

— UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA —

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**CICLO RIBOSOMICO DE RETICULOCITOS DE CONEJO.
LA UTILIZACION DE LOS MONOMEROS LIBRES A
TRAVES DE SU DISOCIACION EN SUBUNIDADES
RIBOSOMICAS NATIVAS.**

DELIA A. SORGENTINI

.— 1974 —.

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas (Orientación biológica) ha sido realizado en el Sector Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, bajo la dirección del Dr. Gabriel Favelukes.

MI agradecimiento

al Dr. Gabriel Favelukes por haber posibilitado mi iniciación en la investigación científica, por su guía y dedicación en la dirección de este trabajo y por su inestimable ayuda en la redacción, discusión y corrección del mismo.

a mis compañeros del Sector Bioquímica y muy especialmente a C. Martons de Borrajo con quién he realizado los experimentos iniciales de este trabajo.

INDICE

página

Agradecimientos	III
Lista de Tablas	VIII
Lista de Figuras	X
Presentación	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	2
I.1 Iniciación de las cadenas peptídicas	4
I.1.1 Cadenas de iniciación. Especificación de la iniciación en el código genético	5
I.1.2 Metionina como iniciador universal	6
I.2 El proceso de la iniciación en procariotes.	7
I.2.1 Aminocil tRNA iniciador	7
I.2.2 Factores de iniciación	8
I.2.3 Reconocimiento de la señal de iniciación y función del factor IF ₃ .	9
I.2.4 El factor IF ₃ y los factores de interferencia.	12
I.2.5 Pasos en el proceso de iniciación.	13
I.2.5.1 Formación del complejo de iniciación 30S.	13
I.2.5.1.1 Unión de mRNA a 30S	14
I.2.5.1.2 Unión de aminocil tRNA iniciador.	14
I.2.5.2 Formación del complejo de iniciación 70S.	15
I.2.5.2.1 Unión de la subpartícula 50S. Liberación y reciclado de los factores.	15
I.2.5.2.2 Sitio de unión de fMet-tRNA al ribosoma.	16
I.3 La actividad disociante en procariotes.	17
I.4 El ciclo ribosómico en procariotes.	20
I.5 El proceso de la iniciación en eucariotes.	24
I.5.1 Aminocil tRNA iniciador.	24
I.5.2 Factores de iniciación	25
I.5.2.1 Obtención de los factores a partir de distintas fuentes, y propiedades de los mismos.	26
I.5.2.1.1 Extractos ribosómicos.	26
I.5.2.1.2 Sobrenadantes post-ribosómicos.	29
I.5.3 Pasos en el proceso de iniciación.	31
I.5.4 Sitio de unión del Met-tRNA _p al ribosoma.	37
I.6 La actividad disociante en eucariotes.	38

	página
I.7 Ciclo ribosómico en eucariotes.	40
I.8 Discriminación entre distintos mRNA.	44
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	49
M.1 Drogas.	50
M.2 Soluciones utilizadas.	50
M.3 Animales.	51
M.4 Tratamiento de los animales.	51
M.5 Obtención de reticulocitos.	51
M.6 Preparación de extractos acelulares (lisados).	52
M.6.1 Lisado 1:1	52
M.6.2 Lisado 1:1 en sales	52
M.6.3 Lisado 1:1 enriquecido an polisomas.	52
M.6.4 Lisado 1:4.	52
M.6.5 Lisado 1:2	53
M.7 Obtención de la fracción ribosómica total.	53
M.7.1 Ribosomas totales-1, RbT-1.	53
M.7.2. Ribosomas totales-2, RbT-2	53
M.8 Obtención de fracciones ribosómicas nativas purificadas.	53
M.9 Obtención de partículas ribosómicas nativas marcadas con ³² P.	54
M.10 Obtención de ribosomas agotados.	55
M.10.1 Ribosomas totales agotados, RbT-ag	55
M.10.2 Ribosomas 80S agotados, a partir de ribosomas tota- les. 80Sag-A.	55
M.10.3 Ribosomas 80S agotados, a partir de polisomas .80Sag-B	55
M.11 Obtención de ribosomas 80S de células incubadas con NaF. 80S-F.	55
M.12 Obtención de ribosomas 80S reasociados. 80S-R.	55
M.13 Preparación de la fracción enzimática SA40-70.	56
M.14 Preparación de tRNA de hígado de conejo.	56
M.15 Obtención de extractos ribosómicos. ER-1 y ER-5.	57
M.15.1 Extracto ribosómico dializado. ER-d.	57
M.15.2 Extracto ribosómico desalado en Sephadex G25. ER-G25	58
M.15.3 Relación extracto ribosómico a ribosomas (ER:Rb).	58
M.16 Incubación de células enteras.	58
M.17 Sistema acelular con lisado no fraccionado.	58
M.18 Sistema acelular con polisomas y sobrenadante.	59

	página
M.19 Sistema acelular con componentes solubles definidos.	59
M.20 Incubaciones con agregado de hemina.	60
M.21 Determinación de la concentración de las fracciones ribosómicas, de RNA y de proteína.	60
M.22 Gradientes de densidad de sacarosa.	60
M.22.1 Ultracentrifugación en gradientes analíticos.	60
M.22.2 Ultracentrifugación en gradientes preparativos.	61
M.22.3 Análisis espectrofotométrico y fraccionamiento de los gradientes.	61
M.23 Determinación de la incorporación de aminoácidos radioactivos.	62
M.23.1 Incorporación a proteínas.	62
M.23.2 Incorporación a proteínas más aminoacil-tRNA unido a ribosomas.	63
M.24 Determinación de la radioactividad de partículas ribosómicas marcadas con ³² P.	63
<u>RESULTADOS</u>	64
R.1 Estudios sobre el ciclo en reticulocitos, y la participación de los ribosomas monómeros 80S nativos.	65
R.1.1 Ribosomas monómeros, precursores de unidades ribosómicas activas en células enteras.	65
R.1.2 Las partículas subribosómicas nativas como precursoras de polisomas, en sistemas acelulares de reticulocitos.	67
R.1.3 Los ribosomas monómeros. Su comportamiento en el sistema acelular con componentes definidos.	70
R.1.4 Participación de los ribosomas monómeros nativos como precursores de polisomas, en presencia del extracto ribosómico ER.	71
R.1.4.1 Incorporación de monómeros 80S nativos a polisomas concomitante con su escisión en partículas subribosómicas.	71
R.1.4.2 Necesidad de energía en el proceso de utilización de los ribosomas 80S nativos.	72
R.1.4.3 Las subunidades obtenidas por efecto del extracto ribosómico forman complejos del tipo de los complejos de iniciación.	73
R.2 Actividades del extracto ribosómico.	75

