sintetasa se determinó usando dos técnicas diferentes: la síntesis de N-acetil ^{14}C fenilalanil-puromicina y la síntesis de ^{14}C fenilalanil-fenilalanina.

1. Síntesis de N-acetil ^{14}C fenilalanil-puromicina.

En un volumen final de 0,1 ml se incubó Tris-HCl 30 mM pH 7,2; MgAc_2 10 mM, DTT 1 mM, KCl 75 mM, 50 μg de Poli U, 0,5 a 1 unidades de ribosomas lavados y 20 pmoles de N-acetil ^{14}C fenilalanil tRNA (purificado en columnas de

BD-celulosa). La reacción se incubó durante 15 minutos a 37°; después de lo cual se agregó puromicina a una concentración final de 10^{-4} M y se continuó la incubación durante 20 minutos más a la misma temperatura. La reacción se detuvo agregando 1 ml de una solución de fosfato de potasio 0,1 M pH 8,0 y 1,5 ml de acetato de etilo; se agitó, centrifugó y se tomó una alícuota de 0,9 ml de la fase orgánica, que se contó en una solución para muestras líquidas.

2. Síntesis de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-fenilalanina.

Esta reacción se realizó básicamente de acuerdo a la técnica descrita por Rahaminoff y col. (174), usando fenilalanil-tRNA puro cargado con fenilalanina (acilado en un 85%). La mezcla de reacción en un volumen de 0,05 ml contiene Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NH_4Cl 120 mM; KAc 60 mM, MgAc_2 15 mM; 500 $\mu\text{g/ml}$ de Poli U y 20 pmoles de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA^{phe} (actividad específica 400 mCi/mmol). La reacción se incubó durante 15 minutos a 37° y se detuvo agregando un 10% (v/v) de una solución de NaOH 3 N; la incubación se continuó por 30 minutos y finalmente se agregó un 10% (v/v) de HCl 3 N para neutralizar. El análisis del producto se hizo mediante dos técnicas: cromatografía en capa fina y cromatografía descendente en papel.

Análisis de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-fenilalanina por cromatografía en capa fina.

Se hicieron placas de 0,25 mm de grosor con una solución de celulosa microcristalina en agua destilada (10 gramos de celulosa en 48 ml de agua) siguiendo la técnica descrita por Wolfrom y col. (177) y se secaron a 80°. Las placas se sembraron con 20 μl de muestra y con soluciones patrones de fenilalanina y difenilalanina, y se corrieron empleando como solvente, n-butanol: ácido acético: agua

(3:1:1); se secaron y luego se volvieron a correr durante 4 horas con el mismo solvente. Finalizada la cromatografía se secó la placa y se reveló con una solución de ninhidrina al 0,3% en acetona. Las zonas correspondientes a fenilalanina y difenilalanina se rasparon de las placas y se contaron en un sistema de centelleo.

Análisis de [¹⁴C] fenilalanil-fenilalanina por cromatografía descendente en papel Whatman N°3.

La cromatografía descendente se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Pestka (178). Finalizada la reacción de síntesis del dipéptido, las muestras y las soluciones patrones se sembraron en tiras de papel Whatman N°3 de 2 x 42 cm y se efectuó la cromatografía durante 15 horas usando como solvente una solución de n-butanol:ácido acético:agua (3:1:1). Finalizado el proceso se secó la tira y se reveló con una solución de ninhidrina al 0,3% en acetona calentando el papel en un horno a 100°. Las tiras de papel se cortaron en trozos de 1 cm de largo y posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

Solución de Barth.

Los ovarios y oocitos aislados se mantienen en la solución descrita por Barth y modificada por Gurdon (170). La composición de esta solución es la siguiente: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄ x 7 H₂O 0,82 mM, Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O 0,33 mM, CaCl₂ x 6 H₂O 0,041 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,6, penicilina 0,01 g/l y sulfato de estreptomicina 0,01 g/l.

Líquido de centelleo para contar muestras sólidas.

La solución para contar muestras sólidas contiene 3,92 g/l de PPO y 0,08 g/l de POPOP disueltos en tolueno. Esta solución se guarda en un frasco obscuro.

Solución para contar muestras líquidas.

Se mezclan dos partes del líquido de centelleo descrito en el párrafo anterior con una parte de Tritón X-100. Esta solución se agita enérgicamente y se guarda en frasco obscuro.

Las hembras adultas de Xenopus laevis provienen del South African Snake Farm, Cape Province. Estas ranas se mantienen en cautiverio en el laboratorio durante varios meses y se alimentan una vez por semana con pequeños trozos de carne.

Germen de trigo. El germen de trigo usado para los experimentos es un germen de trigo comercial y fue donado por el molino "La Estampa", Santiago, Chile

Fuente de los materiales.

ATP	: Sigma
BD-celulosa	: Sigma
Catalasa	: Sigma
Celulosa microcristalina Avicel	: Merck
Colagenasa	: Boëhringer, Manheim
DEAE-celulosa	: Whatman
DTT	: Calbiochem
EDTA	: Sigma
Fenilalanina	: Sigma
^{14}C fenilalanina	: Amersham
Fenilalanil-fenilalanina	: Sigma
Filtros de fibra de vidrio	: Whatman
Filtros de nitrocelulosa	: Millipore
Fosforilasa b	: Sigma
γ -globulinas humanas	: Sigma
GTP	: Sigma
^3H GTP	: New England Nuclear
$\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$: Amersham
Heparina	: Sigma
Inhibidor de tripsina	: Sigma

[³ H] leucina	: New England Nuclear
Membranas de colodión	: Schleicher y Schuell
[³⁵ S] metionina	: New England Nuclear
[³ H] NAD ⁺	: New England Nuclear
N-acetilfenilalanina	: Sigma
N-etilmaleimida	: Calbiochem
Ninhidrina	: Sigma
Poli U	: Sigma
Puromicina	: Sigma
Sephadex G-50, G-100 y G-200	: Pharmacia Fine Chemicals
Sepharosa 6B	: Pharmacia Fine Chemicals
Seroalbúmina de bovino	: Sigma
Toxina diftérica	: Instituto Bacteriológico
Tricaína metosulfato	: Sigma
Tripsina	: Sigma
Tritón X-100	: Sigma
tRNA total	: Sigma
tRNA ^{phe}	: Boëhringer, Manheim
RNasa A	: Sigma

Amersham : The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra.

Boëhringer : Boëhringer, Manheim, GMBH, Alemania.

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

Instituto Bacteriológico : Instituto Bacteriológico, Santiago, Chile.

Merck : Merck, Darmstadt, Alemania

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

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

Pharmacia : Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.

Schleicher y Schuell : Schleicher y Schuell, Keene, New Hampshire, U.S.A.

Sigma : Sigma Chemical Co. St. Luis, U.S.A.

Whatman : Whatman Ltd. Springfield Mill Maidstone Kent, Inglaterra.

RESULTADOS

CAPITULO PRIMEROCaracterísticas del inhibidor de la síntesis proteica.

Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por un factor presente en homogeneizados de ovario y en lavado de ribosomas de ovario de X.laevis.

La actividad del inhibidor se midió en un sistema de síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U. Esta reacción se realizó a partir de [¹⁴C] fenilalanil-tRNA, factores proteicos provenientes de ovario de X.laevis o germen de trigo y ribosomas lavados con soluciones de alta fuerza iónica de la misma procedencia.

La adición de la fracción sobrenadante de un homogeneizado de ovario de X.laevis que ha sido centrifugado a 150.000 x g y luego precipitada con sulfato de amonio entre 40 y 60% de saturación a un sistema que sintetiza polifenilalanina que usa como fuente de enzimas un homogeneizado de germen de trigo y ribosomas lavados de ovario de X.laevis, produce una notable inhibición de la síntesis proteica. En la tabla I podemos observar que el sistema homólogo que contiene la fracción sobrenadante y los ribosomas de ovario presenta una muy baja actividad de síntesis de polifenilalanina. Esta aumenta en forma considerable al usar una fracción sobrenadante de germen de trigo en lugar de la de ovario. Podemos observar que la adición a este último sistema de una fracción sobrenadante de ovario produce una inhibición de alrededor de un 78% en la síntesis de polifenilalanina; sin embargo cuando esta fracción es previamente calentada durante 1 minuto a 90° los niveles de síntesis proteica son normales.

En la figura 1 podemos ver que la inhibición alcanza un valor máximo de 70%.

Tabla 1

Sistemas homólogos y heterólogos de síntesis
de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina

Ribosomas	Fracción sobrenadante	$[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina sintetizados (pmoles)
Ovario <u>X.laevis</u>	Ovario <u>X.laevis</u>	2,2
Ovario <u>X.laevis</u>	Germen de trigo	29,0
Ovario <u>X.laevis</u>	Germen de trigo + <u>X.laevis</u>	6,4
Ovario <u>X.laevis</u>	Germen de trigo + <u>X.laevis</u> *	28,7

* enzima calentada durante 1 minuto a 90°.

La reacción de síntesis de polifenilalanina se realizó en la forma que se indica en Métodos. Las fracciones sobrenadantes provenían de un homogeneizado de ovario de X.laevis o de germen de trigo que fueron preparadas en la forma que se detalla en Métodos. Antes de usar estas fracciones, se las dializó contra una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 30 mM y β -mercaptoetanol 2 mM. Se usaron 0,8 unidades A_{260} de ribosomas lavados de ovario de X.laevis por ensayo y 30 μg (proteínas totales) de la fracción sobrenadante dializada. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°, se detuvo agregando TCA al 5% frío, se calentó durante 15 minutos a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

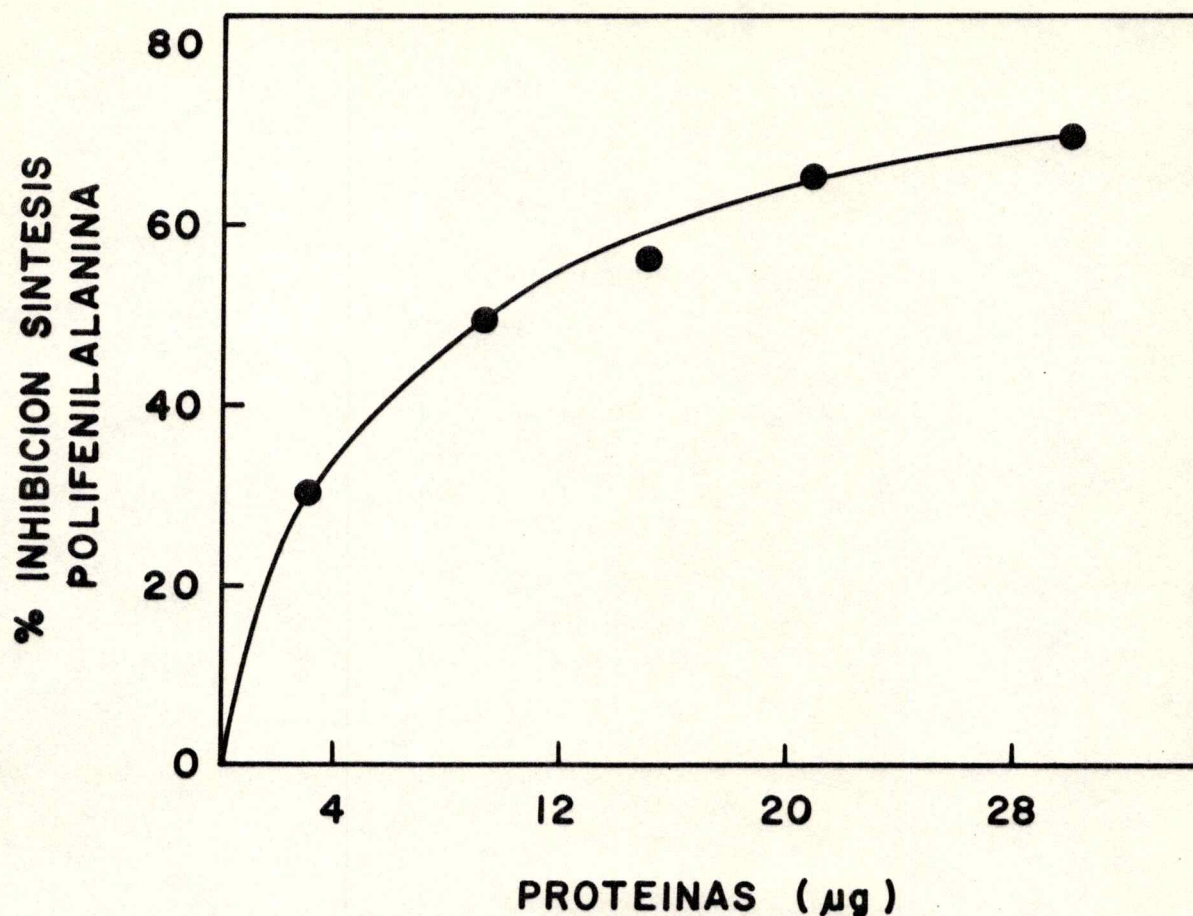


Figura 1. Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por una fracción sobrenadante de ovario de X.laevis.

La síntesis de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina a partir de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA se realizó en la forma que se indica en Métodos usando como fuente de enzimas una fracción sobrenadante dializada de germen de trigo, ribosomas lavados de ovario de X.laevis y una fracción sobrenadante dializada de la misma procedencia como fuente de inhibidor. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo agregando 2 ml de una solución de TCA al 5% frío. Los tubos se calentaron durante 15 minutos a 90° y luego se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

Este fenómeno de inhibición de la síntesis proteica es también observado al agregar a un sistema de síntesis de polifenilalanina una fracción obtenida al lavar los ribosomas de ovario de X.laevis con soluciones que contenían 0,5 M KCl. (Figura 2).

Purificación del inhibidor de la elongación de la síntesis de proteínas (EI).

- Preparación del extracto inicial de ovario.

Los ovarios obtenidos de hembras de X.laevis en la forma que se indicó anteriormente se lavaron varias veces en soluciones de Barth para eliminar la sangre contaminante y se cortaron en trozos pequeños que se homogeneizaron en 3 volúmenes de una solución que contenía Tris-Ac 50 mM pH 7,2, MgAc 10 mM, KCl 50 mM β -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 250 mM. El homogeneizado se centrifugó a 20.000 x g y el sobrenadante se filtró a través de filtros de lana de vidrio, para luego centrifugarlo a 150.000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación se precipitó con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación con el fin de determinar en qué fracción estaba la mayor actividad. Esta actividad se encontró mayoritariamente en la fracción que precipitaba entre 40 y 60% de saturación, por lo que se escogió este rango para las futuras purificaciones. El precipitado de sulfato de amonio se resuspendió en una solución de Tris-Ac 50 mM pH 7,5 y DTT 2 mM; se agregó glicerol hasta una concentración final de 50% y se guardó a -20°. En estas condiciones la preparación es estable por varios meses.

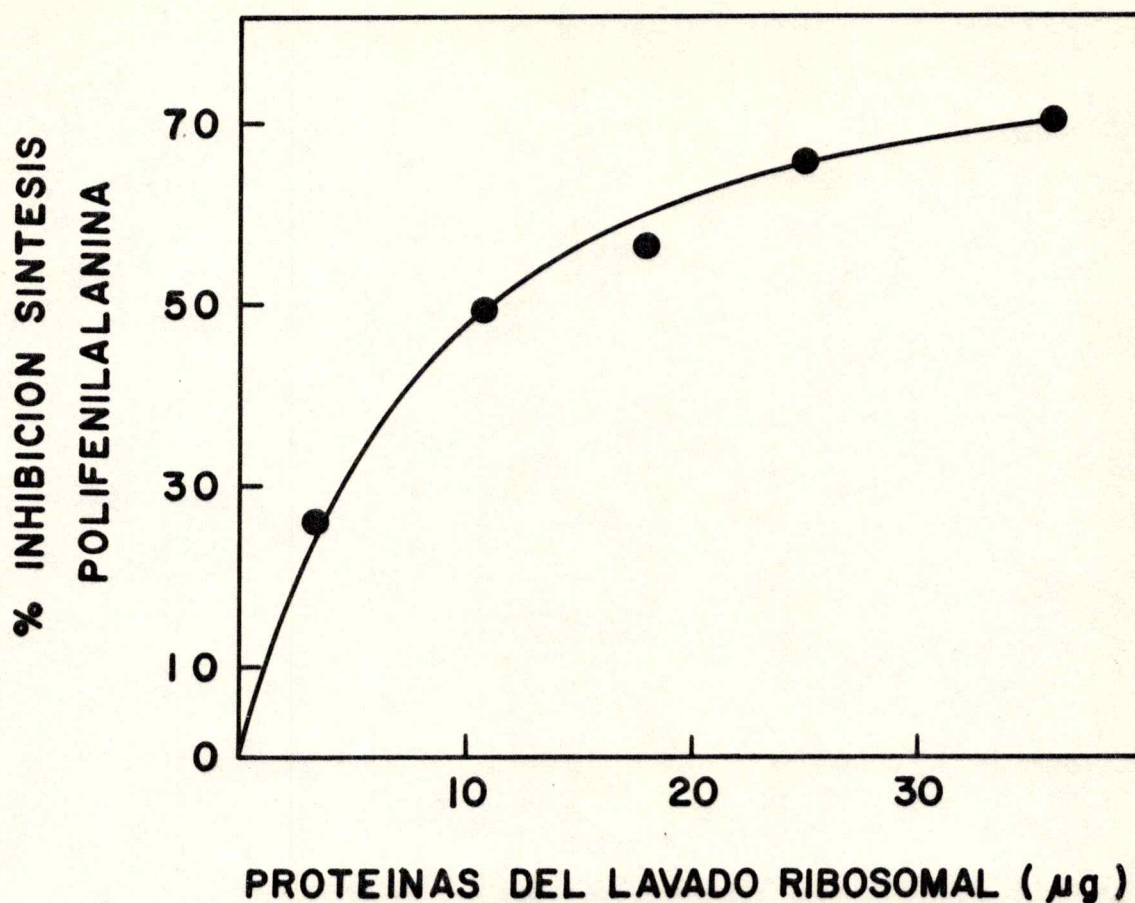


Figura 2. Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por el lavado ribosomal de ovario de *X.laevis*.

La reacción de síntesis de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina se realizó en la forma que se indicó en Métodos. Se usaron 0,6 unidades de ribosomas por ensayo, y diferentes cantidades de una fracción sobrenadante obtenida por centrifugación de ribosomas tratados con NH_4Cl 0,5 M. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° , se detuvo con TCA al 5% frío y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio. La radioactividad retenida en los filtros se determinó en un sistema de centelleo.

- Cromatografía del inhibidor en columnas de DEAE-celulosa.

La fracción precipitada entre 40 y 60% de saturación con sulfato de amonio se dializó durante toda la noche contra una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y β -mercaptoetanol 2 mM. Después de la diálisis se sometió a una cromatografía en una columna de DEAE-celulosa DE-11 (1,4 x 13 cm) empacada con presión y equilibrada con la misma solución empleada para la diálisis. La columna se lavó con esta solución y luego se eluyó por etapas con soluciones que contenían 0,1, 0,2 y 0,3 M KCl en la solución anteriormente descrita. El flujo de la columna se ajustó a 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml. Todas estas operaciones al igual que las etapas restantes de la purificación se realizaron a 4°.