	página
R.2.1 La estimulación global de la iniciación en la síntesis de proteínas.	75
R.2.2 La disociación de ribosomas monómeros por el extracto ribosómico.	77
R.2.3 Inactivación del extracto ribosómico.	79
R.2.4 Separación de ambas actividades del extracto ribosómico.	80
R.2.5 Condiciones en que se extrae la actividad disociante a partir de los ribosomas totales.	81
R.3 Algunas propiedades de la reacción de disociación.	82
R.3.1 Curso de la reacción y efecto de la temperatura.	82
R.3.2 Efectos de cantidades crecientes del extracto ribosómico.	82
R.3.3 Efectos de inhibidores de la síntesis de proteínas.	83
R.3.4 El efecto disociante se ejerce solo sobre ribosomas 80S libres.	85
R.3.5 Comparación del efecto disociante sobre distintos tipos de ribosomas monómeros 80S.	86
R.3.6 Requerimientos de energía.	87
R.3.6.1 Efecto de la presencia de energía en la actividad disociante de distintos extractos ribosómicos.	87
R.3.6.2 Acción estimulante de diversos nucleótidos.	88
R.3.6.3 Determinación de los niveles óptimos de ATP.	89
R.3.7 Dependencia de la concentración de ión Mg^{++} .	89
R.3.8 Modo de acción del ATP.	89
<u>DISCUSION</u>	92
D.1 La reacción y el factor de disociación.	99
D.2 El ciclo ribosómico y la reacción de disociación.	106
<u>CONCLUSIONES</u>	109
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	112
<u>ABREVIATURAS</u>	178

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Unión de las partículas subribosómicas nativas- ³² P a polisomas, durante la síntesis de proteínas en sistemas acelulares.	128
2	Incorporación de material- ³² P de partículas 80S- ³² P a polisomas por efecto del extracto ribosómico. Influencia de la energía.	129
3	Efecto del extracto ribosómico crudo sobre la incorporación por ribosomas 80S nativos de fenilalanina- ¹⁴ C en uniones peptídicas, con mensajero endógeno o con poli-U, en un sistema acelular con componentes solubles definidos.	130
4	Inactivación del extracto ribosómico por efecto de la temperatura. Pérdida de la actividad disociante.	131
5	Influencia de la temperatura de preincubación del extracto ribosómico sobre su efecto disociante de ribosomas 80S a 25°.	132
6	Separación de las actividades disociante y de estimulación global de la síntesis de proteínas.	133
7	La actividad disociante del extracto ribosómico. Condiciones en que se la extrae de la población ribosómica total.	134
8	Efecto inhibitorio sobre la actividad disociante por cantidades altas del extracto ribosómico dializado.	135
9	Efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la actividad disociante del extracto ribosómico.	136
10	Efecto disociante del extracto ribosómico sobre ribosomas monómeros obtenidos por distintos procedimientos.	137
11	Efecto del agregado de energía sobre la actividad disociante de distintos extractos ribosómicos.	138

Tabla		Página
12	Influencia de ATP y/o GTP sobre el efecto disociante del extracto ribosómico.	139
13	Influencia de los nucleósido-trifosfatos sobre la actividad disociante del extracto ribosómico.	140
14	Efecto de los nucleósido-fosfatos de adenosina sobre la actividad disociante.	141
15	Influencia de la concentración del ión Mg^{++} sobre el efecto disociante del extracto ribosómico.	142
16	Actividad disociante del extracto ribosómico. Efecto comparativo del ATP y sus análogos AMPCPP y AMPPCP.	143
17	Preincubación parcial de los ribosomas 80S, o bien del extracto ribosómico con ATP. Su influencia sobre la reacción de disociación.	144

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Obtención de distintos tipos de ribosomas monómeros 80S.	146
2	Fraccionamiento de los ribosomas livianos- ³² P y análisis de las distintas fracciones.	148
3	Utilización de ribosomas 80S para la reformación de polisomas en reticulocitos enteros que se recuperan de la inhibición de la síntesis proteica por fluoruro de sodio	150
4	Unión de las partículas subribosómicas 40S y 60S- ³² P a polisomas, en el sistema acelular completo con componentes solubles definidos	152
5	Unión de ribosomas 80S- ³² P nativos a polisomas. Efecto del extracto ribosómico.	154
6	Unión de metionina- ³ H a partículas subribosómicas 40S, obtenidas por acción del extracto ribosómico sobre ribosomas monómeros 80S.	156
7	Curso de la incorporación de valina- ¹⁴ C a proteínas en el sistema acelular con componentes solubles definidos y ribosomas totales agotados. Estimulación por la presencia del extracto ribosómico crudo.	158
8	Respuesta de diferentes tipos de preparaciones de ribosomas a la estimulación por el extracto ribosómico crudo, de la incorporación de valina- ¹⁴ C en proteínas.	160
9	Efecto de cantidades crecientes del extracto ribosómico crudo sobre la capacidad de incorporar valina- ¹⁴ C en proteínas, en un sistema acelular con ribosomas 80S agotados y componentes solubles definidos.	162
10	Efecto de inhibidores de la iniciación sobre la estimulación de la incorporación de valina- ¹⁴ C en proteínas por ribosomas 80S agotados en presencia del extracto ribosómico crudo.	163
11	Actividad disociante del extracto ribosómico crudo	164

Figura		Página
12	Ensayo de diversas preparaciones de ribosomas 80S como sustratos para la reacción de disociación.	165
13	Inactivación del extracto ribosómico por efecto de la temperatura. Pérdida de la estimulación de la incorporación de valina- ¹⁴ C en proteínas.	167
14	Disociación de ribosomas 80S por efecto de los extractos ribosómicos crudo y desalado en Sephadex-G25.	168
15	Curso en el tiempo de la disociación de ribosomas monómeros por el extracto ribosómico.	170
16	Influencia de la temperatura de incubación en la disociación de ribosomas monómeros por efecto del extracto ribosómico.	171
17	Efecto de cantidades crecientes del extracto ribosómico en la disociación de ribosomas monómeros.	172
18	Inhibición del efecto disociante del extracto ribosómico por el ácido aurintricarboxílico (ATA)	173
19	Ensayo de polisomas como sustratos de la reacción de disociación.	174
20	Efecto de la presencia de energía sobre la disociación de ribosomas 80S.	175
21	Influencia de la concentración de ATP sobre el efecto disociante del extracto ribosómico.	177

PRESENTACION



Los estudios sobre el mecanismo de síntesis de proteínas llevados a cabo en procariotes y eucariotes en los últimos años delinear claramente la imagen de un funcionamiento cíclico del aparato polisómico, en el que, por traducción repetida del RNA mensajero, se sintetizan múltiples cadenas proteicas.

Las unidades ribosómicas que terminan de leer el mensaje son liberadas de los polisomas y reutilizadas luego para volver a unirse al mRNA e iniciar y construir nuevas cadenas peptídicas.

Junto con los polisomas en las células se encuentran ribosomas monómeros libres y partículas subribosómicas. Son estas últimas, y no los monómeros, las que se utilizan en el proceso de iniciación; como precursoras inmediatas del complejo de iniciación las partículas subribosómicas son intermediarias obligatorias del ciclo ribosómico.

El rol metabólico de los monómeros aún no está dilucidado y su relación con el ciclo polisómico ha sido debatida por numerosos autores. En la actualidad se considera que en eucariotes ellos son partículas relativamente inactivas, lo que obligaría a pensar que no están directamente involucrados como intermediarios del ciclo. No obstante hay evidencias que sugieren que tienen un rol potencial en la síntesis de proteínas, a través de su utilización para la formación de polisomas.

Hemos encarado entonces el estudio del rol de estos ribosomas monómeros como precursores de unidades activas en polisomas, en células enteras y en sistemas acelulares de reticulocitos de conejo, comparando su comportamiento con el de las partículas subribosómicas nativas.

En el presente trabajo se han obtenido evidencias de una posible vía de utilización de los ribosomas 80S, a través de su disociación en subpartículas ribosómicas que, a semejanza de lo observado en bacterias, se logra por efecto de un factor(es) extraído de los ribosomas con altas concentraciones salinas.

Se muestra además que estas partículas subribosómicas, obtenidas por la escisión específica de ribosomas monómeros libres, son capaces de incorporarse a polisomas y de formar complejos de iniciación, lo que sugiere un rol fisiológico de las mismas en la iniciación.

Hemos estudiado también algunas características del extracto ribosómico, y en especial, del factor de disociación. Los resultados obtenidos nos han permitido determinar algunas de las propiedades y requerimientos específicos de la reacción de disociación de ribosomas monómeros mediada por el factor. Entre ellos surge como característica saliente, la necesidad de adenosina trifosfato para que dicha reacción tenga lugar.

INTRODUCCION

La secuencia de aminoácidos de una determinada proteína está especificada por la secuencia de tripletes de nucleótidos de un segmento particular del ácido desoxirribonucleico (DNA).

En la primera fase del complicado proceso de síntesis de las proteínas, la información genética, codificada en el DNA celular, es transcripta en un intermediario, el RNA mensajero (mRNA), cuya secuencia de ribonucleótidos es complementaria a la de desoxirribonucleótidos de una cadena de DNA. El mRNA se une luego a partículas de ribonucleoproteínas, los ribosomas, sobre los cuales se realiza la segunda fase - la traducción del mensaje mediante el código genético - que lleva a la construcción secuencial de la cadena polipeptídica.

La población ribosómica total está constituida por ribosomas monómeros libres, partículas subribosómicas y polirribosomas o polisomas (agregados de unidades ribosómicas asociadas a una molécula de mRNA). Las distintas partículas ribosómicas son designadas genéricamente por su coeficiente de sedimentación (medido en unidades S, Svedberg).

En bacterias, actinomicetos y algas azul-verdes, los ribosomas monómeros y las unidades ribosómicas de polisomas, tienen un coeficiente de sedimentación de 70S y pueden ser disociados por distintos métodos (1), en sendas subunidades, de 30S y 50S.

En el citoplasma de eucariotes (levaduras, plantas y animales) los monómeros y las unidades ribosómicas, que tienen un coeficiente de sedimentación de 80S, están constituidos por dos subunidades de 40S y 60S. También existen poblaciones ribosómicas en mitocondrias y en cloroplastos, con características propias, que, tanto en su coeficiente de sedimentación (70S, 30S y 50S), como en su funcionalidad, son allegadas a procariotes más que a eucariotes (2).

Las partículas subribosómicas (subpartículas) nativas (3) son constituyentes normales de la población ribosómica total de las células, genéricamente caracterizadas por sus constantes de sedimentación (30S y 50S en procariotes; 40 y 60S en el citoplasma de eucariotes). Se las nombra de esa manera para diferenciarlas de las subpartículas derivadas, que se les asemejan en su constante de sedimentación, pero que se obtienen de ribosomas mediante diversos tratamientos drásticos de disociación no fisiológica "in vitro" (secuestrantes de Mg^{++} , cambios de pH, diálisis sin Mg^{++} (4, 5)), y que son inactivas. Actualmente se han obtenido preparaciones de subpartículas derivadas activas (6-11) por tratamiento de monómeros o polisomas con soluciones de alta fuerza iónica, o disminuyendo la concentración de Mg^{++} (12, 13); estas subpartículas se diferencian de las partículas subribosómicas nativas porque se dimerizan o se asocian entre sí a las concentraciones iónicas de los sistemas acelulares.

El proceso general de la biosíntesis de proteínas involucra tres etapas distintas: iniciación, elongación y terminación. En estas etapas se produce una serie de eventos coordinados, cuya secuencia lleva a la producción de una cadena peptídica terminada y libre.

La primer etapa, de iniciación, es la decodificación del primer triplete de bases ("codón") traducible del mRNA, por un ribosoma que se une específicamente a un sitio de iniciación sobre el mensajero, ubicando al primer aminoácido en la posición amino terminal de la cadena, y poniendo correctamente en fase la lectura de los codones subsiguientes.