En la figura 3 podemos observar el perfil de elución del inhibidor en una cromatografía en DEAE-celulosa. La actividad del inhibidor se midió ensayando su capacidad de inhibir la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U y las fracciones que presentaron mayor actividad se precipitaron con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación y se guardaron a -20° disueltas en solución con Tris-Ac 50 mM, DTT 2 mM y 50% glicerol. Esta fracción se usó para las futuras etapas de purificación. Podemos observar que la actividad inhibitoria eluye a una concentración de 200 mM de KCl; la elución de actividad que se observa a 50 mM es debida a sobrecarga de la columna. Aproximadamente un 80% de la actividad es recuperada en la fracción que eluye a 200 mM de KCl y la actividad específica de esta fracción es de 200 U/ml. Definimos una unidad de inhibidor como la cantidad de proteína necesaria para inhibir en un 50% la síntesis de polifenilalanina en presencia de una cantidad fija de ribosomas lavados e incubando la reacción durante 20 min a 37°. La concentración

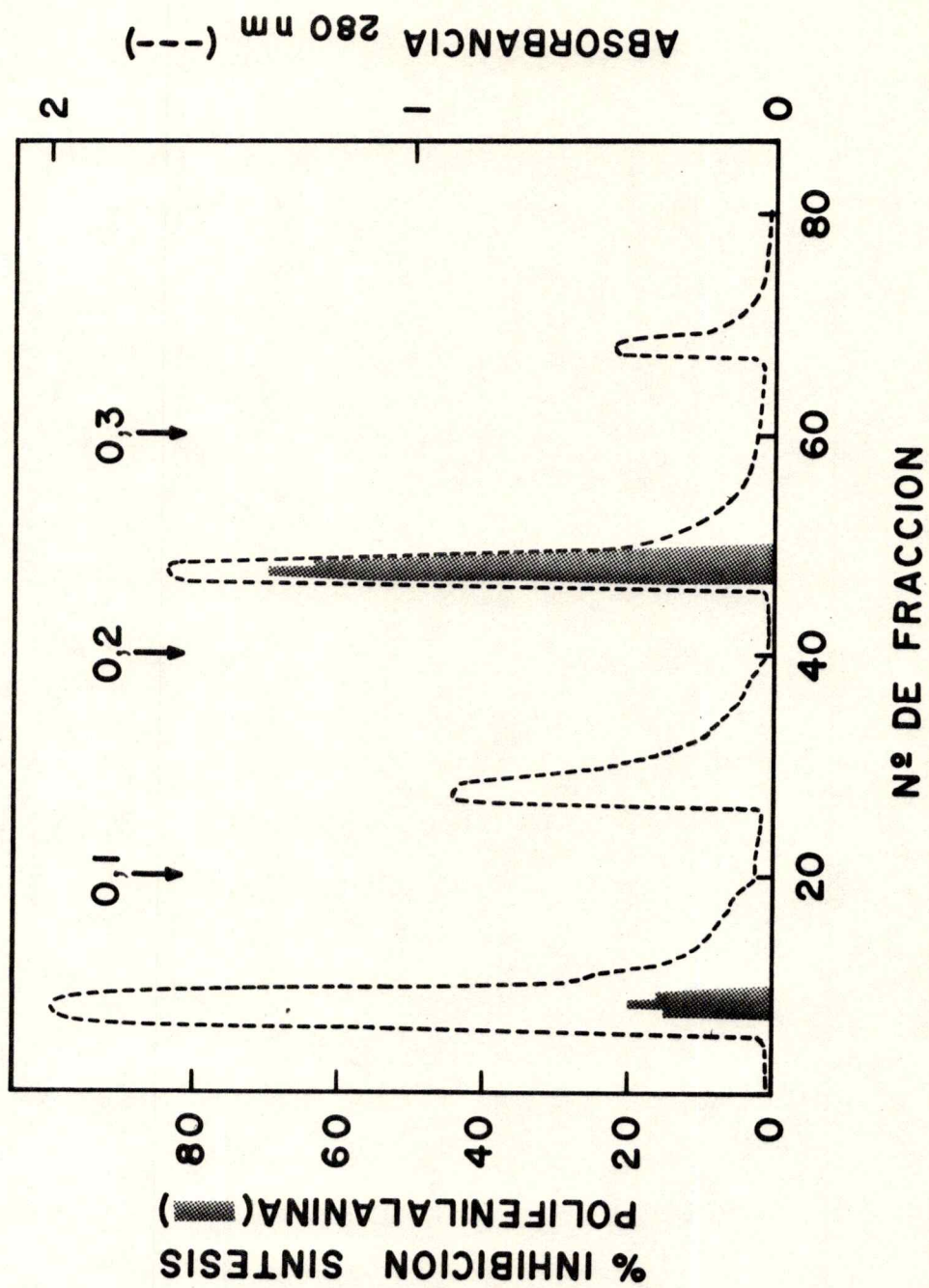


Figura 3.

Figura 3.

Cromatografía en DEAE-celulosa del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina.

El precipitado entre 40 y 60% de saturación obtenido a partir de un homogeneizado de ovario de X.laevis que contiene el inhibidor, se dializó durante toda la noche contra una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y β -mercaptoetanol 2 mM. La columna de DEAE-celulosa DE-11 (1,4 x 13 cm) se cargó con 6 ml de este dializado que contenía 4,5 mg de proteínas/ml. La elución se realizó en etapas con soluciones que contienen KCl 0,1, 0,2, y 0,3 M como lo indican las flechas. El flujo de la columna fue de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml.

de proteínas fué determinada por el método de Lowry y col. (179) usando seroalbúmina de bovino como patrón.

- Cromatografía en columnas de Sephadex G-200

La fracción proveniente de DEAE-celulosa se filtró en una columna de Sephadex G-200 (1,2 x 70 cm) equilibrada con una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y DTT 0,1 mM. La elución se realizó con esta misma solución, el flujo de la columna fué de 6 ml/hora y se recogieron fracciones de 1 ml. En la figura 4 se observa el perfil de elución del inhibidor de la síntesis proteica en columnas de Sephadex G-200. Aproximadamente el 90% de la actividad eluye como un solo pico que no es retenido en la columna. Se observa también un pequeño pico de actividad con un peso molecular aproximado de 66.000 que representa menos del 5% de la actividad total. Las fracciones que presentaron la mayor actividad se juntaron y concentraron empleando dos métodos diferentes. Uno de ellos consistió en deshidratar parcialmente la solución colocada en una bolsa de diálisis que se rodeó con Sephadex G-200 seco. El otro método usado para concentrar fue la filtración en membranas de colodión que excluían compuestos de peso molecular menor que 70.000. Este último método fue el más empleado por su rapidez.

El concentrado de proteínas guardado con un 10% de glicerol es inestable y su actividad desaparece después de 4 días a 4°; sin embargo la estabilidad es mayor (2 semanas) cuando se guarda a -20° en 50% de glicerol. La fracción obtenida tenía una actividad específica de 460 U/mg de proteína y fué usada en la mayoría de los experimentos presentados en esta tesis. Esta fracción semipurificada del inhibidor estaba libre de actividad de factores de elongación de la síntesis proteica. Estas actividades se midieron

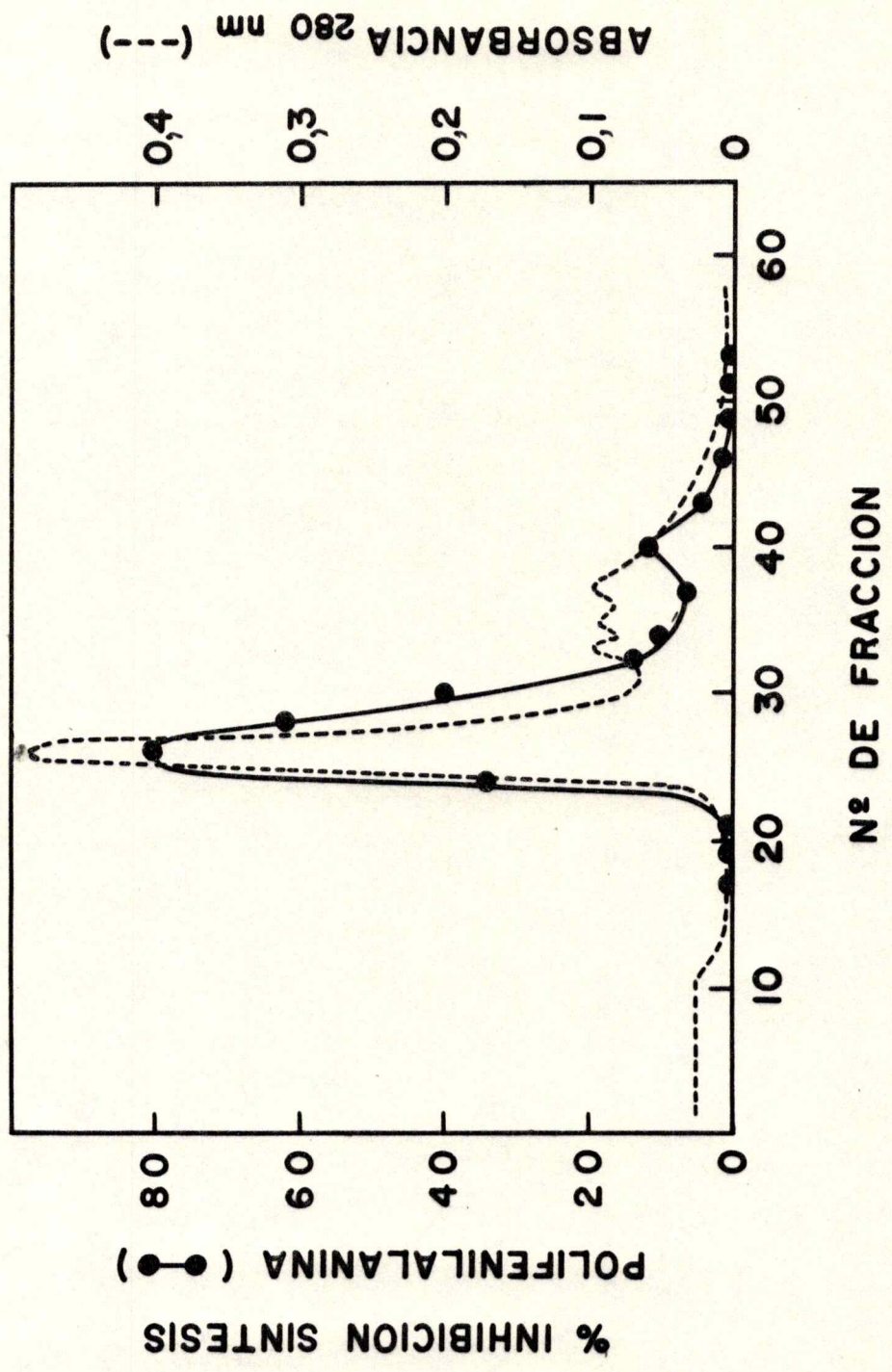


Figura 4.

Figura 4.

Filtración del inhibidor de la síntesis proteica en columnas de Sephadex G-200.

La fracción enzimática proveniente de DEAE-celulosa (1 ml, 5 mg de proteínas) se filtró en una columna de Sephadex G-200 de 1,2 x 70 cm equilibrada con una solución de Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y DTT 0,1 mM y la elución se realizó con esta misma solución. El flujo de la columna se ajustó a 6 ml/hora y se recogieron fracciones de 1 ml.

Por formación de un complejo entre el factor EF-1 y GTP y por la ADP-ribosilación del factor de elongación EF-2 catalizada por la toxina diftérica en presencia de NAD^+ radioactivo.

Determinación del peso molecular del inhibidor de la síntesis proteica por filtración en columnas de Sepharosa 6B.

Con el fin de determinar el peso molecular del inhibidor de la síntesis proteica se realizó una filtración de una preparación del inhibidor parcialmente purificada por DEAE-celulosa en una columna de Sepharosa 6B de 1,8 x 70 cm. En la figura 5 se observa el perfil de elución del inhibidor en la columna de Sepharosa 6B. La actividad del inhibidor eluye como un solo pico con un peso molecular aproximado de 380.000. Este valor fué determinado calibrando la columna con proteínas globulares de peso molecular conocido como catalasa (P.M. 240.000), γ -globulinas humanas (P.M. 166.000), fosforilasa b monómero (P.M. 98.000) y seroalbúmina de bovino (P.M. 65.000)

En la figura 6 se observa que al graficar el logaritmo del peso molecular de cada proteína versus su K_{av} se obtiene una recta de donde es posible estimar el peso molecular de una substancia cuyo valor se desconoce.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{donde} \quad \begin{array}{l} V_e = \text{Vol. de elución de la muestra} \\ V_0 = \text{vol. vacío de la columna} \\ V_t = \text{vol. total de la columna} \end{array}$$

En estas condiciones el peso molecular determinado para el inhibidor de la síntesis proteica es de 380.000. Este valor de P.M. es solo aproximado ya que para la calibración de la columna de Sepharosa se usaron proteínas de peso molecular menores que el obtenido para el inhibidor.

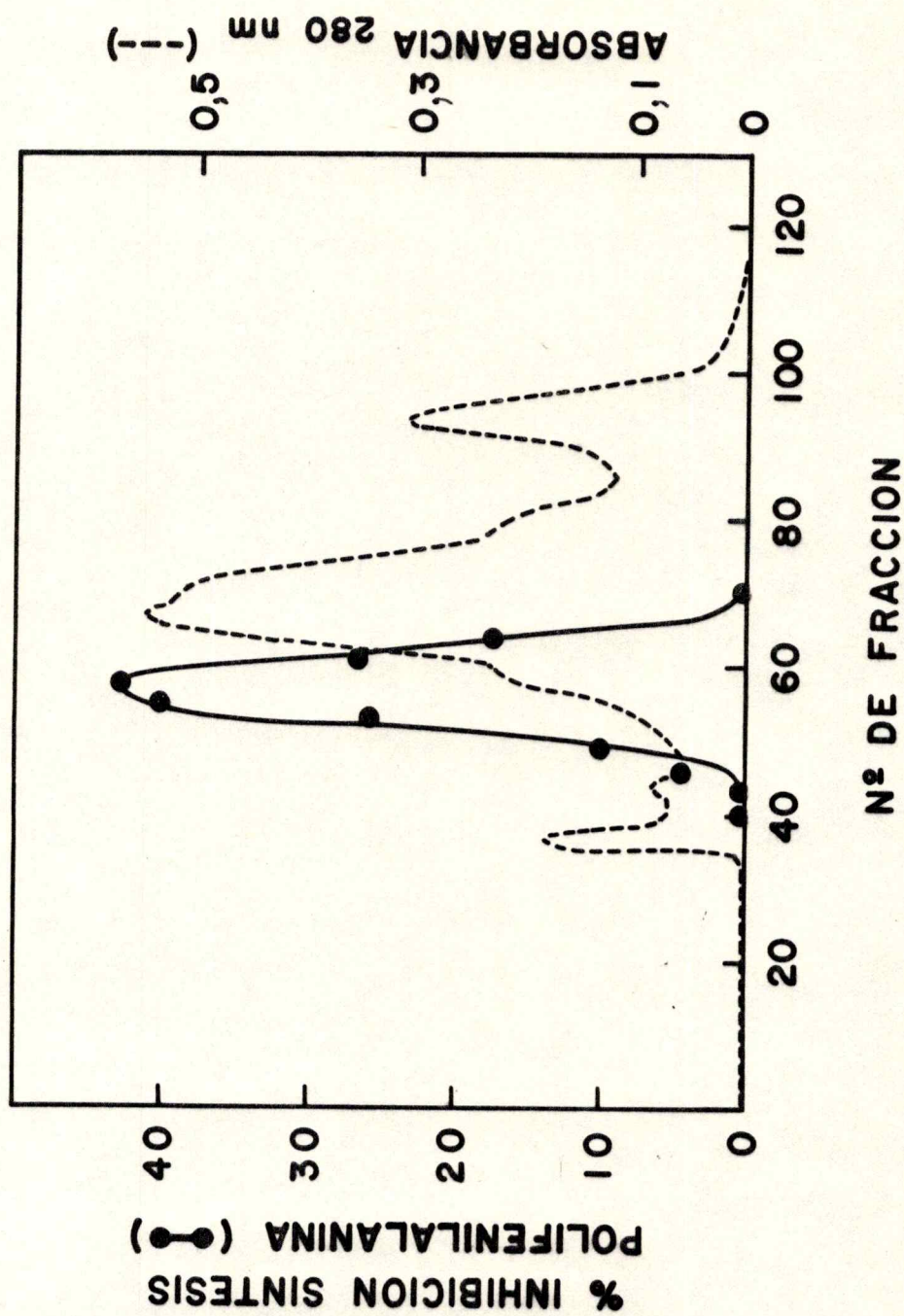


Figura 5.

Figura 5.

Filtración del inhibidor de la síntesis proteica en columnas de Sepharosa 6B.

La fracción enzimática proveniente de una columna de DEAE-celulosa (6 mg de proteínas) que fue precipitada con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación se cargó en una columna de Sepharosa 6B (1,8 x 70 cm) equilibrada con una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 30 mM y DTT 0,1 mM. La elución se realizó con esta misma solución; el flujo se ajustó entre 4 y 5 ml/hora y se recogieron fracciones de 1,5 ml.

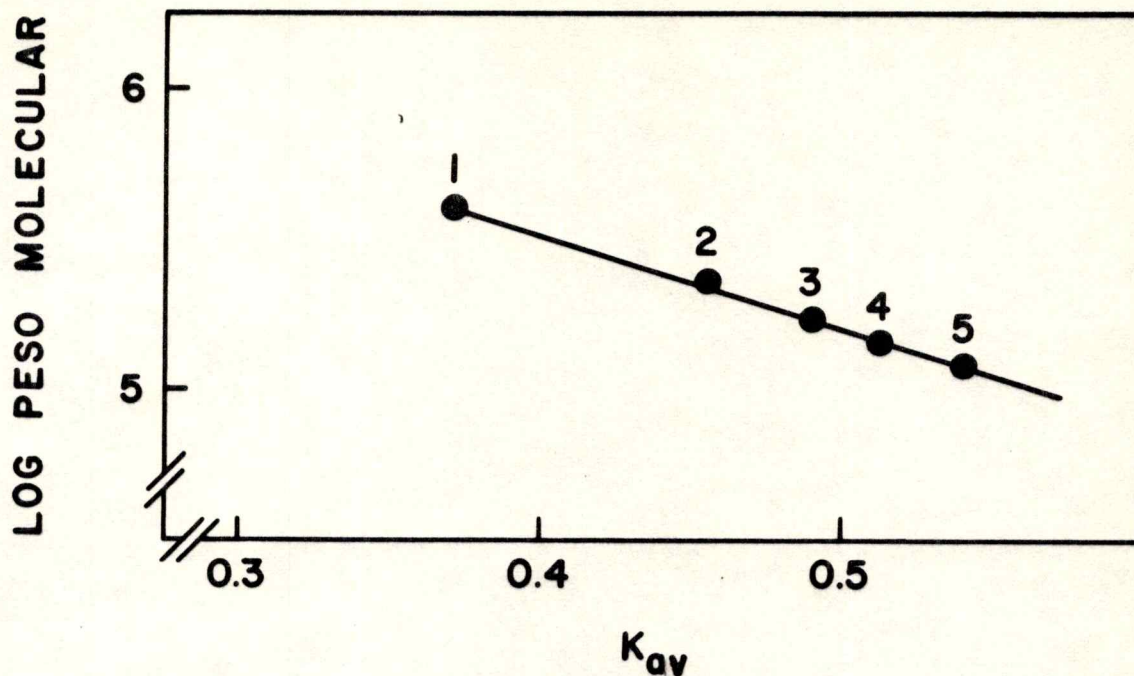


Figura 6. Calibración de la columna de Sepharosa 6B.

La filtración del inhibidor se realizó en la forma indicada en la figura 5. La columna se calibró con patrones de peso molecular conocido como catalasa (P.M. 240.000), γ -globulinas humanas (P.M. 166.000), fosforilasa b (P.M. 98.000) y seroalbúmina de bovino. Los números en la figura indican la elución del inhibidor de la síntesis proteica (1), catalasa (2), γ -globulinas humanas (3), fosforilasa b (4) y seroalbúmina de bovino (5).

Evidencias de la naturaleza proteica de EI.

- Efecto de la temperatura sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

Con el objeto de ver qué efecto tenía la temperatura sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica se hizo una preincubación de una preparación purificada del inhibidor durante tres minutos a diferentes temperaturas y posteriormente se analizó su actividad a 37° en la síntesis de polifenilalanina en presencia de poli U.

En la figura 7 se puede observar el efecto de la preincubación del inhibidor a diferentes temperaturas, sobre la inhibición de la síntesis de proteínas. Se observa que la actividad desaparece en forma abrupta al preincubar el factor a temperaturas mayores de 40° para desaparecer totalmente a 60°. La termolabilidad de EI sugiere que este factor es de naturaleza proteica.

- Acción de la ribonucleasa pancreática sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

Con el fin de determinar si el inhibidor tenía una estructura proteica o si era un ácido nucleico como RNA se trató una preparación semipurificada del inhibidor con ribonucleasa pancreática previo a la determinación de su actividad.

En la tabla II podemos observar el efecto de preincubar con ribonucleasa A una preparación purificada de inhibidor durante 10 minutos a 37°. Se observa que esta preincubación en presencia de concentraciones que van de 0,01 a 1,0 µg/ml de RNAs no tiene efecto sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

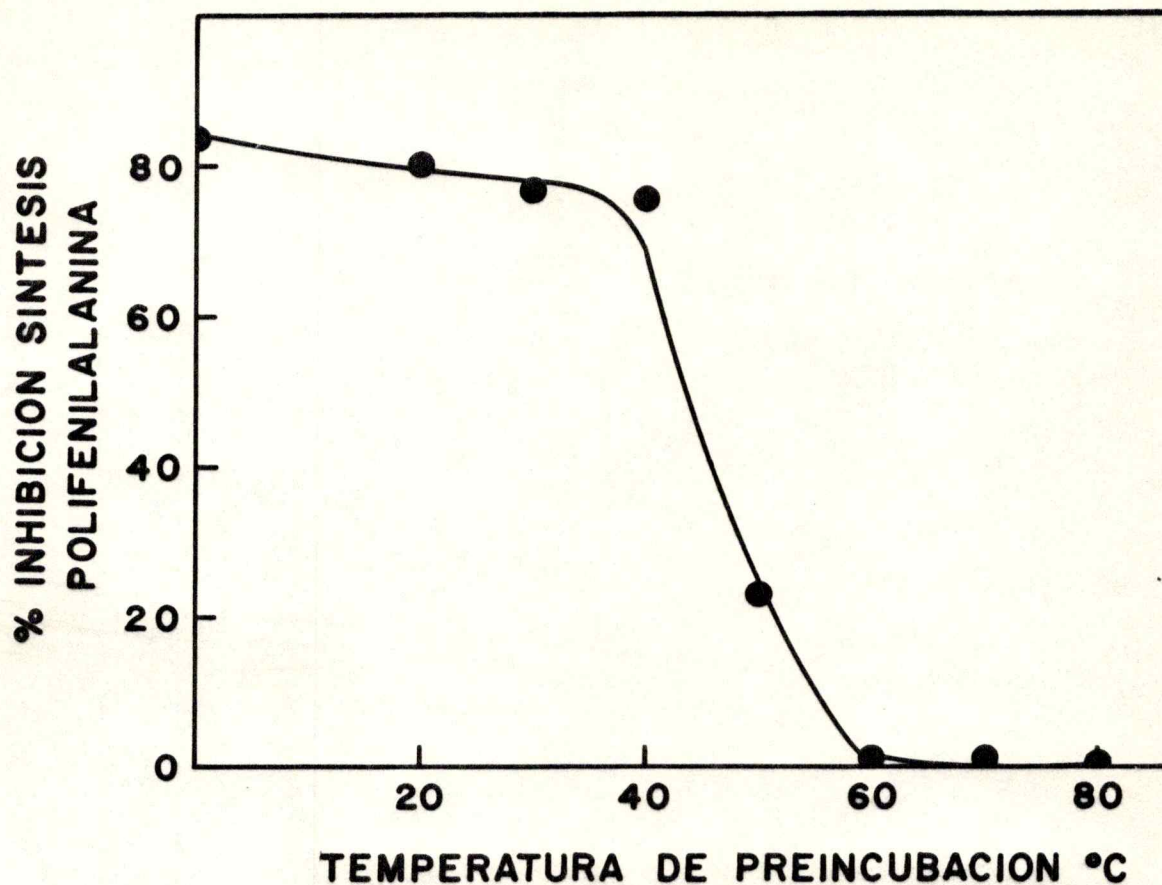


Figura 7. Efecto de la preincubación del inhibidor a diferentes temperaturas.

Se preincubó durante tres minutos a cada temperatura señalada una preparación de inhibidor parcialmente purificada, que se agregó posteriormente (5 μg) a un sistema de síntesis de polifenilalanina que usaba 0,5 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* y fracción sobrenadante de germen de trigo. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con TCA frío. Esta reacción se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un contador de centelleo.

Tabla II

Efecto de RNasa pancreática y tripsina sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica

Exp.	Tratamiento	% Inhibición
1.	+ Inhibidor	51
	+ Inhibidor + RNasa (0,01 $\mu\text{g/ml}$)	55
	+ Inhibidor + RNasa (0,1 $\mu\text{g/ml}$)	54
	+ Inhibidor + RNasa (1 $\mu\text{g/ml}$)	52
2.	+ Inhibidor	46
	+ Inhibidor + tripsina(10')	23
	+ Inhibidor + tripsina(20')	0
	+ Inhibidor + tripsina(30')	0

Tabla II

Efecto de RNasa pancreática y tripsina sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina.

Para probar el efecto de RNasa A sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica se preincubó una preparación parcialmente purificada del inhibidor con RNasa A durante 10 minutos a 37° y se detuvo la reacción agregando Heparina (sal de sodio) para tener una concentración final de 100 veces mayor que la concentración de RNasa.

El efecto de tripsina sobre la actividad del inhibidor se estudió preincubando una preparación parcialmente purificada del inhibidor con tripsina en una concentración de tripsina de 1/100 de la concentración de proteínas totales. Finalizada la incubación, la reacción se detuvo agregando inhibidor de tripsina de poroto de soya en cantidad suficiente para tener el doble de concentración de tripsina en el medio de reacción.

La actividad de las preparaciones de inhibidor tratadas con RNasa y tripsina se analizaron en un sistema de síntesis de polifenilalanina como se describe en Métodos. Se usó 0,6 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de X.laevis, una alícuota de 10 μ g (proteínas totales) de una fracción sobrenadante de germen de trigo y 5 μ g de la preparación de inhibidor tratada con RNasa o tripsina. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con TCA al 5% frío.

Esta reacción se filtró a través de filtros de fibra de vidrio y éstos filtros se contaron posteriormente en un sistema de centelleo.

- Efecto de la tripsina sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

Con el fin de estudiar si el factor inhibitorio de la síntesis de proteínas era de naturaleza proteica, se hizo una preincubación de este factor en presencia de tripsina y posteriormente se midió su actividad en la síntesis de polifenilalanina.

Como se observa en la Tabla II, al preincubar una preparación purificada del inhibidor con tripsina a una concentración final de 6 g/ml hay una pérdida gradual de la actividad de este factor. La pérdida total de actividad se produce después de 10 minutos de incubación con tripsina en las condiciones antes señaladas.

Este resultado conjuntamente con el del efecto de la RNasa sobre la actividad del inhibidor (Tabla II) nos permiten concluir que aparentemente este factor es de naturaleza proteica.

Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina.

Ya que entre la variada gama de proteínas que interactúan con el ribosoma hay factores de iniciación y elongación que requieren de la presencia de de grupos -SH para su actividad (180) se probó el efecto de un bloqueador de estos grupos sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

En la Tabla III podemos observar el efecto de la preincubación de una preparación purificada del inhibidor de la síntesis proteica con N-etilmaleimida durante 15 minutos a 0°. Se observa que este reactivo a una concentración de 10^{-3} M produce una pérdida total de la actividad del inhibidor. Este resultado sugiere la existencia de un grupo o grupos -SH indispensables para la actividad del inhibidor,

Tabla III

Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina

Sistema	¹⁴ C polipe sintetizada (pmoles)	% inhibición
Control	6,10	
+ Inhibidor (5µg)	3,48	43
Control	5,73	
+ Inhibidor (2,5 µg) preincubado con NEM	5,71	0
Control	5,93	
+ Inhibidor (5 µg) preincubado con NEM	6,10	0

Se preincubó una preparación de inhibidor parcialmente purificada durante 5 minutos a 37°; luego se llevó a 0° y se le agregó N-etilmaleimida hasta tener una concentración final de 1 mM. La incubación se realizó durante 15 minutos y la reacción se detuvo agregando DTT en concentración suficiente para tener el doble de la concentración de N-etilmaleimida. La síntesis de polifenilalanina se realizó en la forma habitual (ver Métodos) usando la preparación de inhibidor tratada con N-etilmaleimida y ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* (0,65 unidades A₂₆₀/ensayo). Esta reacción se incubó durante 20 minutos a 37°, se detuvo con TCA al 5% frío, se filtró a través de filtros de fibra de vidrio y estos filtros se contaron en un contador de centelleo.

ya sea por participación en la actividad misma o porque indirectamente actúa en la mantención de la estructura nativa del inhibidor.

Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica.

La Figura 8 muestra el efecto del pH del medio sobre la actividad de una preparación purificada del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina. Se puede observar que entre pH 6,0 y 7,3 la actividad del inhibidor permanece constante en alrededor de un 50% de inhibición, para luego caer bruscamente y desaparecer a pH sobre 8,0. Es importante hacer notar que a valores de pH entre 8 y 8,3 la síntesis proteica en ausencia de inhibidor, presenta su óptimo de actividad.

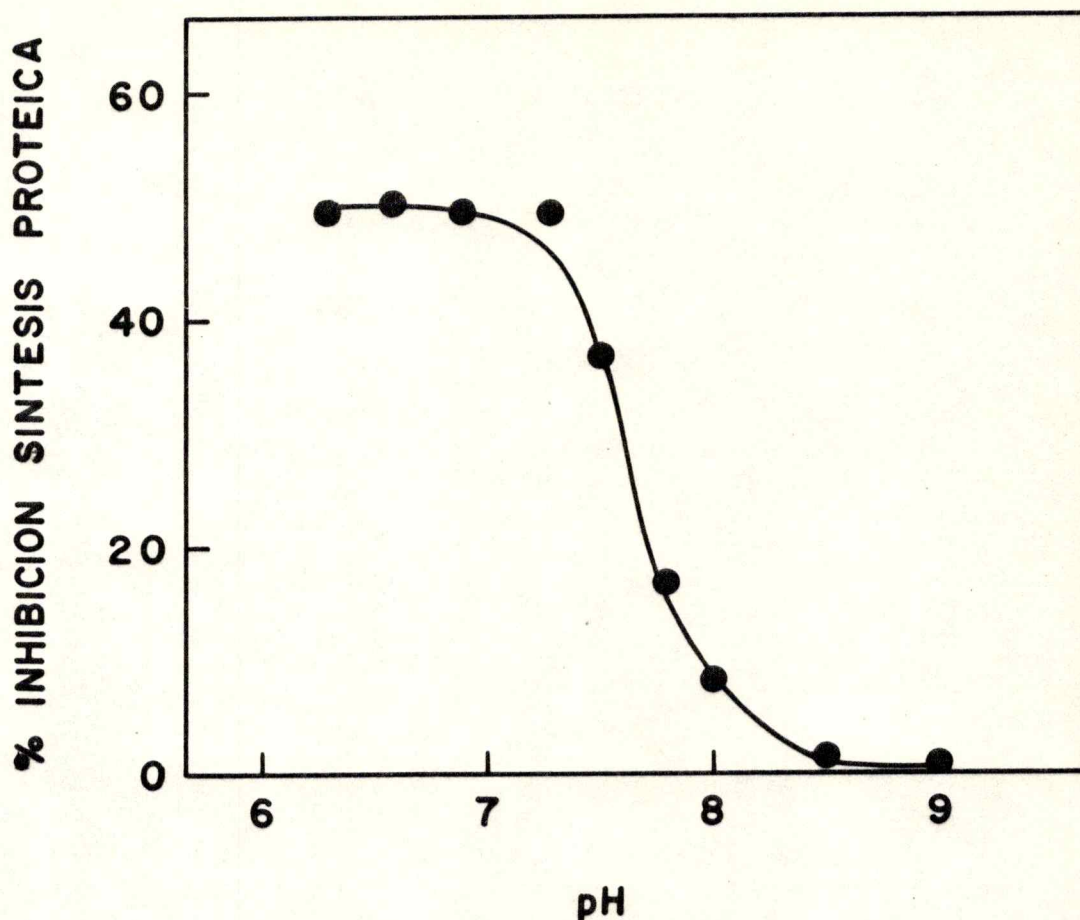


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina.

La síntesis de polifenilalanina se realizó en la forma indicada en Métodos. Se usó como solución tampón Hepes entre valores de pH de 6,0 a 7,5 y Tris-Ac entre 7,5 y 9,0. La reacción llevaba una concentración de 30 mM de cada solución tampón, 5 μ g de una solución de inhibidor parcialmente purificada y ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* (0,8 unidades A_{260} /tubo). Esta reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con TCA al 5% frío, para después filtrarla a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

CAPITULO SEGUNDO

Sitio de acción del inhibidor de la síntesis proteica.

Inhibición de la síntesis proteica en sistemas eucarióticos y procarióticos.

Con el fin de probar la actividad del inhibidor de la síntesis proteica frente a ribosomas de diferentes fuentes, se realizó el ensayo de síntesis de polifenilalanina utilizando ribosomas de diferentes especies de procariotes y eucariotes.

En la Tabla IV se observa el comportamiento del inhibidor de la síntesis proteica frente a ribosomas lavados de ovario de X.laevis, ribosomas lavados de germen de trigo y ribosomas lavados de E.coli. Podemos observar que el inhibidor es activo frente a ribosomas de procariotes y eucariotes, siendo la actividad para ambos sistemas muy similar (E.coli y X.laevis). Al usar ribosomas lavados de germen de trigo se observa una menor actividad del inhibidor, en comparación a la existente con igual cantidad de ribosomas lavados de X.laevis. En la misma tabla se muestra la actividad del inhibidor frente a polisomas aislados de hígado de rata en los cuales la síntesis de proteínas estaría dirigida por un mRNA natural endógeno; se observa una inhibición de la síntesis proteica de magnitud similar a la existente cuando se usan ribosomas libres. Esta inhibición de la síntesis proteica en un sistema que usa polisomas aislados refuerza resultados anteriores en relación a que la acción del inhibidor sería sobre la etapa de elongación del proceso de síntesis proteica, ya que en este sistema se mide mayormente la elongación de la cadena polipeptídica.

Tabla IV

Inhibición de sistemas procarióticos y eucarióticos

Fuente	R i b o s o m a s U : A ₂₆₀ /ensayo	mRNA	% inhibición de la síntesis proteica
<u>Ovario de X.laevis</u>	0,3	Poli U	43
Germen de trigo	0,3	Poli U	19
<u>E.coli</u>	0,3	Poli U	45
Polisomas de hígado de rata	0,5	Endógeno	65

La síntesis de proteínas se realizó en la forma que se indica en Métodos, en presencia de 5 µg de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica. Para la síntesis de polifenilalanina se usaron ribosomas lavados en la forma que se indica en métodos. La síntesis proteica en un sistema que usa polisomas aislados de hígado de rata se realizó en la forma que se detalla en la figura 10.

Reversión de la inhibición por la adición de un exceso de ribosomas.

Se ensayó el efecto de la adición de un exceso de ribosomas lavados de ovario de X.laevis sobre la actividad del inhibidor de la síntesis proteica, usando una preparación de inhibidor parcialmente purificada.

En la figura 9 se observa que al aumentar la cantidad de ribosomas sobre el valor control, que es de 0,3 unidades A_{260} /ensayo, se produce una reversión de la inhibición causada por EI. Es importante hacer notar que en estas condiciones el control, que lleva una preparación inactivada de inhibidor, presenta una estimulación máxima de un 16% en la síntesis proteica al agregar un exceso de ribosomas. Resultados similares se observaron al usar polisomas aislados de hígado de rata. En la figura 10 podemos observar que tal como en el caso de ribosomas libres, adición de un exceso de polisomas produce una reversión del efecto inhibitorio de EI.

La cantidad de ribosomas necesaria para revertir el efecto inhibitorio está en relación directa con el grado de inhibición existente en esas condiciones; es decir, frente a una mayor inhibición de la síntesis proteica es necesario agregar una mayor cantidad de ribosomas para producir la reversión de la inhibición. Esta afirmación se ilustra con el experimento detallado en la figura 11, en que es posible observar que para la reversión del sistema de germen de trigo se necesita agregar una menor cantidad de ribosomas lavados que los necesarios para revertir el sistema de X.laevis.

Al ensayar la posible reversión del efecto de EI por la adición de un exceso de factores de elongación de germen de trigo o por la adición de un exceso de phe-tRNA (Tabla V), no se observó efecto alguno. Estos resultados

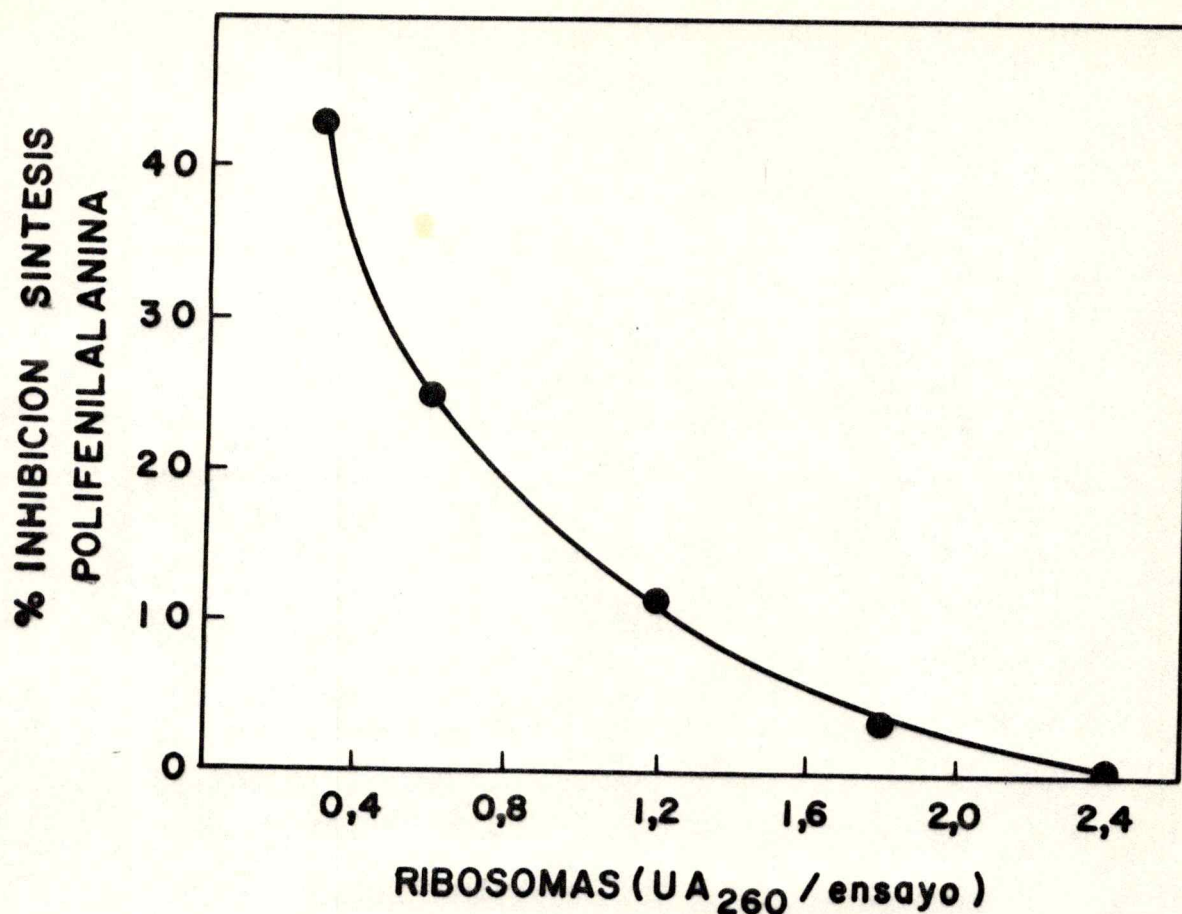


Figura 9. Reversión de la inhibición de la síntesis proteica por la adición de ribosomas lavados de ovario de X.laevis.