La segunda etapa, de elongación, es la traducción de los codones internos que siguen al triplete específico de iniciación; tiene lugar por movimiento del ribosoma a lo largo del mensajero, que lleva a la lectura ordenada del mismo con polaridad del terminal 5' al 3'; en correspondencia con este movimiento, la cadena peptídica crece desde el extremo amino al carboxilo terminal. Los aminoácidos de los aminoacil-tRNA son agregados de a uno por vez, a través de una serie cíclica de reacciones, que involucran (a) un apareamiento de bases entre el codón del mRNA y la secuencia de bases complementaria de la región del anticodón del tRNA, (b) la formación de la unión peptídica y (c) la translocación.

Por último, en la tercera etapa, de terminación, luego de decodificar el último codón expresable como aminoácido, se reconoce un triplete que no especifica ningún aminoacil-tRNA. En este codón o señal específica de terminación se produce la liberación de la proteína terminada y de los otros componentes de la reacción.

Como el trabajo que se presenta estudia un posible camino para la participación de los ribosomas monómeros en el proceso de síntesis de cadenas peptídicas, a través de su disociación en partículas subribosómicas, y éstas son intermediarios obligatorios del ciclo ribosómico, directamente involucrados en el proceso de iniciación, hemos considerado oportuno hacer una revisión detallada de lo que se conoce actualmente sobre el proceso de iniciación, el ciclo polisómico, y los factores involucrados, con especial referencia a los sistemas de eucariotes. Excelentes revisiones recientes sobre estos temas, podrán ser consultadas en las referencias (14-16)

I.1 Iniciación de las cadenas peptídicas:

La iniciación de la síntesis de proteínas es un proceso complejo con varios pasos bioquímicos definidos, que en procariotes tanto como en eucariotes aparecen con rasgos esencialmente similares.

Intervienen en este proceso las partículas subribosómicas, factores proteicos de iniciación, GTP y aminoacil-tRNA iniciador (que corresponde al codón iniciador en el mRNA).

Durante su transcurso se forman una serie de intermediarios que culminan

con una unidad ribosómica unida al mRNA en su sitio de iniciación, y cuyo aminoacil-tRNA iniciador forma con el siguiente aminoacil-tRNA la primera unión peptídica. El ribosoma con el dipeptidil-tRNA resultante continúa entonces con las reacciones cíclicas de elongación.

El estudio de los determinantes de la iniciación de cadenas peptídicas suele considerarse dentro de tres categorías: la señal (codón) de iniciación; el aminoácido iniciador; el tRNA correspondiente a este último. En lo que sigue revisaremos estos aspectos referidos a los sistemas de procariotes y eucariotes; en ello podrá observarse que, no obstante la división formal, los temas están inextricablemente relacionados.

I.1.1 Codones de iniciación. Especificación de la iniciación en el código genético:

La unión específica de los diferentes aminoacil-tRNAs a ribosomas, promovida por oligonucleótidos definidos, y medida por la retención del complejo formado en filtros de nitrocelulosa, se utilizó para descifrar el código genético (17). Con este tipo de ensayo se estableció que en sistemas bacterianos los tripletes AUG y GUG son los que dan la señal de iniciación (18), y ponen en fase la lectura del mensaje (siempre que se utilicen concentraciones de Mg^{++} cercanas a las fisiológicas). Estos codones son capaces de dirigir la unión o la incorporación de formilmationina (f-Met) en posición N-terminal de la cadena peptídica, en sistemas bacterianos (18-21). El proveedor de este aminoácido es el f-Met-tRNA_f. El otro tipo de tRNA^{Met}, descrito en bacterias, el Met-tRNA_m, suministra por su parte, las metioninas que están en el interior de la cadena peptídica y reconoce solamente al codón AUG (22).

En eucariotes, las primeras evidencias de que el triplete AUG y la metionina tienen funciones de iniciadores específicos, fueron obtenidas en el estudio de mutantes de iniciación en levaduras (23) que sintetizaban isocitocromo C con un resto Met extra, como N-terminal (a diferencia del citocromo C normal, en que el aminoácido N-terminal es Thr). Si, por otra parte, se producía una mutación que afectaba al codón iniciador, no había síntesis de isocitocromo C. Se postuló que el mRNA contenía un codón AUG, previo al de treonina, que en condiciones normales incorporaba, en forma transitoria, metionina como N-terminal; este aminoácido sería luego eliminado en algún momento del crecimiento de la cadena peptídica o después de ser liberada ésta de los ribosomas.

Los trabajos de Brown y Smith (24) aportaron nuevas evidencias de la función de AUG y GUG como codones de iniciación en eucariotes, que especifican metionina N-terminal. Usaron un sistema acelular de tumor ascítico, con polinucleótidos sintéticos como mensajeros, y observaron que cuando se usaban AUG(U)₃₅ ó GUG(U)₃₅, había incorporación de metionina a partir de Met-tRNA_f. No observaron, en cambio, en ningún caso incorporación de Met-tRNA_m. (El triplete

GUG codifica para el aminoácido valina en posiciones internas, pero cuando, como en este caso, está ubicado en el extremo 5' del mRNA, no se observa incorporación de este aminoácido).

I.1.2 Metionina como iniciador universal:

La metionina, especificada por el codón AUG, es el iniciador de la síntesis de cadenas peptídicas, en todos los organismos estudiados a lo largo de toda la escala biológica.

Además de las evidencias sobre esta función en sistemas bacterianos (algunas de ellas ya mencionadas) las primeras pruebas sobre la validez de este aserto en sistemas de eucariotes fueron obtenidas con sistemas acelulares de tumor ascítico, con mRNAs virales (25). Ya anteriormente, conclusiones similares habían sido sugeridas por los estudios de Sherman y col (23), ya mencionados, sobre el papel de la metionina en la iniciación de la síntesis de isocitocromo C en levadura de panadería.

En la hemoglobina, por estudios de péptidos cortos de la porción N-terminal (gracias al empleo de cadenas de globina mutadas (26) u omisión de un aminoácido (27) o uso de un inhibidor en el medio de incubación para su síntesis (28)), se mostró que la metionina sirve para iniciar la síntesis de globina y que es rápidamente eliminada en pasos subsiguientes de la misma. Si en cambio se formula la Met-tRNA_f, la unión es estable (29): la metionina no puede ser eliminada cuando se bloquea el grupo amino.