La síntesis de [¹⁴C] polifenilalanina se realizó en la forma que se indica en Métodos, en presencia de cantidades crecientes de ribosomas lavados de ovario de X.laevis y 3,5 μg de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°, se detuvo con TCA al 5% frío, se filtró a través de filtros de fibra de vidrio y los filtros se contaron en un sistema de centelleo.

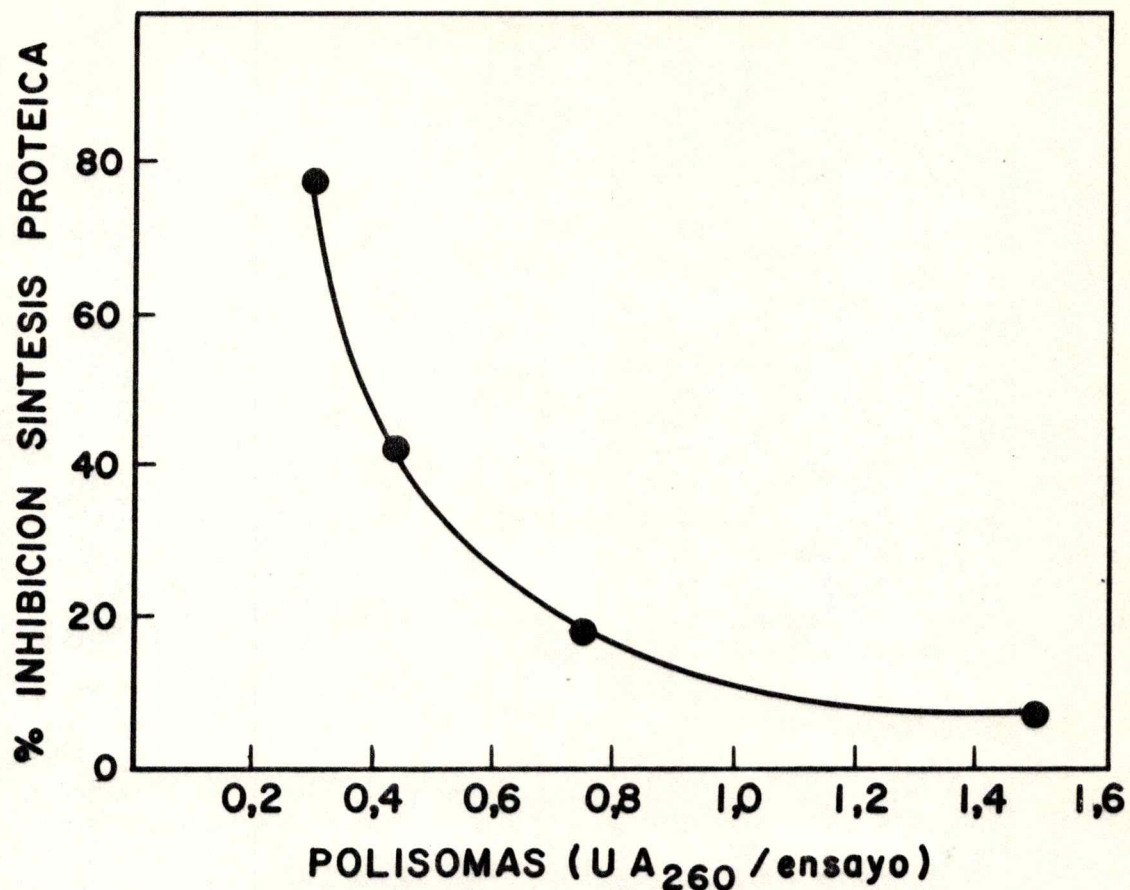


Figura 10. Reversión de la inhibición de la síntesis de polifenilalanina por la adición de polisomas aislados de hígado de rata.

La síntesis proteica in vitro en un sistema proveniente de hígado de rata se realizó en la forma que se detalla en Métodos. Se agregaron cantidades crecientes de polisomas aislados de hígado de rata y 7 μ g de una preparación del inhibidor de la síntesis proteica parcialmente purificada. La reacción se incubó durante 30 minutos a 30° y se detuvo agregando una solución de metionina no radioactiva para tener una concentración final de 1 mM y TCA al 5% frío; se calentó durante 15 minutos a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

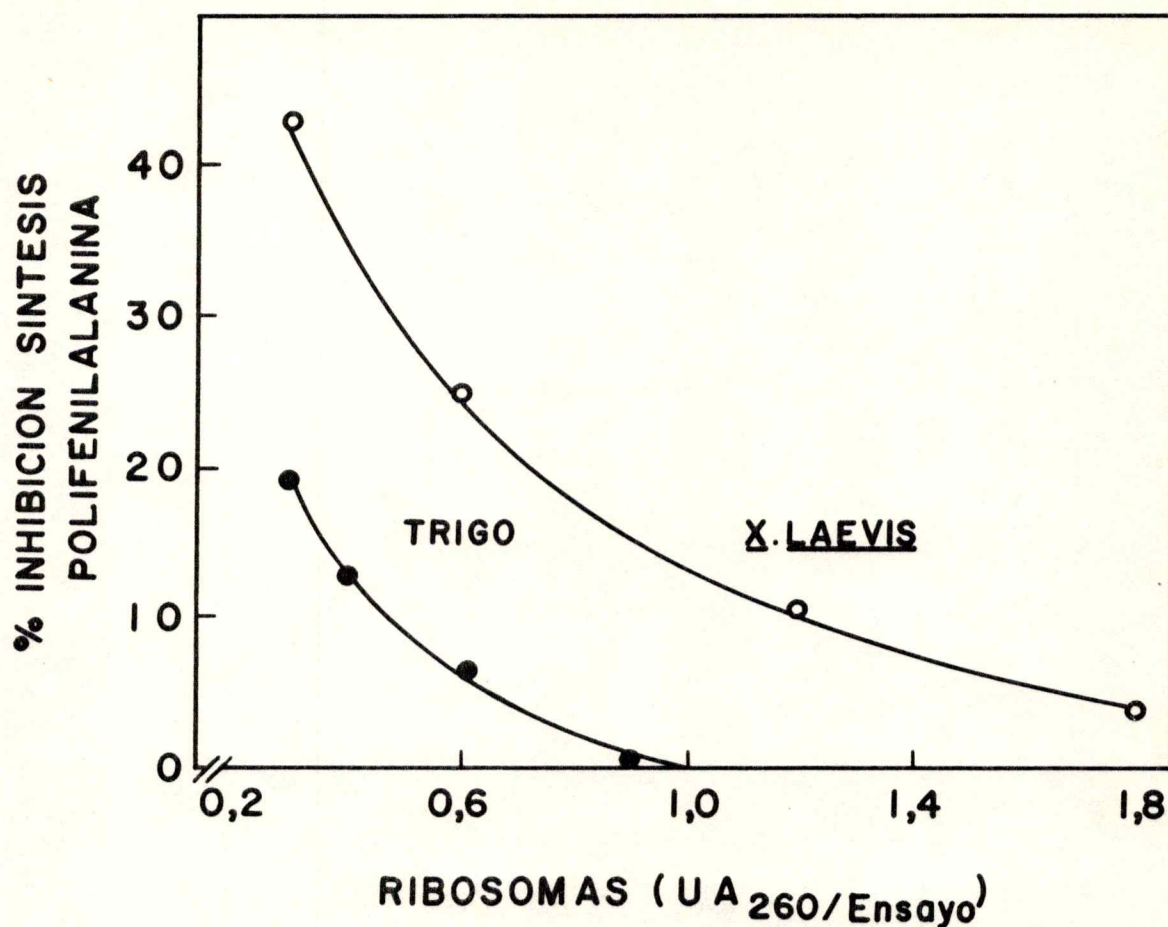


Figura 11. Reversión de la inhibición de la síntesis proteica por la adición de ribosomas lavados de ovario de X.laevis o de germen de trigo.

La reacción de síntesis de $[^{14}\text{C}]$ polifenilalanina se realizó en la forma que se detalla en Métodos, en presencia de cantidades crecientes de ribosomas lavados de germen de trigo u ovario de X.laevis, y $3,5\ \mu\text{g}$ de una preparación de inhibidor parcialmente purificada. Esta reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con 2 ml de TCA al 5% frío. Se filtró por filtros de fibra de vidrio y los filtros se contaron en un contador de centelleo.

Tabla V

Efecto de la adición de un exceso de [^{14}C]fenilalanil-tRNA sobre la inhibición de la síntesis de polifenilalanina

Sistema	^{14}C fenilalanil-tRNA agregado (pmoles)	[^{14}C] polifenilalanina sintetizada (pmoles)	% Inhibición
Control	11,5	10,2	
+ Inhibidor		4,6	56,2
Control	23	11,7	
+ Inhibidor		4,5	59,0
Control	34	9,6	
+ Inhibidor		4,0	58,3
Control	46	9,0	
+ Inhibidor		3,3	60,0

La síntesis de polifenilalanina a partir de fenilalanil-tRNA se realizó de acuerdo a lo indicado en Métodos, agregando cantidades crecientes de [^{14}C]fenilalanil-tRNA y una preparación de inhibidor parcialmente purificada (3 μg /ensayo) como se indica en Métodos. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo agregando 1,5 ml de una solución de TCA al 5% frío, se calentó durante 15 minutos a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio. La radioactividad retenida en los filtros se midió en un contador de centelleo.

sugieren que el blanco de acción del inhibidor serían los ribosomas.

Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo.

La purificación de los factores EF-1 y EF-2 de germen de trigo, se realizó a partir de un sobrenadante de 150.000 x g precipitado con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación. Esta fracción se filtró a través de una columna de Sephadex G-200. En la figura 12 se puede observar la separación parcial de ambos factores de elongación. Los tubos con actividad de EF-1 libre de EF-2 se precipitaron con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación, se centrifugaron, y el precipitado se guardó a -20° en una solución que contenía Tris-Ac 50 mM pH 7,5, β -mercaptoetanol 2 mM y glicerol 50% (v/v). Los tubos con actividad de EF-2 que estaban contaminados con EF-1 se juntaron y se cargaron en una columna de DEAE-celulosa DE-11 (1,6 x 10 cm) equilibrada con la misma solución usada para la elución de la columna de Sephadex G-200, y la elución se realizó en etapas con soluciones que contenían KCl 0,05, 0,15 y 0,3 M. En la fracción de KCl 0,05 M eluyó toda la actividad contaminada de EF-1; en cambio el factor de elongación EF-2 eluye en su mayor parte en la fracción que contiene KCl 0,15 M. Las fracciones con mayor actividad de EF-2 se precipitaron con sulfato de amonio entre 0 y 80% de saturación y el precipitado se disolvió en la misma solución usada para disolver el precipitado del factor de elongación EF-1. Esta fracción es estable durante varias semanas a -20° .

Este proceso de purificación de los factores de elongación nos produce factor EF-1 libre de la actividad de EF-2 y vice-versa, aunque ambos factores no están completamente purificados.

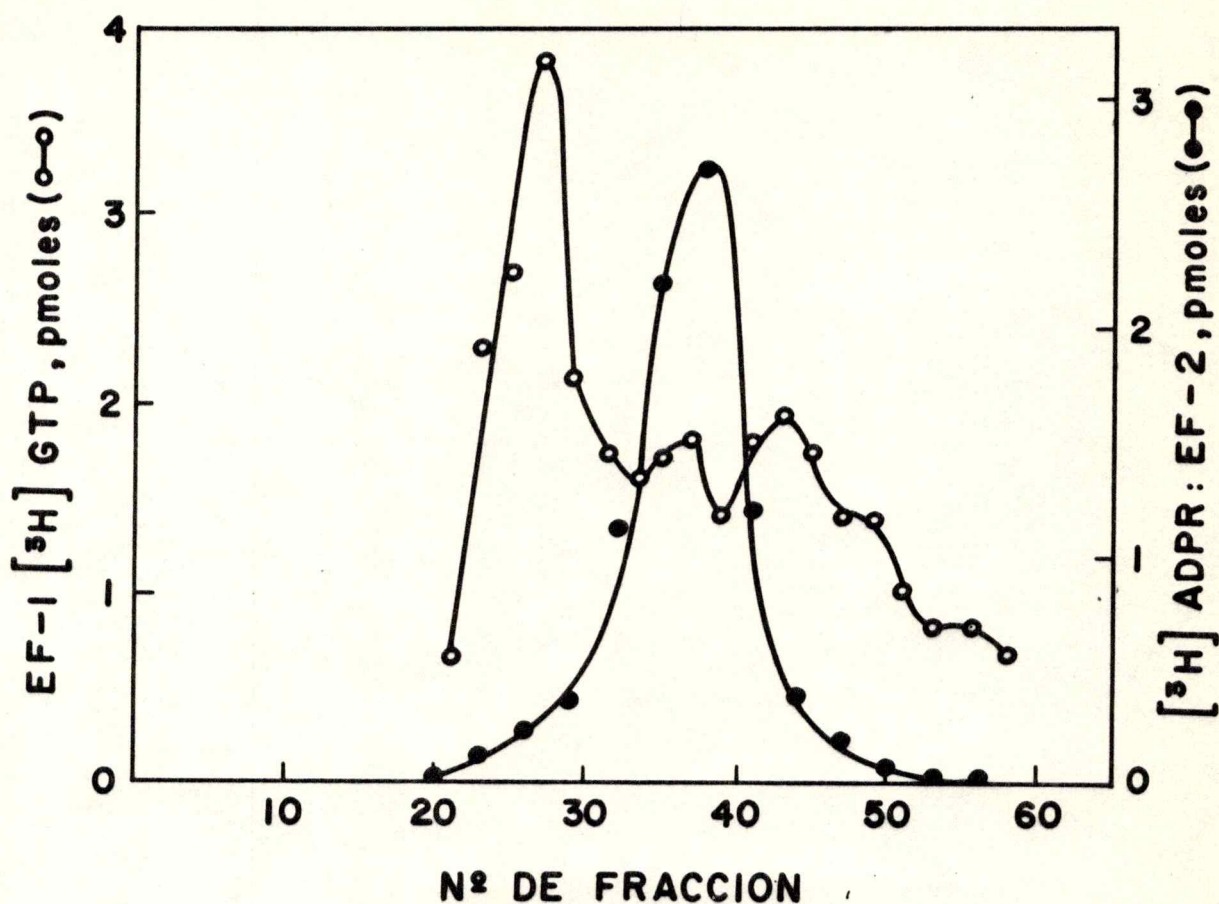


Figura 12. Purificación de los factores de elongación EF-1 y EF-2 de germen de trigo por filtración en columnas de Sephadex G-200.

Se hizo una columna de Sephadex G-200 (1,8 x 66 cm) equilibrada con una solución de Tris-Ac 50 mM, pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM y β-mercaptoetanol 2 mM. La columna se cargó con 15 mg de proteínas de una fracción sobrenadante de germen de trigo centrifugada a 150.000 x g precipitada con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación y se eluyó con la solución empleada para su equilibrio. El flujo fue de 6 ml/hora y se recogieron fracciones de 2 ml. La actividad del factor de elongación EF-1 se midió por su capacidad de formar un complejo binario con GTP. El factor se midió por una reacción de ADP-ribosilación de este factor que es catalizada por una preparación cruda de toxina diftérica en presencia de NAD⁺.

La actividad del factor de elongación EF-1 parcialmente purificado se midió por la estimulación de la unión de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas (Figura 13) y la del factor EF-2, por estimulación de la síntesis de ^{14}C polifenilalanina en presencia del factor de elongación EF-1 (figura 14).

Efecto de EI sobre las reacciones catalizadas por el factor de elongación EF-1.

Ya que el primer evento conducente a la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma es la formación del complejo EF-1:GTP, se probó el efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la formación de este complejo.

En la Tabla VI se puede observar el efecto de la adición de una preparación parcialmente purificada de EI sobre la formación del complejo EF-1: [^3H] GTP usando factor EF-1 purificado de germen de trigo en la forma ya descrita. Podemos observar que con una concentración de inhibidor suficiente como para tener un 80% de inhibición de la síntesis de polifenilalanina, no se observa ningún efecto sobre la formación del complejo binario EF-1: [^3H] GTP.

También se midió el efecto de EI sobre la unión de aminoacil-tRNA a ribosomas catalizada por el factor de elongación EF-1. En la Tabla VII podemos observar que el inhibidor de la síntesis proteica no tiene efecto sobre la unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas de X.laevis en presencia de cantidades saturantes del factor de elongación EF-1 de germen de trigo.

Resultados similares se obtuvieron al efectuar la reacción de unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas en forma no enzimática, que se realiza en ausencia de EF-1 y GTP y en concentraciones de Mg^{++} de 15 mM (Tabla VIII).

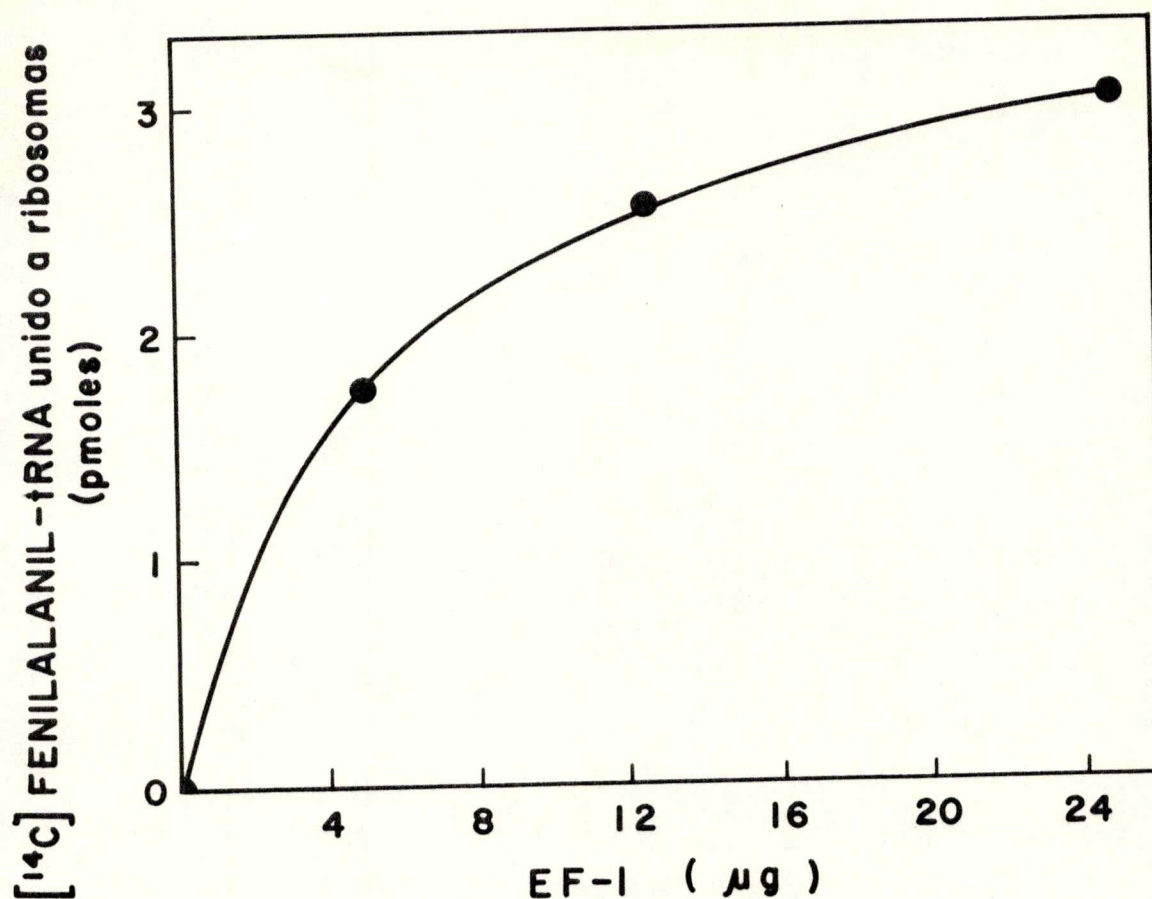


Figura 13. Determinación de la actividad del factor de elongación EF-1 de germen de trigo.

La reacción de unión de [¹⁴C] fenilalanil-tRNA a ribosomas se realizó en la forma que se indica en Métodos, usando una preparación de EF-1 parcialmente purificada por Sephadex G-200, 8 pmoles de [¹⁴C]-fenilalanil-tRNA (actividad específica 100 mCi/mmol) y 1 unidad A₂₆₀/tubo de ribosomas lavados de germen de trigo. La reacción se incubó durante 15 minutos a 37° y se detuvo por dilución con 3 ml de una solución de Tris-Ac 30 mM, pH 7,4, KCl 30 mM y MgAc₂ 10 mM. La reacción se filtró a través de filtros de nitrocelulosa, los filtros se secaron bajo una lámpara y se contaron en un contador de centelleo.

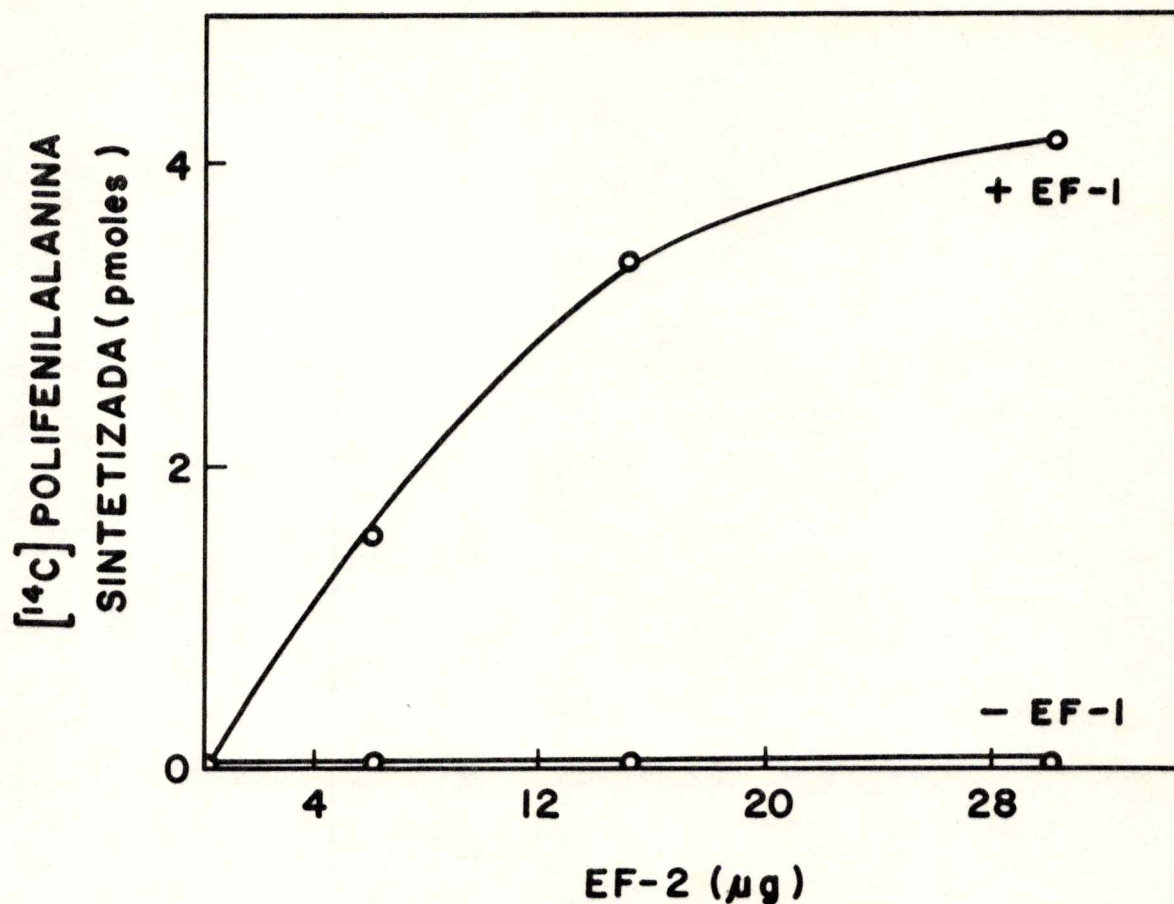


Figura 14. Determinación de la actividad del factor de elongación EF-2 de germen de trigo.

La reacción de síntesis de [¹⁴C] fenilalanina se realizó como se indica en Métodos, en presencia de 12 µg de factor de elongación EF-1 purificado como se indicó anteriormente y 1 unidad A₂₆₀/tubo de ribosomas lavados de germen de trigo. La incubación se realizó durante 20 minutos a 37° y se detuvo con TCA al 5% frío; se calentó durante 15 minutos a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un contador de centelleo.

Tabla VI

El inhibidor de la síntesis de polifenilalanina no afecta la unión de [³H]GTP al factor de elongación EF-1 de germen de trigo

S i s t e m a	EF-1: [³ H] GTP formado (pmoles)
Control	6,8
+ Inhibidor (2 µg)	7,2
Control	9,2
+ Inhibidor (5 µg)	9,6

La unión de [³H]GTP al factor de elongación EF-1 se realizó en la forma descrita en Métodos, agregando cantidades crecientes de una preparación del inhibidor de la síntesis proteica parcialmente purificada por cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en Sephadex G-200. La reacción se incubó durante 5 minutos a 0°, se detuvo por dilución con 2 ml de una solución fría que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,4, MgAc₂ 10 mM y KCl 30 mM y se filtró a través de filtros de nitrocelulosa que se secaron y contaron posteriormente en un contador de centelleo.

Tabla VII

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la unión de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas, catalizada por el factor de elongación EF-1

Exp.	Sistema	EF-1 (μg)	[^{14}C] fenilalanil-tRNA unido a ribosomas (pmoles)
1.	Control		3,6
	+ Inhibidor (10 μg)	6	4,1
	Control		4,2
	+ Inhibidor (10 μg)	15	4,4
2.	Control		3,9
	+ Inhibidor (12 μg)	6	3,8
	Control		4,5
	+ Inhibidor (12 μg)	15	4,7
3.	Control		3,9
	+ Inhibidor (15 μg)	6	4,2
	Control		4,3
	+ Inhibidor (15 μg)	15	4,5

Tabla VII

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la unión de [14 C] fenilalanil-tRNA a ribosomas, catalizada por el factor de elongación EF-1.

La reacción, realizada en la forma descrita en Métodos, se incubó durante 15 minutos a 37° usando ribosomas lavados de ovario de X.laevis tratados con N-etilmaleimida, factor de elongación EF-1 parcialmente purificado de germen de trigo y una preparación de inhibidor obtenida en la forma que se detalla en Métodos. La reacción se detuvo por dilución agregando 3 ml de una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, MgAc₂ 5 mM y KCl 50 mM; se filtró a través de filtros de nitrocelulosa y la radioactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo.

Tabla VIII

Efecto del inhibidor sobre la unión no enzimática de
 $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas

Inhibidor μg	pmoles $[^{14}\text{C}]$ control	fenilalanina unidos a ribosomas + inhibidor
	10,0	9,6
5,4	10,2	9,8
8,4	9,6	10,4
13,5	10,6	10,2
19,0	9,5	9,5
27,0	9,4	9,3
40,0	9,4	9,6

La reacción de unión de fenilalanil-tRNA a ribosomas se realizó en la forma que se indica en Métodos, en presencia de 15 mM de Mg^{++} , 0,9 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* y cantidades variables de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis de proteínas. La reacción se incubó durante 20 minutos a 20° y se detuvo por dilución agregando 2 ml de una solución de Tris-Ac 30 mM pH 7,2, MgAc_2 10 mM y β -mercaptoetanol 2 mM. Los tubos se filtraron a través de filtros de miliporo que se secaron bajo una lámpara y se contaron posteriormente en un sistema de centelleo.

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la reacción de translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A del ribosoma al sitio P del ribosoma.

La reacción de translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P del ribosoma se midió estudiando la formación de [^{14}C] fenilalanil-puromicina descrita por Nathans (181). Esta reacción involucra dos etapas del proceso de elongación que son la formación del enlace peptídico catalizado por la peptidil transferasa y la translocación propiamente tal del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P del ribosoma que es catalizada por el factor de elongación EF-2. Esta reacción es clave en el proceso de elongación y de ahí la importancia de determinar cuál es el comportamiento del inhibidor frente a esta reacción de translocación. Para este efecto se realizó la reacción de síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina en presencia de factores de elongación EF-1 y EF-2 purificados de germen de trigo y una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica.

Como podemos observar en la Tabla IX la adición del inhibidor de ovario de X.laevis a un sistema que sintetiza [^{14}C] fenilalanil-puromicina, conduce a una inhibición de la síntesis de este compuesto. Esta inhibición aumenta cuando se agrega una mayor cantidad de la preparación del inhibidor ya descrita.

Como dijimos anteriormente, en esta reacción de síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina están involucradas dos etapas del proceso de elongación, la formación del enlace peptídico y la translocación del peptidil-tRNA. Con el fin de determinar en forma precisa en cuál de estas dos etapas actúa el inhibidor, es preciso determinar su acción en cada uno de los dos eventos por separado.

Tabla IX

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre
la síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina

Exp.	Sistema	EF-2 (μg)	[^{14}C] fenilalanil-puromicina formados (pmoles)	% Inhibición
1.	Control	8	3,20	45
	+ Inhibidor		1,76	
	Control	20	2,90	53
	+ Inhibidor		1,34	
2.	Control	8	5,0	36
	+ Inhibidor		3,22	
	Control	12	5,24	42
	+ Inhibidor		2,82	
	Control	20	4,91	45
	+ Inhibidor		2,70	

Tabla IX

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la síntesis de [^{14}C] fenilalanil-puromicina.

Se realizó una unión no enzimática de [^{14}C] fenilalanil-tRNA a ribosomas incubando la reacción que se describe en Métodos durante 20 minutos a 37° en presencia de 10 μg /ensayo de una preparación de inhibidor parcialmente purificada y 0,6 unidades A_{260} /tubo de ribosomas lavados de ovario de X.laevis. Finalizada esta incubación se agregó factor de elongación EF-2 parcialmente purificado de germen de trigo, puromicina para tener una concentración final de 10^{-4} M y se continuó la incubación durante 20 minutos más a 37°. La reacción se detuvo agregando 1 ml de una solución de fosfato de potasio 0,1 M pH 8,0 y 1,5 ml de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 x g; finalizada la centrifugación, se tomó una alícuota de la fase orgánica y se determinó la radioactividad en un sistema para contar muestras líquidas.

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad GTPásica del factor de elongación EF-2.

El efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad del factor de elongación EF-2 purificado de germen de trigo, se estudió midiendo la actividad de hidrólisis de GTP que presenta este factor en presencia de ribosomas (182). La reacción se realizó usando una preparación purificada de EF-2 de germen de trigo, inhibidor de la síntesis proteica purificado en la forma ya descrita y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ preparado siguiendo la técnica descrita por Glenn y col. (176).

Al realizar esta reacción y medir el ^{32}P liberado en presencia de una preparación parcialmente purificada de El, se obtienen los resultados que se presentan en la Tabla X. Se puede observar que el inhibidor en cantidad suficiente como para producir un 75% de inhibición de la síntesis de polifenilalanina, no tiene efecto sobre la reacción de hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ dependiente de ribosomas catalizada por el factor de elongación EF-2. Es importante indicar que el factor inhibidor no presenta actividad de hidrólisis de GTP per se.

El efecto directo del inhibidor sobre la actividad de EF-2 en la síntesis de polifenilalanina no es posible determinar, ya que en esta reacción están involucradas las actividades del factor de elongación EF-1 y de la peptidil transferasa.

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad de la peptidil transferasa.

Con el fin de determinar con mayor exactitud el sitio de acción del inhibidor de la síntesis proteica, se midió el efecto de una preparación parcialmente purificada de este inhibidor sobre la actividad de la peptidil

Tabla X

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la actividad GTPásica del factor de elongación EF-2 dependiente de ribosomas

S i s t e m a	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP hidrolizado (pmoles)
Control	80
+ Inhibidor (3 μg)	93
Control	86
+ Inhibidor (7 μg)	79
Control	99
+ Inhibidor (10,5 μg)	103

La reacción que contenía Tris-Ac 75 mM pH 7,2, KCl 30 mM, EDTA 25 mM, DTT 1 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 4×10^{-5} M (7,6 cpm/pmol), 0,5 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de X.laevis y 20 μg de factor de elongación EF-2 de germen de trigo se incubó durante 20 minutos a 37° en presencia de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica. La **reacción** se detuvo agregando una suspensión de carbón activado Norit A al 1% en H_3PO_4 0,1 M, los tubos se agitaron durante 2 minutos en un Vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 x g. El GTP hidrolizado se determinó contando una alícuota del sobrenadante de los tubos centrifugados en la solución para contar muestras líquidas descrita en Métodos.

transferasa. La actividad de la peptidil transferasa se determinó usando dos métodos diferentes: la síntesis de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina y la formación de [^{14}C] fenilalanil-fenilalanina.

a) Síntesis de N-acetil ^{14}C fenilalanil-puromicina.

La reacción de síntesis de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina se realizó fundamentalmente de acuerdo al procedimiento señalado por Rahaminoff y col. (174). El N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA se preparó a partir de un [^{14}C] fenilalanil-tRNA purificado por cromatografía en DEAE-celulosa benzoilada como se observa en la Figura 15 y se acetiló empleando el proceso de Haenni y Chapeville (175). El porcentaje de acetilación del fenilalanil-tRNA se midió mediante una electroforesis de este compuesto en las condiciones que se indican en la Figura 16.

La síntesis de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina se realizó en dos etapas; la primera consistió en la unión no enzimática del N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA al ribosoma y la segunda en la formación del enlace peptídico entre este compuesto y la puromicina. Al realizar esta reacción en presencia de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla XI; podemos observar que existe una clara inhibición de la peptidil transferasa y esta inhibición aumenta al agregar cantidades crecientes del inhibidor de la síntesis proteica. Es importante notar que la reacción de unión del N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA al sitio P del ribosoma no es afectada por la presencia del inhibidor de la síntesis proteica.

b) Síntesis de [^{14}C] fenilalanil-fenilalanina.

Para la síntesis del dipéptido [^{14}C] fenilalanil-fenil-

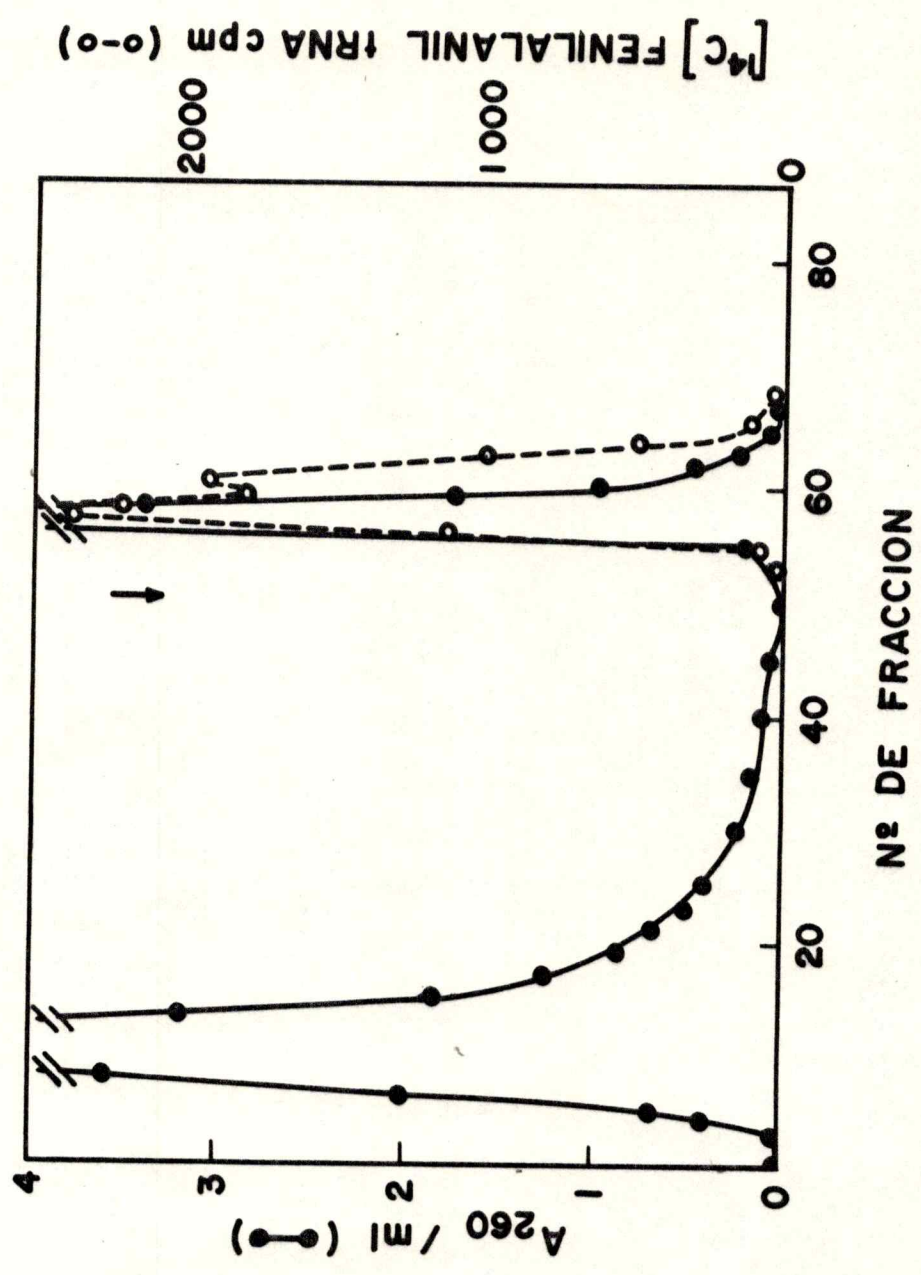


Figura 15.

Figura 15.

Purificación del $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa benzoilada.

El $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA preparado en la forma descrita en Métodos se purificó en una columna de DEAE-celulosa benzoilada previamente lavada con una solución que contenía KAc 50 mM pH 5,0, MgAc_2 10 mM, NaCl 1,5 M y etanol puro 15% (v/v). La columna se equilibró con una solución que contenía KAc 50 mM pH 5,0, MgAc_2 10 mM y NaCl 1 M; se cargó con 200 unidades A_{260} de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA disuelto en esta misma solución. La elución se realizó con la misma solución usada para equilibrar la columna y una vez que la absorbancia a 260 nm del eluido fue despreciable, se eluyó la columna con una solución igual a la usada para lavar inicialmente la resina. Se recogieron fracciones de 2 ml y el flujo de la columna se ajustó a 1 ml/minuto. La flecha en la figura indica el cambio de solución de elución.