Según algunos autores (28) la metionina es separada en los primeros pasos de elongación de la cadena polipeptídica (unos 15 a 20 aminoácidos). Otros observaron en cambio, que en lisados de reticulocitos de conejo había péptidos de globina de hasta 50 aminoácidos (30), que retenían metionina como aminoácido N-terminal y, en sistemas acelulares de hígado de conejo, de hasta 65 aminoácidos. En cadenas crecientes de hemoglobina en reticulocitos humanos con anemia falsiforme, la metionina N-terminal es separada después que en reticulocitos de conejo (31), debido, posiblemente, a diferencias conformacionales por distinta composición de aminoácidos entre la hemoglobina S humana y la hemoglobina de conejo.

Los resultados anteriores concuerdan con la observación de que se retiene metionina N-terminal cuando se usan como mensajeros polinucleótidos sintéticos relativamente cortos (24).

Todos estos resultados muestran que el iniciador en sistemas de eucariotes sería la metionina no formilada.

Las protaminas sintetizadas en células de testículo de trucha (32) tienen metionina como aminoácido N-terminal. Este aminoácido puede ser separado de la protamina por acción de una actividad enzimática presente en los

extractos acelulares de testículo. La cinética de marcación con metionina indica que el residuo iniciador es eliminado, probablemente después que se ha completado la síntesis de la proteína.

Las protaminas son, por supuesto, proteínas poco comunes y muy especializadas; pero el hecho que la metionina inicie su síntesis al igual que la de hemoglobina, o de las proteínas sintetizadas en células HeLa (33) o sistemas vegetales como los de embrión de trigo (34) o semillas de Vicia faba (35), hace pensar que lo más probable es que este aminoácido sea el iniciador universal. Esto estaría apoyado por la observación de que este aminoácido sería también el que inicia la síntesis de proteínas virales, según se desprende de los resultados de estudios sobre la traducción de mRNAs de adenovirus (36), poliovirus (37), virus satélite de la necrosis del tabaco (38), reovirus (39) y virus de la encefalomiocarditis (40) "in vitro", del adenovirus en extractos acelulares de células KB humanas (36) y de células HeLa infectadas con poliovirus (41). Además, en el citoplasma de Neurospora crassa, la biosíntesis de proteínas es iniciada por Met-tRNA_f sin formilación previa (42).

Aunque la lista de organismos que muestran iniciación por metionina no bloqueada no es muy extensa, contiene ejemplos de un amplio espectro filogenético. Donde no se usa f-Met, aparece la metionina para tomar su lugar. Por lo tanto, la metionina parece ser el aminoácido iniciador predominante en la naturaleza.

También la cadena alfa A₂ de alfa cristalino de termera se inicia con un residuo metionina, pero este aminoácido aparece acetilado en la proteína y no se elimina durante la síntesis de la cadena polipeptídica. Además, si el mRNA que codifica para esta proteína se traduce en un sistema celular de reticulocitos, la cadena recién sintetizada tiene metionina acetilada en la posición N-terminal (43).

I.2 El proceso de la iniciación en procariontes:

En la siguiente sección se revisa los aspectos principales de este proceso: la naturaleza de los participantes (aminoacil-tRNA iniciador, los factores de iniciación que actúan en la formación del complejo ribosómico de iniciación), el reconocimiento de la señal de iniciación, y la sucesión de pasos que lleva a que el ribosoma bacteriano inicie una cadena peptídica

I.2.1 Aminoacil-tRNA iniciador:

Las bacterias contienen dos especies de tRNA^{Met}: el tRNA_m^{Met} y el tRNA_f^{Met} (14; 44). Sólo este último puede dar lugar a que su Met-tRNA pueda ser formilado enzimáticamente (45) bloqueando el grupo amino, del resto aminoacilo (46).

En E.coli, el N-formil-metionil-tRNA_f (N-f-Met-tRNA_f) (14) inicia

la síntesis de cada proteína en respuesta a un codón iniciador en el mRNA. El tRNA_m^{Met} reconoce sólo al codón AUG en posiciones del mensaje correspondientes a metioninas internas de las cadenas peptídicas. El f-Met-tRNA_f no lo hace porque el factor de elongación T no lo reconoce y lo excluye de formar, por lo tanto, el complejo ternario GTP- f-Met-tRNA_f- T (47). No hay indicios claros de cuáles diferencias estructurales están involucradas en esta discriminación entre ambos tRNA^{Met} (cuyas secuencias de nucleótidos completas se han determinado (48)).

La N-formil-metionina, el primer resto de aminoácido en toda cadena polipeptídica en bacterias, reacciona con el siguiente aminoácido codificado por el mensajero formando una unión peptídica, e inicia la síntesis de la cadena peptídica (46; 49). En algún momento, durante los pasos siguientes de ésta síntesis, el grupo formilo es eliminado, por acción de una deformilasa; también puede eliminarse la metionina, por acción sucesiva de una segunda enzima, una exopeptidasa específica (50; 51). El que muchas proteínas bacterianas contengan metionina N-terminal indica que la acción de la aminopeptidasa bacteriana debe ser restringida por la naturaleza de la cadena adyacente a la metionina.

La formilación del Met-tRNA es esencial para el proceso de iniciación en bacterias (52).

I.2.2 Factores de iniciación:

Por lavado de los ribosomas con soluciones de alta fuerza iónica (NH₄Cl 0,5 a 1,0M), se obtuvieron preparaciones de ribosomas capaces de incorporar aminoácidos en presencia de mensajeros sintéticos (con o sin codones de iniciación), a concentraciones relativamente altas de Mg⁺⁺, pero incapaces de hacerlo a niveles fisiológicos del ión (53). Sin embargo, se podía lograr que el sistema acelular respondiese tanto a mensajeros naturales (RNA de fago MS₂ o de Qβ), como a los sintéticos (siempre que incluyan el triplete AUG en el extremo 5'), aún a bajas concentraciones de Mg⁺⁺, si se agregaba a los mismos el líquido de lavado de los ribosomas (54-55). El fraccionamiento de esa solución de NH₄Cl llevó al descubrimiento de varios factores de naturaleza proteica, necesarios para la iniciación de la biosíntesis de proteínas (54; 56; 57).

Estos factores extraídos de los ribosomas, fueron estudiados en distintos laboratorios y surgieron así nomenclaturas diferentes. La aceptada corrientemente, que usa las siglas IF₁, IF₂ e IF₃ (16), deriva de la propuesta por Ochoa y col. (58), que los denomina F₁, F₂ y F₃, y que corresponden, respectivamente, a los factores A, C y B (57) ó F_I, F_{III} y F_{II} (89) de otros autores.

Se encontró que la mayor parte de los ribosomas de *E. coli* eran deficientes en factores de iniciación (55; 56). La actividad de los mismos se encontró asociada a la subunidad ribosómica 30S (60; 61). Los factores de iniciación no se detectan en la fracción sobrenadante (62), por lo que se supone que se encuentran en las células en cantidades limitadas y pueden saturar sólo una mínima parte del total de ribosomas.

La descripción y funciones de estos factores han sido enumeradas en el Cuadro I.

I.2.3 Reconocimiento de la señal de iniciación y función del factor IF₃:

La naturaleza de la señal que se reconoce sobre la cadena de mRNA es desconocida.

Estudios con RNAs mensajeros de fagos (63-66) mostraron que el sitio de unión de los ribosomas está alejado por una secuencia de aproximadamente 100 nucleótidos, del extremo 5'. Es difícil entonces suponer que se requiere este extremo 5' libre para iniciar la síntesis de proteínas. Se supone que IF₃ reconoce en el mRNA natural una señal de iniciación bastante más compleja que el simple triplete AUG. El factor es capaz de diferenciar el triplete iniciador de los AUG internos (67). La hipótesis de que la región del mRNA que determina la iniciación presenta alguna característica especial está avalada además por evidencias que indicarían que la estructura secundaria del RNA mensajero es importante para el reconocimiento del sitio de iniciación por el ribosoma. Así se observó que un desenrollamiento del RNA de MS₂ por efecto del formaldehído (69), que no impide su actividad como mensajero, decrece el requerimiento de IF₃ para la unión de ribosomas (69). Sin embargo, la presencia de IF₃ estimula la unión al sitio de iniciación de un cistrón específico en particular: el de la proteína de cubierta (70). Esto parece involucrar el reconocimiento de alguna estructura presente sólo en esa región del RNA de MS₂. La estructura secundaria y terciaria del RNA haría a los codones AUG inaccesibles a los ribosomas, salvo en el sitio de iniciación (que se encontraría expuesto en el lazo de una rama en doble hélice del mRNA (69)). Para el reconocimiento de dicho sitio de iniciación y posterior apertura del lazo se requeriría IF₃ (71).

Steitz (72), para dilucidar donde residía la conformación requerida para la iniciación estudió la interacción entre ribosomas bacterianos y fragmentos definidos de las tres regiones de iniciación de síntesis de proteínas del RNA mensajero de bacteriofago R17 (proteína s A, de cubierta y replicasa), marcados con ³²P. Observó que los ribosomas eran capaces de seleccionar el fragmento que codificaba para la iniciación normal sobre un RNA

CUADRO I

FACTORES DE INICIACION EN PROCARIOTES

FACTOR	IF ₁	IF ₂	IF ₃
GRADO DE PUREZA	Cristalino (88). Se conoce su composición de aminoácidos.	Homógeno (contaminantes: exonucleasa y EF-G (89)). Resuelto en α y β (90)	Puro (83): una cadena peptídica. Separado en α y β (76-b) o múltiples (77).
PESO MOLECULAR	94.000 ± 100 (88)	Primeras estimaciones: 65 a 80.000 (91). IF _{2α} : 98.000; IF _{2β} : 83.000 (90)	21.000 (83)
ACTIVIDADES	<p>a) Estabiliza complejo iniciación a baja concentración M₃ y 25° (95)</p> <p>b) Estimula actividad GTPásica asociada a IF₂ (no tiene actividad propia (96)).</p> <p>c) Promueve el reclutamiento de iniciación (97) (especialmente en reutilización de IF₂).</p> <p>d) Podría intervenir en la unión de mRNA al ribosoma, mediada por IF₃ (58; 73).</p>	<p>a) Estimula la unión de f-Met-tRNA a 30S, en presencia de mRNA (63; 98)</p> <p>b) Actividad GTPásica ribosoma-dependiente o "no acoplada" (91; 99; 100) y "acoplada" (aumento velocidad de hidrólisis por agregado de f-Met-tRNA, AUG y F₁).</p> <p>c) Estimulación unión 30S a mRNA (57 a y b). En discusión (58) ya que la interacción es muy inestable.</p>	<p>a) Requerido para la unión de mRNAs naturales a ribosomas (63; 73; 87)</p> <p>b) Requerido para reconocimiento de la señal de iniciación (59; 73; 67; 71).</p> <p>c) Disocia los ribosomas 70S en subpartículas ribosómicas (83-84).</p>
REQUERIMIENTOS.	a) Se une a 30S sólo en presencia de IF ₂ , GTP (6 GMPPCP), mRNA y f-Met-tRNA.	a) Requiere GTP (101) y -SH ⁻ (93). Reacción específica para f-Met-tRNA (otros tRNAs bloqueados en grupo amino: resultados negativos; igual que con Met-tRNA (102))	a y b) La especificidad de esas actividades resulta de la presencia de otros factores asociados a ribosomas que interfieren con IF ₃ (86).
OTRAS CARACTERÍSTICAS	- - - -	Requiere grupos -SH ⁻ libres. Es termolábil (92). Formaría con GTP un complejo muy lábil (protección del calor e inhibidores) (93-94). Sería un complejo ternario IF ₂ -GTP-fMet-tRNA (92). Su existencia está en discusión (90).	Requiere grupos -SH ⁻ libres. Proteína básica, termoestable (83). Requiere (NH ₄ Cl 1M para su extracción (a diferencia de los otros dos que se extraen con NH ₄ Cl 0,5M) (58).

intacto, "in vitro". Por lo tanto, este sitio de unión parece tener, cerca del codón AUG, alguna característica distintiva que le confiere alta afinidad por los ribosomas, mientras que los otros dos sitios requieren del resto de la molécula de RNA.