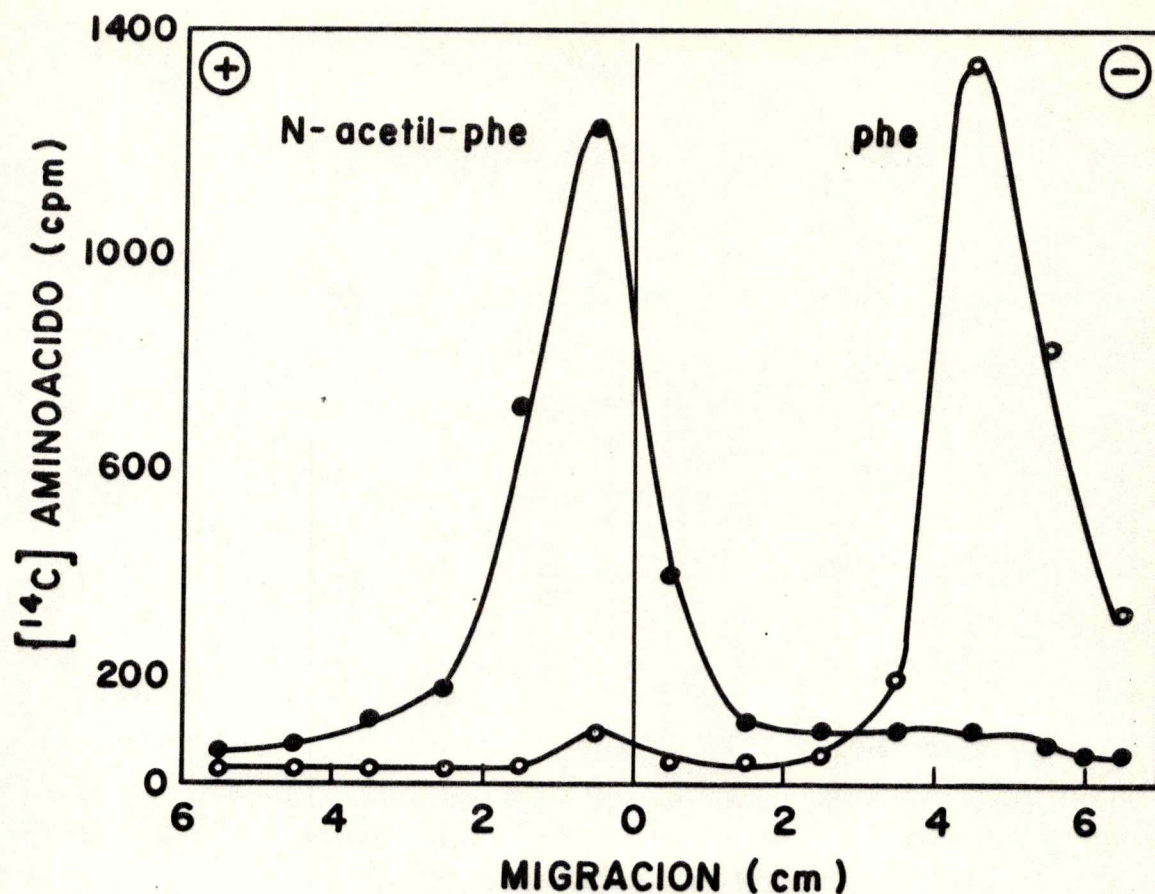


Figura 16. Separación de fenilalanina y N-acetilfenilalanina por electroforesis en papel.

El $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA y el N-acetil $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA preparados en la forma que se describe en Métodos, se desacilaron incubándolos durante 15 minutos a 37° en una solución que contenía NH_4OH 2 N. Finalizada la incubación las muestras se colocaron en una hoja de papel Whatman N°1 de 10 x 70 cm junto con los patrones respectivos de fenilalanina y N-acetilfenilalanina; luego se realizó una electroforesis aplicando 1370 voltios durante 75 minutos y usando ácido fórmico 0,5 M como solución de electrodo. Finalizada la electroforesis la tira de papel se secó y se reveló con una solución de ninhidrina al 0,3% en acetona, para después cortarlo en trozos de 2 x 1 cm, cuya radioactividad se midió en un contador de centelleo.

Tabla XI

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la formación de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina.

Exp.	Sistema	N-acetil [^{14}C] fenilalanil-puromicina formados (pmoles)	% Inhibición
1.	Control	2,3	
	+ Inhibidor (4,5 μg)	2,1	9,6
	" (6,8 μg)	1,7	22,0
	" (9,0 μg)	1,6	30,0
2.	Control	2,4	
	+ Inhibidor (6,8 μg)	2,0	18,0
	" (9,0 μg)	1,8	26,0

Se realizó una unión no enzimática de N-acetil [^{14}C] fenilalanil-tRNA purificado a ribosomas lavados de ovario de *X.laevis*, incubando la reacción durante 15 minutos a 37° en presencia de MgAc_2 15 mM y de una preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica. Se agregó posteriormente puromicina neutralizada para obtener una concentración final de 10^{-4} M y se continuó la incubación a 37° durante 15 minutos más. La reacción se detuvo agregando 0,1 ml de una solución de fosfato de potasio 0,1 M pH 8,0 y 1,5 ml de acetato de etilo, agitando vigorosamente. La reacción se centrifugó durante 10 minutos a $2000 \times g$, se tomó una alícuota de la fase orgánica y se midió la radioactividad en una solución para muestras líquidas.

alanina se siguió la técnica descrita por Pestka y col. (178). La reacción se realizó a partir de [^{14}C] - fenilalanil-tRNA puro y se midió por la formación del dipéptido señalado; este dipéptido se analizó por una cromatografía descendente en papel que separa claramente la difenilalanina de la fenilalanina como se observa en la Figura 17.

La adición de una preparación semipurificada del inhibidor de la síntesis de polifenilalanina al sistema de síntesis del dipéptido produce una inhibición de esta síntesis, como se observa en la Tabla XII; esta inhibición aumenta al agregar cantidades crecientes del inhibidor.

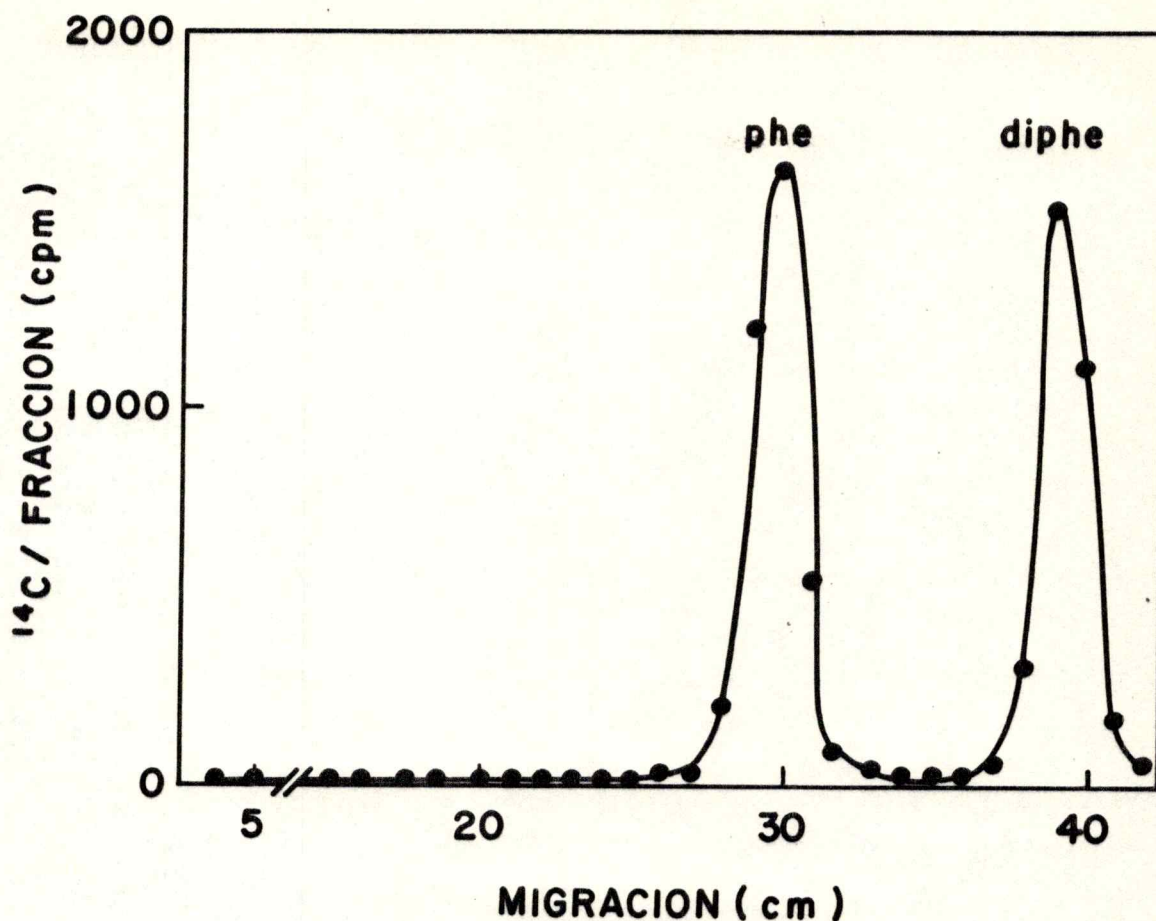


Figura 17. Separación de fenilalanina y difenilalanina por cromatografía en papel.

Las muestras obtenidas de la reacción de síntesis del dipéptido fenilalanil-fenilalanina se colocaron en un trozo de papel Whatman N°3 de 2 x 50 cm y se realizó una cromatografía descendente durante 15 horas usando como solvente una solución de n-butanol:ácido acético:agua en una relación de 3:1:1. Finalizada la cromatografía el cromatograma se secó y se reveló con una solución de ninhidrina al 0,3% en acetona y se cortó en trozos de 1 cm de largo que se colocaron en viales separados con 3 ml de líquido de centelleo y se midió la radioactividad posteriormente en un sistema de centelleo.

Tabla XII

Efecto del inhibidor de la síntesis proteica sobre la formación de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-fenilalanina

Exp.	Sistema	$[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-fenilalanina formados(pmoles)	% Inhibición
1.	Control	3,0	
	+ Inhibidor(5 μg)	2,2	25
	Control	2,0	
	+ Inhibidor(10 μg)	1,3	34
2.	Control	2,3	
	+ Inhibidor(5 μg)	1,8	25
	Control	3,6	
	+ Inhibidor(10 μg)	2,5	31

Se realizó una unión no enzimática de $[^{14}\text{C}]$ fenilalanil-tRNA a ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* incubando durante 15 minutos a 30° la reacción que se describe en Métodos en presencia de preparación parcialmente purificada del inhibidor de la síntesis proteica. Finalizada la incubación se agregó un 10% (v/v) de una solución de NaOH 3 N y se continuó la incubación por 30 minutos más, para finalmente agregar un volumen igual de HCl 3 N con el fin de neutralizar la reacción. El análisis del di péptido sintetizado se realizó mediante una cromatografía descendente en papel Whatman N°3 usando como solvente una solución de n-butanol:ácido acético:agua en una relación de 3:1:1. Finalizada la cromatografía el cromatograma se secó, se cortó en trozos y se midió la radioactividad en un sistema de centelleo.

CAPITULO TERCERO

Posible rol fisiológico del inhibidor de la síntesis proteica.

Ausencia de actividad inhibitoria en fracciones sobrenadantes de hígado y músculo esquelético de X.laevis.

Con el fin de determinar si el inhibidor de la síntesis de polifenilalanina era específico para ovario, se preparó homogeneizados de hígado y músculo esquelético de X.laevis en las condiciones descritas para la preparación de sobrenadante de ovario.

En la Tabla XIII se observa la síntesis de polifenilalanina dirigida por Poli U en sistemas a los que se les ha agregado cantidades crecientes de extractos de hígado y músculo esquelético de X.laevis. Podemos observar que no existe inhibición de la síntesis proteica en extractos de estos tejidos, aunque la cantidad de proteínas agregada en cada caso supera en un gran exceso la cantidad necesaria para detectar el efecto inhibitorio con la preparación de ovario.

Síntesis proteica in vivo en oocitos de diferentes estados de desarrollo en ovarios de X.laevis.

Estudios previos de varios autores que indicaban que los niveles de síntesis proteica en los oocitos disminuyen a medida que progresa el proceso de oogénesis, nos llevaron a hacer un estudio de la síntesis proteica en oocitos de diferentes estados de desarrollo de la oogénesis en X.laevis.

En la Tabla XIV se observa la incorporación de fenilalanina en oocitos de X.laevis de diferentes estados de desarrollo. Se puede observar que la incorporación total se

Tabla XIII

Actividad inhibitoria de extractos de hígado y
músculo esquelético de X.laevis

Exp.	Proteínas agregadas (μg)	^{14}C polifenilalanina sintetizada (pmoles)
1.	Músculo 6	7,7
	Músculo 15	7,5
	Músculo 30	8,0
	Músculo 45	8,2
	Músculo 60	8,1
2.	Hígado 12,5	8,0
	Hígado 25	8,0
	Hígado 37,5	8,1
	Hígado 50	7,8

Tabla XIII.

Actividad inhibitoria de extractos de hígado y músculo esquelético de X.laevis.

La preparación de las fracciones sobrenadantes de hígado y músculo esquelético de X.laevis se realizó en la forma indicada en Métodos para la preparación de extracto de ovario. Estas fracciones dializadas contra una solución que contenía Tris-Ac 30 mM pH 7,2, KCl 50 mM y β -mercaptoetanol 2 mM, se agregaron a un sistema de síntesis de polifenilalanina que usaba 0,6 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de X.laevis y una fracción sobrenadante de germen de trigo como se indica en Métodos. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo agregando 1,5 ml de una solución de TCA al 5% frío; se calentó durante 15 minutos a 90° y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que se contaron en un contador de centelleo.

Tabla XIV

Síntesis proteica in vivo en oocitos de diferentes estados de desarrollo

Estado	$[^{14}\text{C}]$ fenilalanina incorporada pmol/oocito	pmol/nl vol. celular
1	0,059	0,009
2	0,228	0,006
3	0,410	0,005
4	0,899	0,003
5	1,41	0,003
6	1,60	0,002

La síntesis de proteínas in vivo en oocitos de diferentes estados de la oogénesis, se realizó incubando durante 4 horas a 22° grupos de 5 oocitos en triplicado en una solución de Barth que contenía $[^{14}\text{C}]$ fenilalanina 2×10^{-5} M (actividad específica 522 mCi/mmol). Finalizada la incubación la reacción se detuvo agregando un exceso de fenilalanina no radioactiva y TC\ al 5% frío. Los oocitos se homogenizaron y el homogeneizado se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo.

incrementa con el tamaño del oocito: sin embargo, al expresar esta incorporación en función del volumen de la célula se observa que la actividad es mayor en oocitos de estados iniciales de la oogénesis y disminuye aproximadamente 4,5 veces al llegar al estado final de la oogénesis. Se expresó el valor de síntesis proteica en función del volumen celular, ya que al hacerlo en función de la cantidad de proteínas totales se podía introducir un gran error pues al finalizar el estado de desarrollo 2 de la oogénesis, ocurre el proceso denominado vitelogenénesis en que el contenido de proteínas del oocito aumenta en gran proporción debido a la incorporación a este último de una proteína denominada vitelogenina que es sintetizada en el hígado, por lo que las proteínas totales no representan proteínas sintetizadas por el oocito.

Para tener una mejor medida de la síntesis proteica en la oogénesis, se hizo un estudio en los estados iniciales y finales (1 y 6) y se determinó el contenido de ribosomas en cada estado. Al expresar los resultados de incorporación de fenilalanina en función del contenido de ribosomas se obtienen los resultados que aparecen en la Tabla XV. Podemos observar que este valor es aproximadamente 4 veces mayor en los oocitos provenientes del estado 1 que en los oocitos del estado 6 de la oogénesis. Este valor concuerda con el obtenido al expresar la incorporación de fenilalanina en función del volumen celular.

Si hacemos la suposición de que el 100% de los ribosomas presentes en el oocito de estado 1 son activos, al estar activos todos los ribosomas del oocito de estado 6 la incorporación total de fenilalanina en 4 horas debería ser de 6,4 pmoles/oocito; en cambio se observa una incorporación de sólo 1,6 pmoles de fenilalanina /oocito lo que corresponde a un 25% del valor esperado en las condiciones mencionadas anteriormente. Podríamos pensar entonces que

Tabla XV

Síntesis proteica in vivo y contenido de ribosomas en oocitos de estados de desarrollo 1 y 6

Estado	Proteína sintetizada pmoles/oocito	Ribosomas U A ₂₆₀ /oocito	Proteína sintetizada U A ₂₆₀ de ribosomas
1	0,055	0,0021	25,7
	0,064	0,0026	24,5
6	1,60	0,26	6,15
	1,21	0,22	5,5

La síntesis proteica medida por la incorporación de [¹⁴C] fenilalanina a proteínas se realizó en la forma que se indica en la Tabla XIV. La reacción se incubó durante 4 horas a 22°, se detuvo con TCA al 5% frío, los oocitos se homogenizaron con una varilla de vidrio y el homogeneizado se filtró a través de filtros de fibra de vidrio que posteriormente se contaron en un sistema de centelleo. Para la determinación del contenido de ribosomas en cada estado se siguió el procedimiento indicado en Métodos.

hay un alto porcentaje de ribosomas inactivos en el oocito que ha completado el proceso de la oogénesis.

Estudios de síntesis proteica en función del pH en un homogeneizado proveniente de ovario de Xenopus laevis.

El drástico efecto de pH ligeramente alcalinos sobre la actividad inhibitoria de EI que habíamos observado anteriormente (fig 8) hizo pertinente determinar el nivel de síntesis de proteínas en un sistema homólogo de ovario de X.laevis, en el cual tenemos presente fracción sobrenadante y ribosomas lavados de la misma procedencia en ausencia de la fracción soluble de germen de trigo. Al realizar un experimento en estas condiciones, se obtiene los resultados que aparecen en la figura 18. Podemos observar que a valores de pH entre 6,0 y 7,0 la síntesis proteica es muy baja, pero este valor aumenta en forma abrupta a pH sobre 7,0 para llegar a su nivel máximo a pH entre 8,0 y 8,3. Si representamos la actividad del inhibidor en la misma figura, se observa al igual que en la figura 8 que la actividad del inhibidor es máxima entre pH 6,0 y 7,0 disminuyendo totalmente para desaparecer a pH sobre 8,0.

Al realizar un experimento similar pero usando ribosomas lavados de ovario de X.laevis y fracción sobrenadante de germen de trigo, en presencia y ausencia del inhibidor parcialmente purificado, se observan los resultados que aparecen en la Figura 19. Podemos concluir que la presencia del inhibidor desplazaría la curva de pH hacia la zona alcalina con respecto a la curva obtenida en experimentos controles.