La función del factor IF_3 , indispensable para formar complejos de iniciación (59; 73), sería reconocer una porción del RNA previa a la señal de iniciación, o poner en fase el mensaje.

La existencia de preparaciones con distintas especificidades para diferentes mensajeros (74-75), apoyaría la hipótesis de que esta proteína puede seleccionar los sitios de unión. (Fraccionamiento de IF_3)

Otra línea de evidencias de la posibilidad de reconocimiento de la señal de iniciación del mensajero por IF_3 surgió cuando se determinó que la infección de E.coli con T_4 , además de disminuir la traducción de otros mensajeros por ribosomas de E.coli, producía una modificación de los factores de iniciación del extracto ribosómico (76). En efecto, los factores de iniciación extraídos de ribosomas de E.coli infectado con T_4 , sólo tiene actividad con RNA de T_4 (76). Se observó también que IF_3 purificado de células infectadas tenía una marcada preferencia por el RNA de T_4 tardío; esto sugería que la infección por T_4 inactivaba las moléculas de IF_3 capaces de reconocer otros mRNAs.

De células no infectadas se separaron dos subespecies distintas de IF_3 ; la que muestra alta selectividad por RNA de MS2 y de T_4 temprano y que tiene baja actividad con T_4 tardío ($IF_{3\alpha}$) y la que actúa a la inversa ($IF_{3\beta}$). Pero ninguna de las dos especies de IF_3 discrimina entre, o tiene distinta afinidad por los diferentes sitios iniciadores de los cistrones individuales del mensajero viral (76-b). En experimentos con extractos acelulares de E. coli, Yoshida y col (77) encontraron que IF_3 podía fraccionarse en una columna de DEAE-celulosa, en múltiples componentes, que difieren en su capacidad de unir los ribosomas a las regiones de iniciación de los diferentes cistrones del RNA de bacteriófago R17.

Por otra parte, Stallcup y col (78), con combinaciones heterólogas de ribosomas lavados con sales y factores de iniciación de dos especies distintas (E.coli y Clostridium pasteurianum), encontraron evidencias de que son los ribosomas y no los factores de iniciación los que controlan la especificidad de reconocimiento y traducción del mRNA y también los que determinan los óptimos de Mg^{++} característicos para la síntesis de proteínas. Esto concuerda con lo observado por Lodish (79), quién encontró que esa especificidad para discriminar entre los cistrones reside en la subpartícula 30S.

Por su parte, Leffler y Szer (80) encontraron que preparaciones ho-

mogéneas de IF_3 de *E.coli* o *Caulobacter crescentus* ($C-F_3$), son intercambiables en la traducción de RNA de fagos de una u otra especie. Pero el RNA de MS_2 (de *E.coli*) no es traducido por ribosomas de *C.crescentus*, ni el RNA de fago Cb5 (de *C.crescentus*) por ribosomas de *E.coli*, independientemente del origen del factor IF_3 . O sea que, como con los ribosomas de *Bacillus stearothermophilus* (79), y confirmando observaciones anteriores con factores de iniciación crudos (81), cierto tipo de especificidad por el mensajero parece residir en la subpartícula 30S.

Las evidencias claras de que los ribosomas pueden discriminar entre cistrones, hicieron surgir la posibilidad de que en *E.coli*, distintas clases de ribosomas podrían ser responsables de iniciar distintos cistrones. Se sabía ahora que hay subpartículas 30S estructuralmente heterogéneas con respecto a ciertas proteínas; esto podría reflejar una heterogeneidad funcional (82).

Las consideraciones anteriores sugieren que los IF_3 de especies bacterianas no relacionadas tienen propiedades de reconocimiento de mensajeros semejantes y falta de selectividad por distintos ribosomas de procariones (haciendo caso omiso de la existencia de subespecies, capaces de discriminar entre amplias clases de mensajeros (76)).

Parecería entonces que existe una relación complementaria entre partes de la estructura misma de la subpartícula 30S y del mRNA, que hace posible la unión. El rol de IF_3 en la misma sería reconocer las características de la estructura ordenada de los mRNA y, quizás por inducción de ciertos sutiles cambios conformacionales, promover la unión de los ribosomas a sitios del mRNA determinados por la complementariedad 30S-mensajero.

Se ha comprobado que IF_3 posee además, la capacidad de disociar los ribosomas 70S en subunidades ribosómicas (83-84). Esta actividad, de manifiesta importancia en la iniciación, será discutida más adelante (I.3).

I.2.4 El factor IF_3 y los factores de interferencia:

El medio de impedir falsas iniciaciones en la traducción de mRNAs naturales ha sido materia de discusión. Si bien podría existir una secuencia específica de iniciación que precediera al codón iniciador, según Dubnoff y Maitra (59) ésta no parece ser requerida por los tres factores purificados. Pero es posible también que esa secuencia de nucleótidos, quizás en presencia de un cuarto factor, aumentara la eficiencia de iniciaciones correctas. En apoyo de esto estaba la observación de dichos autores (85) sobre la disminución de la actividad de los factores IF_2 e IF_3 en la traducción de RNA de fago, a lo largo de la purificación de los mismos, y que ciertas fracciones descartadas del proceso de purificación por ser completamente inactivas

con poli-UG, estimulaban la actividad con mRNAs naturales.

Vinculada a esta cuestión está la de la discriminación entre mRNAs para su traducción. Así se postuló (74) que la actividad de IF_3 era modificada por otras proteínas, que ejercerían un efecto diferencial sobre las distintas funciones de IF_3 . Posteriormente Revel y col (86) encontraron que la actividad de IF_3 podía separarse en distintas sub-fracciones, que diferían en su actividad relativa para diferentes mRNAs, y que esa especificidad resultaba de la presencia de otros factores proteicos, también asociados a ribosomas pero sin actividad IF_3 , que interferían con este último. Describieron un factor i, de interferencia, que, agregado a IF_3 purificado, bloquea la iniciación del cistrón de la proteína de cubierta del fago MS_2 , pero estimula la del cistrón de sintetasa y la traducción del mRNA de fago T_7 . Observaron además (86-byc) que el factor i, proteína de peso molecular aproximadamente 74.000, era idéntico a una de las cuatro subunidades de la enzima oligomérica replicase $Q\beta$ o MS_2 (compuesta por tres proteínas pre-existentes en la célula huésped y la sintetasa codificada por el fago) y propusieron, en base a ello, un modelo auto-regulatorio para la síntesis de la misma.