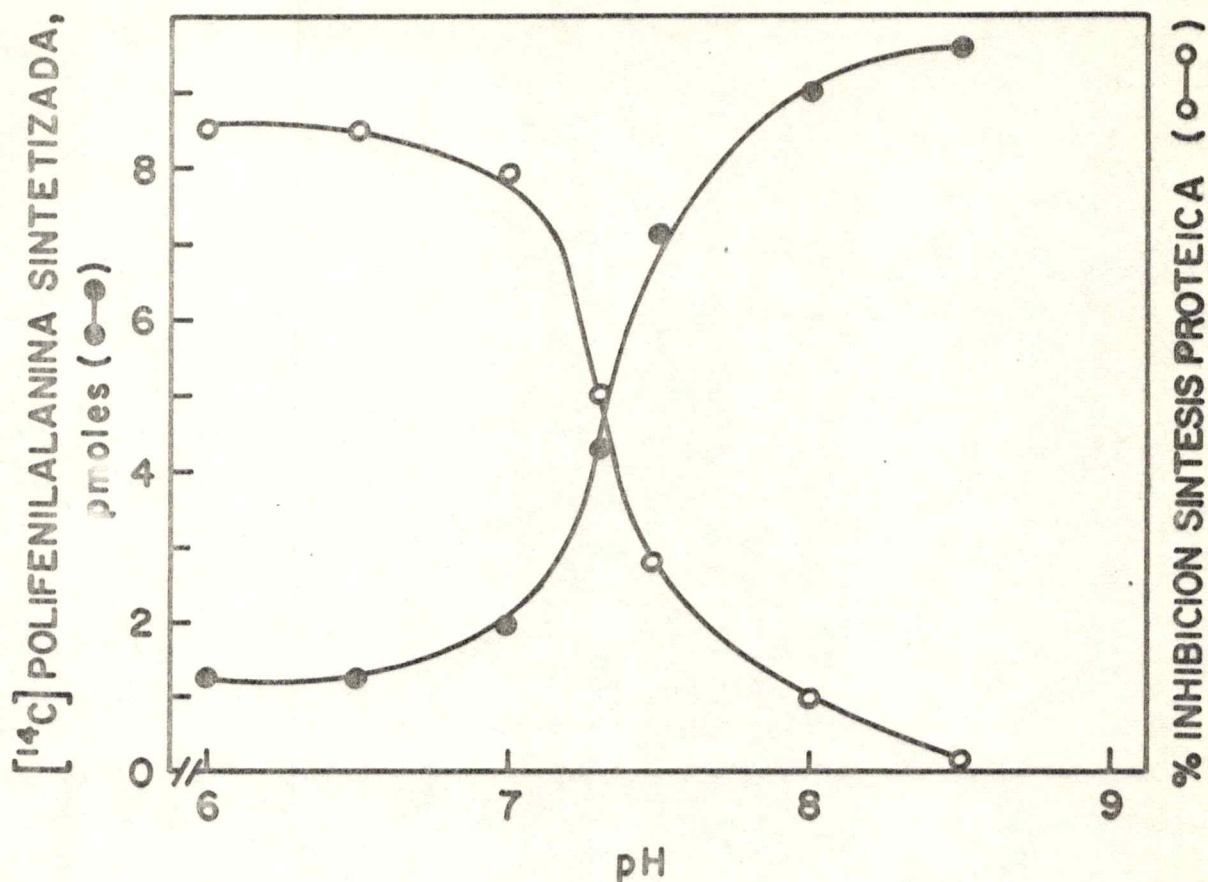


Figura 18. Síntesis proteica en un homogeneizado de ovario de X.laevis, en función del pH.

La reacción de síntesis de polifenilalanina se realizó en la forma que se detalla en Métodos, usando como fuente de enzimas una fracción sobrenadante de 150.000 x g de ovario de X.laevis preparada en la forma detallada en Métodos y 0,7 unidades A_{260} /ensayo de ribosomas lavados de ovario de X.laevis. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37° y se detuvo agregando 1,5 ml de una solución de TCA al 5% frfo. Los tubos se calentaron durante 15 minutos a 90° y posteriormente se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio que se contaron en un sistema de centelleo.

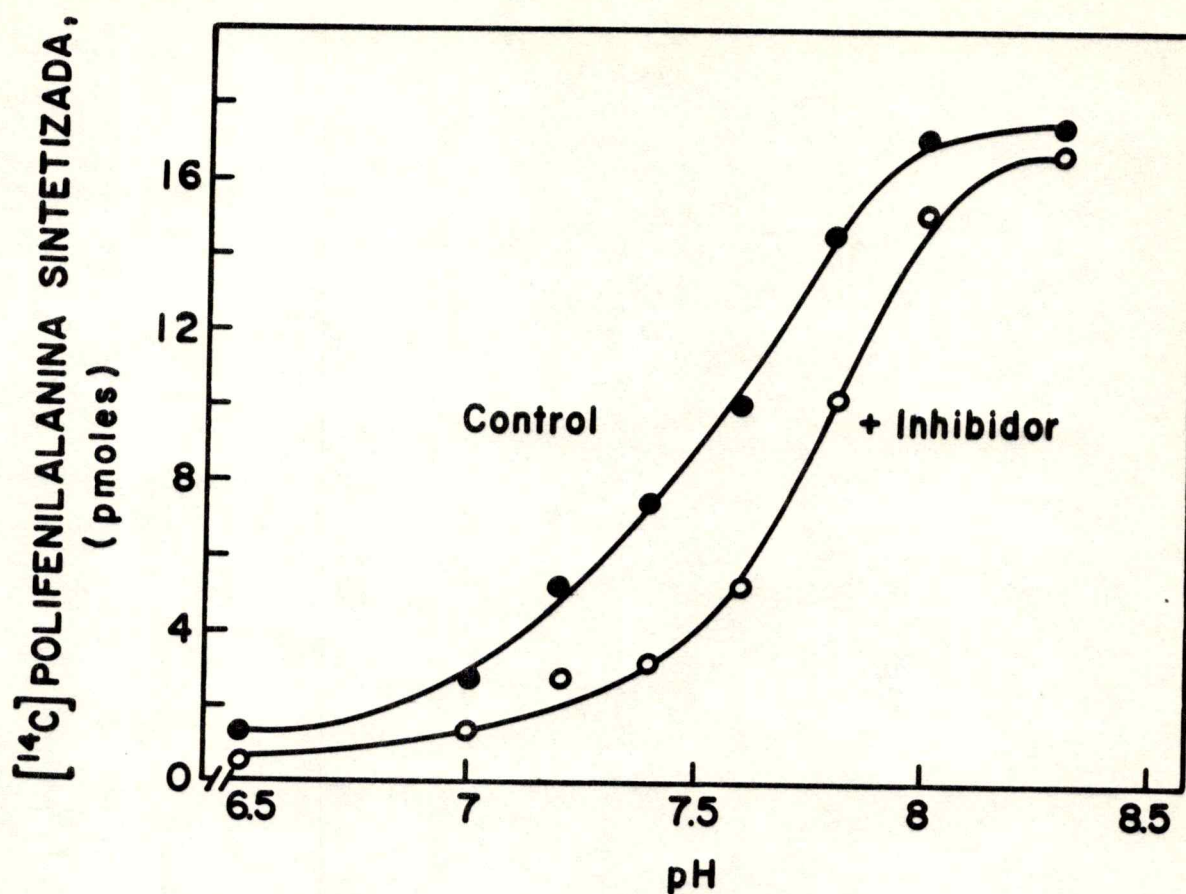


Figura 19. Efecto del pH sobre la síntesis de [¹⁴C] polifenilalanina. La síntesis de [¹⁴C] polifenilalanina se realizó en la forma que se indica en Métodos. Se usó 0,8 unidades A₂₆₀/ensayo de ribosomas lavados de ovario de *X.laevis* y 5 µg de una preparación de inhibidor parcialmente purificada. Las soluciones tampones usadas fueron Hepes entre pH 6,5 y 7,5 y Tris-Ac entre 7,5 y 8,5, ambos a una concentración final de 30 mM. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°, se detuvo agregando 1,5 ml de una solución de TCA al 5% fría, se filtró a través de filtros de fibra de vidrio y los filtros se contaron posteriormente en un contador de centelleo.

DISCUSIÓN

Los estudios presentados en esta tesis se refieren al problema del mecanismo post-transcripcional que regularía la síntesis de proteínas en los oocitos de anfibio que han alcanzado las últimas etapas de la ovogénesis.

Con los resultados detallados en el capítulo anterior se ha logrado establecer la existencia en estas células de un potente inhibidor de la síntesis proteica que podría explicar la reducida actividad de los ribosomas de los oocitos.

Este inhibidor de la síntesis proteica ha sido estudiado en relación a algunas de sus principales características como son su sitio de acción en el proceso de síntesis proteica, su naturaleza, peso molecular y otros.

Se ha realizado una purificación parcial del inhibidor mediante cromatografía en columnas de DEAE-celulosa y posterior filtración por Sephadex G-200 en donde el inhibidor eluye en el volumen vacío de la columna. Una purificación mayor de este factor inhibidor se ha alcanzado al utilizar una filtración en una columna de Sepharosa 6 B en vez de filtración por Sephadex G-200. En estas condiciones la pureza del inhibidor es mayor, pero su estabilidad es mínima (2 días a 4°C); por esta razón hemos usado, para la mayor parte de los estudios de esta tesis, una preparación del inhibidor parcialmente purificada por DEAE-celulosa y Sephadex G-200 que tiene la ventaja de estar libre de actividades de los factores de elongación que intervienen en el proceso de biosíntesis de proteínas.

Con la preparación parcialmente purificada se ha determinado que este inhibidor es de naturaleza proteica, ya que es termolábil, es destruido por tripsina, no es

afectado por preincubación con RNasa y es inhibido por reactivos que atacan grupos SH. El peso molecular del inhibidor fue determinado por filtración en columnas de Sepharosa 6 B y su valor aproximado es de 380.000 daltones.

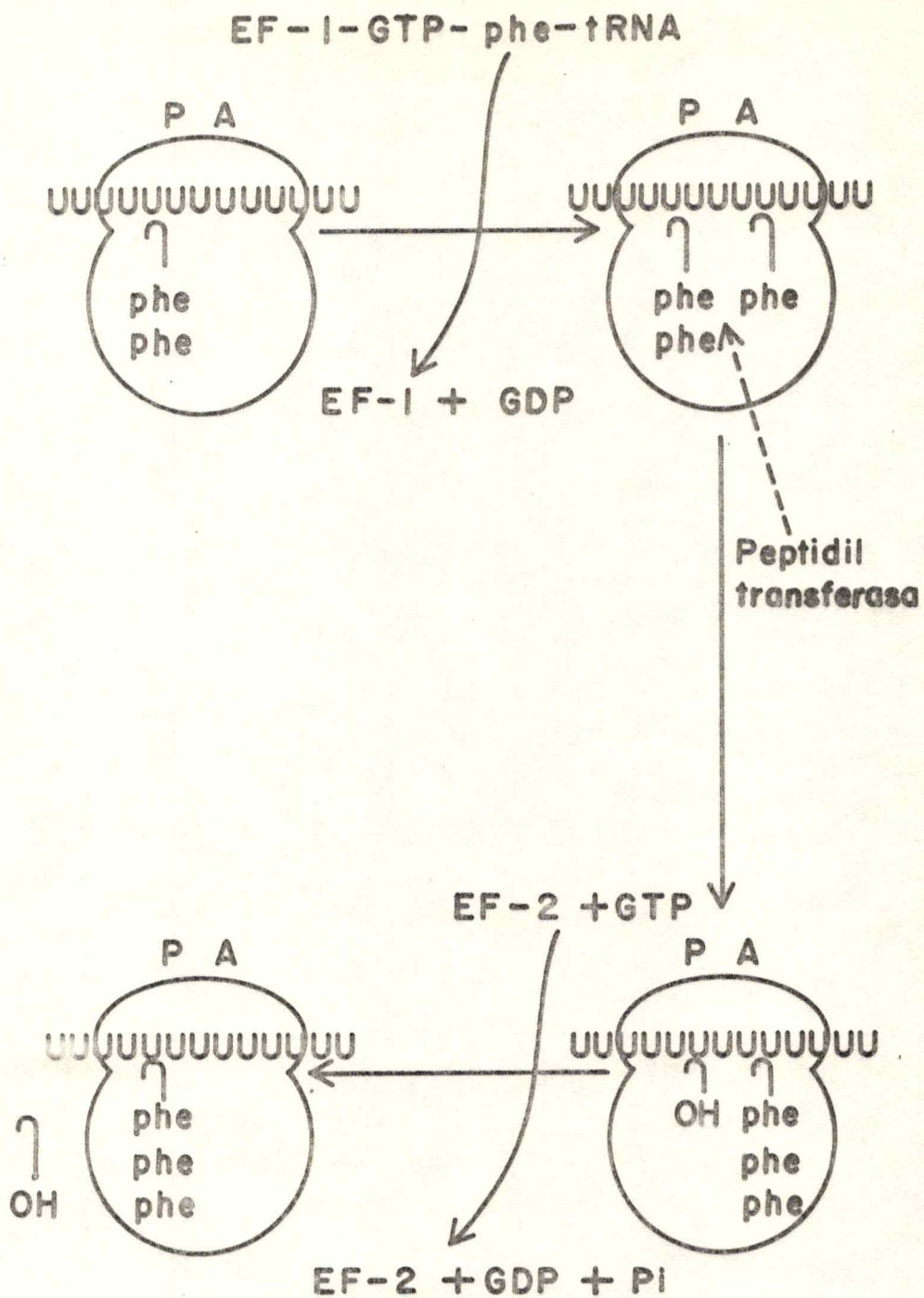
La actividad del inhibidor se ha evidenciado usando un sistema que sintetiza polifenilalanina dirigido por poli U lo que demuestra que este factor actuaría sobre la etapa de elongación de la síntesis proteica ya que este sistema no involucra ni la iniciación ni la terminación de los polipéptidos.

Con el fin de determinar en forma precisa en qué etapa del proceso de elongación actúa este factor, se realizó un ensayo de la actividad del inhibidor en cada una de las reacciones que intervienen en el proceso de elongación de la síntesis proteica que aparece en el esquema 1.

Utilizando preparaciones parcialmente purificadas de los factores EF-1 y EF-2 de germen de trigo se determinó que el inhibidor no tenía efecto sobre las reacciones catalizadas por el factor de elongación EF-1 como son la formación del complejo binario con GTP y la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma; y tampoco sobre una reacción catalizada por el factor de elongación EF-2 como es la hidrólisis de GTP dependiente de ribosomas.

Sin embargo, utilizando dos ensayos diferentes que miden la formación de difenilalanina o el análogo N-acetil-fenilalanil puromicina se pudo determinar que el inhibidor actúa bloqueando la reacción de síntesis del enlace peptídico que es catalizada por la peptidil transferasa presente en la subunidad ribosomal mayor.

La inhibición de estas reacciones es de sólo un 30%. Sin embargo la inhibición es altamente reproducible y depende de la cantidad del inhibidor agregado, desapareciendo cuando el inhibidor ha sido inactivado por calentamiento.



Esquema 1

Elongación de la cadena polipeptídica

Obviamente, que no se puede esperar que los niveles de inhibición de la síntesis de un dipéptido sean tan altos como los observados en la síntesis de polifenilalanina ya que en esta última, la reacción afectada es repetida secuencialmente varias veces lo que aumenta la inhibición en mayor grado. Se observó también que el efecto del inhibidor puede ser revertido al agregar una mayor cantidad de ribosomas al medio de reacción, lo que refuerza el hecho de que el blanco de acción del inhibidor estaría en el ribosoma.

Al ensayar el efecto del inhibidor frente a ribosomas de otras fuentes se encontró que era activo con ribosomas de varios eucariotes y también con partículas de procariotes. Un hecho de especial importancia es la inhibición de un sistema de síntesis de proteínas en polisomas de hígado de rata, ya que este hallazgo demuestra que el inhibidor también actúa sobre la traducción de mRNA naturales.

Varios de los experimentos realizados en la tesis fueron diseñados para tratar de relacionar la existencia del inhibidor descrito anteriormente con la actividad in vivo de la síntesis proteica en oocitos.

Al determinar el contenido de ribosomas en oocitos de los estados inicial y final de la oogénesis (estados 1 y 6) y expresar la síntesis proteica de estas células in vivo en función de su contenido de ribosomas se encontró que los oocitos totalmente crecidos (estados 6 de la oogénesis) presentaban una síntesis proteica de sólo un 25% de la existente en el estado inicial de la oogénesis.

Estos resultados nos dirían que sólo un 25% de los ribosomas presentes en el oocito totalmente crecido estarían activos en el proceso de síntesis proteica. Este valor concuerda con el hecho de que al estudiar la síntesis proteica in vitro usando ribosomas de ovario de X.laevis que no han sido lavados con alta concentración de sal, se encuentra

que la síntesis de polifenilalanina es un 25% de la existente en un sistema similar que usa igual cantidad de ribosomas de la misma procedencia pero que han sido lavados para eliminar al inhibidor. Como dijimos anteriormente, este porcentaje de ribosomas activos en el oocito totalmente crecido está condicionado a la existencia de un 100% de ribosomas activos en los oocitos de estado 1 de la oogénesis. Los resultados obtenidos por medición directa de la población de ribosomas activos en el oocito completamente crecido han demostrado que aproximadamente un 85 a 90% de estos ribosomas estarían inactivos ya que no estarían formando polisomas en la célula (159).

Al estudiar la presencia de este inhibidor en homogeneizados de otros tejidos de X.laevis como hígado, corazón y músculo esquelético, no se detectó actividad inhibitoria con características similares.

Sin embargo, el inhibidor que hemos encontrado en oocitos de X.laevis tiene características que lo diferencian de otro inhibidor que se ha descrito en huevos no fecundados de erizo de mar.

Este último inhibidor descrito por Metafora y col.(134) también afecta la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U y estaría unido a los ribosomas de estas células. Sin embargo, difiere de El de X.laevis en que actuaría inhibiendo la unión del mRNA (Poli U) y de aminoacil-tRNA a los ribosomas mientras que el factor descrito en esta tesis actúa a nivel de la peptidil transferasa.

Recientemente se ha descrito en linfocitos humanos no diferenciados un inhibidor del proceso de elongación de la síntesis proteica (183). Este inhibidor se asemeja al El de X.laevis en que está presente en el lavado ribosomal y que su inhibición puede ser revertida por adición de exceso de ribosomas. Sin embargo este inhibidor presenta notorias

diferencias con el EI de X.laevis como son su bajo peso molecular y el requerimiento absoluto de la presencia de ATP para su actividad inhibitoria.

Según se presenta en el capítulo introductorio, en años recientes se ha encontrado que varios sistemas de regulación post-transcripcional funcionan a través de la fosforilación enzimática de factores de iniciación de la síntesis proteica (74, 75). Hay varias evidencias que sugieren que el mecanismo de acción de EI no sería a través de una fosforilación.

Al estudiar la síntesis proteica in vivo e in vitro en oocitos de X.laevis, se ha demostrado que este proceso presenta una actividad mínima a pH bajo 7,0 y que aumenta para llegar a su máximo a pH 8,0. La actividad del inhibidor descrito en esta tesis, medida en función del pH, presenta un comportamiento inverso, ya que a valores de pH bajo 7,0 su actividad es máxima y cae bruscamente sobre este valor para desaparecer totalmente a pH 8,0. Estos resultados sugerirían que la inhibición de la síntesis proteica observada a pHs acídicos o neutros se debería, al menos parcialmente, a la acción de este inhibidor.

El hecho de que la actividad del inhibidor disminuye drásticamente con el aumento del pH por sobre la neutralidad es de sumo interés fisiológico ya que aparentemente el gattillamiento de la síntesis proteica en el proceso de fertilización está dado en parte por el aumento del pH interno de algunos oocitos y huevos. A este respecto Johnson y col. (184) demostraron que la fertilización produce un aumento muy rápido del pH interno en el huevo de erizo de mar. Este aumento era de 0,3 unidades de pH y se producía entre 1 y 4 minutos después de la fertilización. Conclusiones similares fueron obtenidas Winkler y Grainger (185) encontrando que después de la adición de espermios al medio en que están los

huevos no fertilizados de erizo de mar, se produce un gran aumento del pH interno de 6,8 a 7,4 durante los 10 primeros minutos después del proceso de fertilización. En este mismo intervalo de tiempo la síntesis proteica medida por la incorporación de aminoácidos a proteínas ha tenido un aumento de aproximadamente 10 veces sobre el valor existente antes de la fertilización (186).

Efectos similares han sido observados al incubar oocitos aislados en soluciones que tienen pH alcalino. En nuestro laboratorio Kofoid y col. (187) han demostrado que al incubar oocitos de X.laevis en solución de Barth a pH 8,0 se produce la maduración espontánea del oocito; a este respecto debemos decir que el proceso de maduración va acompañado de un estímulo en la síntesis de proteínas.

El aumento en los niveles de síntesis proteica ha sido también observado al incubar huevos no fertilizados de erizo de mar en soluciones de pH alcalino. Los resultados de Baron y col. (188), Winkler y Grainger (185) y Graiger y col.(186) han demostrado que al incubar huevos de erizo de mar no fertilizados en soluciones de NH_4Cl diluido a pH 8,0 se produce un cambio drástico del pH interno del huevo que va desde 6,8 a 7,5. Este aumento del pH interno, causa el ya mencionado aumento en la síntesis de proteínas y también produce la estimulación de la síntesis de DNA (Humphreys (128)).

Los estudios recientes de Steinhardt y Winkler(189) han demostrado que el aumento en la síntesis proteica que se produce después de la fertilización de huevos de erizo de mar, se debe en parte al aumento en el pH interno que se produce en el huevo después de la fertilización.

Todas estas evidencias nos llevan a postular que la actividad del inhibidor in vivo estaría en parte modulada por el pH interno del oocito, al igual que la síntesis

proteica. Al ocurrir el proceso de fertilización, por ejemplo, se produciría un aumento en el pH interno del oocito, que causaría la inactivación del inhibidor y la estimulación de la síntesis proteica. Sin embargo, para la desaparición total de la actividad del inhibidor ocurrirían concomitantemente otros procesos como, tal vez, la regulación de su síntesis.

El trabajo a futuro sobre este inhibidor tratará de confirmar, por otros mecanismos su rol en el proceso de regulación de la síntesis proteica, para lo cual convendría hacer un estudio de este factor en estados posteriores al proceso de fertilización, así como también microinyectando el inhibidor purificado en oocitos de X.laevis para determinar que in vivo tiene la misma actividad que la descrita in vitro.

1. Kwan, S., Wood, T.G. y Lingrel, J.B. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 143
2. Weber, J., Gelineck, W. y Darnell, J.E. (1977)
Cell 10, 611
3. Goldemberg, S., Weber, J. y Darnell, J.E. (1977)
Cell 10, 617
4. Berget, S.M., Moore, C. y Sharp, P.A. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3171
5. Ohtsuki, K., Groner, Y. y Hurwitz, J. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 483
6. Robertson, H.D., Webster, R.E. y Zinder, N.D. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 418
7. Robertson, H.D. y Hunter, T. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 418
8. Nikolaev, L., Silengo, L. y Schlessinger, D. (1973)
J. Mol. Biol. 248, 7967
9. Hercules, K., Schweigwr, M. y Sauerbrier, W. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 840
10. Ross, J. (1976)
J. Mol. Biol. 106, 403
11. Strain, R.K., Skoultchi, A. y Shafritz, D.A. (1977)
Cell 11, 641
12. Dugaiczky, A., Woo, S., Lai, E., Myles, M., McReynolds, M. y O'Malley, B.W. (1978)
Nature 274, 328
13. Braverman, G. (1974)
Ann. Rev. Biochem. 43, 621
14. Derman, E. y Darnell, J.E. (1974)
Cell 3, 255
15. Slater, I., Gillespie, D. y Slater, D.W. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 406
16. Diez, J. y Braverman, G. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4091
17. Adesnik, M. y Darnell, J.E. (1972)
J. Mol. Biol. 67, 397
18. Greenberg, J.R. y Perry, R.P. (1972)
J. Mol. Biol. 72, 91

19. Stolfus, C.M., Shatkin, A. y Banerjee, A.K. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 7993
20. Semancik, J.S. (1974)
Virology 62, 288
21. Jacobs-Lorena, M., Baglioni, C. y Borun, T.W. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2095
22. Sorecq, H., Nudel, U., Salomon, R., Revel, M. y
Littauer, U.Z. (1974)
J. Mol. Biol. 88, 233
23. Freienstein, C. y Blobel, G. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3435
24. Williamson, R., Crossley, J. y Humphries, S. (1974)
Biochemistry 13, 703
25. Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Leclercq, M., Nudel,
U., Sorecq, H., Lebleu, B., Revel, M. y Littauer, U.
(1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3143
26. Marbaix, G., Huez, G., Burny, A., Cleuter, Y., Hubert,
E., Leclercq, M., Chantrenne, H., Sorecq, H y Nudel, U.
(1975)
Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A. 72, 3065
27. Nudel, U., Sorecq, H., Littauer, U., Marbaix, G., Huez,
G., Leclercq, M., Hubert, E. y Chantrenne, H. (1976)
Eur. J. Biochem. 64, 115
28. Huez, G., Marbaix, G., Burny, A., Hubert, E., Leclercq,
M., Cleuter, Y., Chantrenne, H., Sorecq, H. y Littauer,
U. (1977)
Nature 266, 473
29. Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Cleuter, Y., Chan-
trenne, H., Sorecq, H., Nudel, U. y Littauer, U. (1975)
Eur. J. Biochem. 59, 589
30. Huez, G., Marbaix, G., Weinberg, E., Gallwitz, D.,
Hubert, E. y Cleuter, Y. (1977)
Biochem. Soc. Trans. 5, 936
31. Chantrenne, H. (1977)
Nature 269, 202
32. Doel, M.T. y Carey, M.H. (1976)
Cell 8, 51
33. Kwan, S.W. y Braverman, G. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3247
34. Both, G.W., Banerjee, A.K. y Shatkin, A. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1189

35. Rose, J.K. y Lodish, H.F. (1976)
Nature 262, 32
36. Lodish, H.F. y Rose, J.K. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 1181
37. Shih, D.S., Dasgupta, R. y Kaesberg, P. (1976)
J. Virol. 19, 637
38. Lee, Y.F., Nomoto, A., Detjen, E.M. y Winmer, E. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 375
39. Frisby, D., Eaton, D. y Fellner, P. (1976)
Nucleic Acids Res. 3, 2771
40. Horst, J., Fraenkel-Conrat, H. y Mandeles, S. (1971)
Biochemistry 10, 4748
41. Lodish, H.F. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 39
42. Kemper, B. (1976)
Nature 262, 321
43. Wei, C.M. y Moss, B. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3758
44. Silber, R., Malathi, U.G. y Hurwitz, J. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 483
45. Roman, R., Brooker, J.D., Seal, S. y Marcus, A. (1976)
Nature 260, 359
46. Hickey, E.D., Weber, L.A. y Baglioni, C. (1976)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 19
47. Webey, L.A., Ferman, E.R., Hickey, E., Williams, M.C.
y Baglioni, C. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 5657
48. Shafritz, D.A., Weinstein, J.A., Safer, B., Merick,
W.C., Weber, L.A., Hickey, E.D. y Baglioni, C. (1976)
Nature 261, 291
49. Patterson, B. y Rosemberg, M. (1979)
Nature 279, 692
50. Rosemberg, M. y Patterson, B. (1979)
Nature 279, 696
51. Held, W.A., West, K. y Gallagher, T. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 8489
52. Weber, L.A., Hickey, E.D., Nuas, D.L. y Baglioni, C.
(1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3254
53. Weber, L.A., Hickey, E.D. y Baglioni, C. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 178

54. Salditt-Georgieff, M., Jelineck, W., Darnell, J.E., Furuichi, Y., Morgan, M. y Shatki, A. (1976)
Cell 7, 227
55. Desrosiers, R.C., Friderici, K.H. y Rottman, F.M. (1975)
Biochemistry 14, 4367
56. Moss, B. y Koczot, F. (1976)
J. Virol. 17, 385
57. Perry, R.P., Kelley, D.E., Friderici, K. y Rottman, F. (1975)
Cell 4, 387
58. Schibler, U., Kelley, D.E. y Perry, R.P. (1978)
J. Mol. Biol.
59. Dimock, K. y Stoltzfus, C.M. (1977)
Biochemistry 16, 491
60. Canaani, D. y Groner, Y. (1976)
Cell 9, 117
61. Moyer, S.A., Abraham, G., Adler, R. y Banerjee, A.K. (1975)
Cell 5, 59
62. Surrey, S. y Nemer, M. (1976)
Cell 9, 589
63. London, I.M., Clemens, M.J., Ranu, R.S., Levin, D.H., Cherbas, L.F. y Ernst, V. (1976)
Fed. Proc. 35, 2218
64. Hunt, T., Vanderhoff, G. y London, I.M. (1972)
J. Mol. Biol. 66, 471
65. Weissbach, H. y Ochoa, S. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 191
66. Gross, M. y Rabinovitz, M. (1972)
Biochem. Biophys. Acta 287, 340
67. Legon, S., Jackson, R. y Hunt, T. (1973)
Nature New Biology 241, 150
68. Balkow, K., Mizuno, S., Fisher, J.M. y Rabinovitz, M. (1972)
Biochem. Biophys. Acta 324, 397
69. Kaempfer, R. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 541
70. Clemens, M.J. (1976)
Eur. J. Biochem. 66, 413
71. Mizuno, S., Fisher, J.M. y Rabinovitz, M. (1972)
Biochem. Biophys. Acta 272, 638
72. Lenz, J.R. y Baglioni, C. (1977)
Nature 266, 191

73. Balkow, K., Hunt, T. y Jackson, R.J. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 366
74. Gross, M. y Mendelewsky, J. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 559
75. Merrick, W.C., Patterson, D., Safer, B. y Lloyd, M.
(1978)
Fed. Proc. 37, 1659
76. de Haro, C., Datta, A. y Ochoa, S. (1978)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 243
77. de Haro, C. y Ochoa, S. (1979)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1741
78. Kaempfer, W. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 396
79. Clemens, M.J. (1978)
Eur. J. Biochem. 86, 954
80. Friedmann, R.M. (1977)
Bacteriological Review 41, 543
81. Sen, G.C., Taira, H. y Lengyel, P. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 5015
82. Lewis, J., Falcoff, E. y Falcoff, R. (1978)
Eur. J. Biochem. 86, 497
83. Brown, G.E., Lebleu, B., Kawakita, M., Shaila, S., Sen,
G. y Lengyel, P. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 114
84. Ratner, L., Wiegand, L.C., Farrell, P., Sen, G., Cabrer
B. y Lengyel, P. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 427
85. Sen, G., Lebleu, B., Brown, G., Rebello, M.A., Furuichi,
Y., Morgan, M., Shatkin, A. y Lengyel, P. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 427
86. Content, J., Lebleu, B., Zilberstein, H., Berissi, A. y
Revel, M. (1974)
FEBS Letters 41, 125
87. Sen, G., Shaila, S., Lebleu, B., Brown, G.E., Desrosiers,
R.C. y Lengyel, P. (1977)
J. Virol. 21, 69
88. Samuel, C.E. (1979)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 600
89. Wiegand, L.C., Farrell, P.M., Sen, G.C. y Cabrer, B. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 94
90. Baglioni, C., Minks, M.A. y Mahoney, O.A. (1978)
Nature 273, 684

91. Kerr, I.M., Brown, R.E. (1978)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 256
92. Epstein, D.A. y Samuel, D.E. (1978)
Virology 89, 240
93. Traugh, J.A., Mumby, M. y Traut, R.R. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 373
94. Kudlicki, W., Grankowsky, N. y Gasior, E. (1978)
Eur. J. Biochem. 84, 493
95. Gressner, A.M. y Wool, I.G. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 6917
96. Leader, D.P. y Coia, A.A. (1978)
FEBS Letters 90, 270
97. Schubert, U.K., Shapiro, S., Fleishner, N. y Rosen, O.
(1977)
J. Biol. Chem. 251, 1500
98. Wool, I.G. y Gressner, A.M. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 1500
99. Traugh, J.A. y Porter, G.G. (1976)
Biochemistry 15, 610
100. Du Vernay, D.H. y Traugh, J.A. (1978)
Biochemistry 17, 2045
101. Eil, C. y Wool, I.G. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 5130
102. Kramer, G., Henderson, A.B., Pinphanichakorn, P.,
Wallis, M.H. y Hardesty, B. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1445
103. Lee-Huang, S., Sierra, J.M., Naranjo, R., Filipowicz, W. y
Ochoa, S. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 180, 276
104. Huang, F.L. y Warner, A.H. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 163, 716
105. Chen, G. y Siddiqui, M.A.Q. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 161, 109
106. Inmers, J. (1959)
Exp. Cell Res. 18, 585
107. Monroy, A. y Maggio, R. (1963)
Advan. Morphog. 3, 95
108. Ficq, A. (1974)
Exp. Cell Res. 34, 581
109. Hultin, T. y Bergstrand, A. (1960)
Dev. Biol. 2, 61
110. Nemer, M. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 511

111. Wilt, F.H. y Hultin, T. 1962
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 313
112. Neifakh, A.A. y Donstova, G.M. 1962
Biokhimiya 27, 330
113. Bamberger, J.W., Martin, W.E., Stearns, L.W. y
Jolley, W.B. 1963
Exp. Cell. Res. 31, 266
114. Crkvenjakov, R., Bajkovic, N. y Glisin, V. 1970
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 655
115. Gross, P.R. y Cousineau, G.H. 1963
Biochem. Biophys. Res. Commun. 10, 321
116. Slater, D.W. y Spiegelman, S. 1966
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 56, 164
117. Stavy, L. y Gross, P.R. 1969
Biochem. Biophys. Acta 180, 203
118. Spirin, A.S. y Nemer, M. 1965
Science 150, 214
119. Spirin, A.S. 1966
Curr. Top. Develop. Biol. 1, 2
120. Infante, A. y Nemer, M. 1968
J. Mol. Biol. 32, 543
121. Nano, Y. y Hiroshi, N. 1966
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 210
122. Jenkins, M.A., Kaemeyer, J.F., Young, E.M. y Raff,
R. A. 1978
Dev. Biol. 63, 279
123. Slater, I., Gillespie, D. y Slater, W. 1973
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 406
124. Operandra, K.S., Lawrence, L. y Borek, E.B. 1971
Biochem. Biophys. Acta 240, 558
125. Ceccarini, C., Maggio, R. y Barbatta, G. 1967
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 2235
126. Glisin, V. y Glisin, M. 1964
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52, 1548
127. Monroy, A. y Tyler, A. 1963
Arch. Biochem. Biophys. 103, 431
128. Hunphreys, T. 1971
Dev. Biol. 26, 201
129. Maggio, R., Vitorelli, M.L., Rinaldi, A.M. y Monroy,
A. 1964
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 436

130. Brachet, J., Decroly, M., Ficq, A. y Quertier, J. 1963
Biochem. Biophys. Acta 72, 660
131. Nemer, M. 1962
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 511
132. Monroy, A., Maggio, R. y Rinaldi, A.M. 1965
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54, 107
133. Maggio, R., Vitorelli, M.L., Caffarelli-Mormino, L. y
Monroy, A. 1968
J. Mol. Biol. 31, 321
134. Metafora, S., Felicetti, I. y Gambino, R. 1971
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 600
135. Gambino, R., Metafora, S., Felicetti, L. y Raisman,
J. 1973
Biochem. Biophys. Acta 312, 377
136. Hille, B.M. 1974
Nature 249, 556
137. Shih, R.J., O'Connor, M.C., Keem, S. y Smith, D. 1978
Dev. Biol. 66, 172
138. Brachet, J. y Malpoix, P. 1971
Advan. Morphog. 9, 267
139. Monroy, A. 1965
Chemistry and Physiology of Fertilization. New York
140. Nieuwkoop, P.D. y Faber, J. 1967
Normal Table of Xenopus laevis. North-Holland Publi-
shing Company, Amsterdam
141. Ecker, R.E. y Smith, D. 1968
Dev. Biol. 18, 232
142. Cox, R.A., Ford, P.J. y Pratt, H. 1970
Biochemie 119, 6
143. Brown, D.B. y Gurdon, G.B. 1966
J. Mol. Biol. 19, 339
144. Brown, D.B. y Littna, E.J.
J. Mol. Biol. 8, 669
145. Crippa, M., Davidson, E.H. y Mirsky, A.E. 1967
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 884
146. Raff, R.A., Colot, H.V., Selvig, S.E. y Gross, P.R.
1972
Nature 235, 211
147. Robash, M. y Ford, P.J. 1974
J. Mol. Biol. 85, 87
148. Felicetti, L., Pierandrei, P., Moreth, S., Campioni,
N. y Urbani, C. 1975
Cell Differentiation 4, 339

149. Cabada, M.O., Darnbrough, C., Ford, P. y Turner, C. 1977
Dev. Biol. 57, 427
150. Darnbrough, C. y Ford, P.J. 1976
Dev. Biol. 50, 285
151. Moar, V.A., Gurdon, J.B., Lane, C.D. y Marbaix, G.J. 1971
J. mol. Biol. 61, 73
152. Laskey, R.A., Gurdon, J.B. y Crawford, L.W. 1972
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3665
153. Berns, J.M., Kraaikamp, M., Bloemendaal, H. y Lane, C. D. 1972
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1006
154. Previnkumar, B., Sorecq, H. y Tamm, I. 1978
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5030
155. Lane, C.D., Marbaix, G.J. y Gurdon, J.B. 1971
J. Mol. Biol. 61, 73
156. Marbaix, G.J. y Gurdon, J.B. 1972
Biochem. Biophys. Acta 81, 96
157. Ford, P.J. 1966
Biochem. J. 101, 369
158. Cox, R.A., Ford, P.J. y Pratt, H. 1970
Biochem. J. 119, 161
159. Pratt, H. y Cox, R.A. 1971
Biochem. J. 124, 897
160. Moar, V.A., Gurdon, J.B. y Lane, C.D. 1971
J. Mol. Biol. 61, 93
161. Lingrel, J.B. y Woodland, D. 1974
Eur. J. Biochem. 47, 47
162. Denis, H., Mazabaud, A. y Wegnez, M. 1975
Eur. J. Biochem. 58, 43
163. Gatica, M. y Allende, J.E. 1977
Nature 256, 275
164. Woodland, H.R. 1974
Dev. Biol. 40, 90
165. Elsdale, T.R., Fishberg, M. y Smith, S. 1968
Exp. Cell Res. 14, 642
166. Bacharova, L. y De León, V. 1977
Dev. Biol. 58, 248
167. Burkholder, G.W., Comings, D.E. y Okada, T.A. 1971
Exp. Cell. Res. 69, 361

168. Todder, C., Gambino, R., Metafora, S. y Monroy, A. 1973
Exp. Cell Res. 78, 159
169. Steinert, G., Baltus, E., Hanocq-Quertier, J. y Brachet, J. 1974
Ultraestructure Res. 48, 188
170. Gurdon, J.B. 1976
J. Embryol. Exptl. Morphol. 36, 523
171. Collier, R.J. y Traugh, J.A. 1969
Cold Sprig Harbor Symposia on Quantitative Biology 34, 589
172. Blobel, G. y Potter, V.R. 1967
J. Mol. Biol. 28, 539
173. Ramsey, J.C. y Steele, W.J. 1979
Anal. Biochem. 92, 305
174. Rahaminoff, H.; Baksht, E., Lapidot, Y. y De Groot, N
1972
FEBS Letters 22, 249
175. Haenni, A.L. y Chapeville, F. 1966
Biochem. Biophys. Acta 114, 135
176. Glenn, I.M. y Chappel, J.B. 1964
Biochem. J. 90, 147
177. Wolfrom, M.L., Patin, D.L. y Lederkremer, R. 1965
J. Chromatogr. 17, 488
178. Pestka, S. 1968
J. Biol. Chem. 243, 2910
179. Lowry, O., Rosenbrough, O., Farr, A. y Randall, N.
1951
J. Biol. Chem. 193, 265
180. Robinson, E.A. y Maxwell, E.S. 1972
J. Biol. Chem. 247, 7023
181. Nathans, D. 1964
Fed. Proc. 23, 984
182. Raeburn, S., Collins, J., Mo Moon, H. y Maxwell, E.S.
1971
J. Biol. Chem. 246, 1041
183. Burrone, O.R. y Algranati, I.D. 1979
FEBS Letters 102, 91
184. Johnson, J.D., Epel, D. y Miles, D. 1976
Nature 262, 661
185. Winkler, M.M. y Graiger, J.L. 1978
Nature 273, 536

186. Graiger, J.L., Winkler, M.M., Shen, S.S. y Steinhardt, R.A. 1979
Dev. Biol. 68, 396
187. Kofoid, E.C., Knauber, D.C. y Allende, J.E. 1979
Dev. Biol. 72, 374
188. Baron N.F., Ross, A. y De Weer, P. 1978
Nature 274, 190
189. Steinhardt, R.A. y Winkler, M.M. 1979
Fed. Proc. 38, 465