El factor i no inhibe la actividad disociante del factor IF_3 . La estimulación por IF_3 de la formación, dirigida por mensajero sintético, de un complejo de iniciación con 70S, no es afectada por el factor i; parece ser debida, por lo tanto, a su actividad disociante (87).

Además del factor i, se han detectado otros factores de interferencia (j, k), que confieren a IF_3 distintas especificidades (86). Uno de los aspectos más interesantes de la heterogeneidad funcional de IF_3 es el ya referido cambio de especificidad observada después de la infección de E.coli por bacteriófagos. Esto podría explicarse ahora por un cambio en IF_3 de uno o más factores de interferencia. Se pudo observar, en realidad, una modificación química del factor i, pero no se conoce su naturaleza ni su significado biológico.

Es evidente, de todas maneras, que los factores de interferencia participan en el control de la expresión del gen a nivel de traducción del mRNA.

I.2.5 Pasos en el proceso de iniciación:

I.2.5.1 Formación del complejo de iniciación 30S: La formación de este complejo (30S.f-Met-tRNA,mRNA) es un paso obligatorio en la iniciación. De ello se tuvo la primera evidencia experimental cuando, trabajando con ribosomas de bacterias crecidas con isótopos pesados, se encontró que, en una mezcla de in-

cubación que contenía ribosomas 70S pesados ($^{15}\text{N-D}$) y 50S livianos ($^{14}\text{N-H}$), poli-UG, f-Met-tRNA y factores de iniciación, el aminoacil-tRNA se unía a ribosomas 70S híbridos, detectados en gradientes de densidad, cuya formación dependía exclusivamente de la reacción de iniciación (103).

I.2.5.1.1 Unión de mRNA a 30S: La interacción del mRNA con la subunidad ribosómica 30S es la primera de la secuencia de reacciones que llevan a la formación del complejo de iniciación 70S. Esta unión es inhibida específicamente por ATA (104).

IF₃ juega el rol más importante en el reconocimiento de la señal específica de iniciación, ya sea directamente, o a través de la interacción con la subunidad 30S, demostrada "in vitro" usando IF₃- ^{35}S (97; 105; 106) ó IF₃- $^{14}\text{CH}_3$ (107). Las proteínas de los ribosomas son elementos esenciales para el sitio de unión de IF₃. Este sitio parece consistir en una o más proteínas extraídas por tratamiento con CsCl (108).

Pero como IF₃ se une también al mRNA (83), es difícil asegurar si la unión a 30S ocurre antes que la unión a mRNA o viceversa.

IF₃ tiene una función dual: impedir la asociación de la subunidad 30S con la 50S, y promover la unión del mRNA a la primera (76-a y b). Esta unión de IF₃ no tiene requerimientos de cofactores conocidos.

Parece que IF₁ puede promover esta unión (73; 83), pero su presencia no es necesaria. No está involucrado "per se" en la disociación, pero es capaz de estimularla: disminuye la interacción de las subunidades en 70S (71) y facilita la unión de IF₃ a 30S.

IF₃ genera así subpartículas 30S competentes para la iniciación.

I.2.5.1.2 Unión del aminoacil-tRNA iniciador: Es posible aislar, por gel filtración en Sephadex G50, un complejo ternario IF₂ - GTP - f-Met-tRNA, que es bastante inestable (92; 109), pero que es estabilizado por la presencia de IF₃ (109-b). Sin embargo, el f-Met-tRNA se separa de los factores de iniciación antes de ser transferido a los ribosomas (109-b). Esto, sumado a otros resultados (90; 114-b) parece indicar que el complejo ternario IF₂ - GTP - f-Met-tRNA_f se forma sobre la superficie de la subpartícula 30S, a diferencia del complejo libre que se propuso como intermediario. Este complejo es capaz de transferir f-Met-tRNA a 30S, a 0° a una velocidad diez veces mayor que una mezcla de esos tres componentes libres (92). Hay también una transferencia de GTP.

Este complejo ternario se uniría al complejo 30S-IF₃-mRNA, dando como resultado el complejo de iniciación 30S.

Thach y Thach (110) observaron que en este último hay igual canti-

dad de f-Met-tRNA y GTP, y que, en este paso, no hay hidrólisis de GTP.

Con IF_2 - ^{35}S (97) se confirmó que IF_2 forma parte del complejo y que hay una estequiometría entre la unión de f-Met-tRNA y la concentración de IF_2 (ya sea con GTP o con GMPPCP). Se necesita un mol de IF_2 por cada mol de f-Met-tRNA durante la formación del complejo. Con GMPPCP hay una unión algo menor, que puede deberse a un aumento de la labilidad del complejo IF_2 -GMPPCP-f-Met-tRNA (a semejanza de lo observado en complejos con el factor de elongación Tu y aminoacil-tRNA (111)), y que estaría indicado por la falta de protección contra la inactivación térmica de IF_2 por el GMPPCP (100).

IF_1 se uniría a 30S recién en este paso, ya que lo hace sólo en presencia de IF_2 , GTP, f-Met-tRNA y mRNA.

Una vía alternativa para obtener el complejo de iniciación 30S sería la unión de IF_2 al complejo 30S- IF_3 , seguido de mRNA y luego de GTP y f-Met-tRNA. En efecto, se ha observado la unión de F_2 - ^{35}S a subunidades derivadas sin agregado de ningún componente adicional (97). Además se supone que debe haber IF_2 unido a subpartículas 30S nativas, ya que son la fuente del material de partida para las preparaciones de factores de iniciación.

En cuanto al factor IF_3 , éste debe ser liberado antes de la unión de 50S, porque, como ya se señaló, su función es mantener las subpartículas disociadas. No se sabe, sin embargo, en qué paso es liberado, si luego de la unión del mRNA a 30S ó cuando se unen, al complejo mRNA-30S, el factor IF_1 y el complejo ternario f-Met-tRNA - GTP - F_2 .

El hecho de que en las subpartículas ribosómicas nativas 30S se encuentren los tres factores ($IF_{1,2}$ y 3), no elimina la posibilidad de que, por ejemplo, IF_2 desplace a IF_3 , porque los factores podrían estar distribuidos en distintas partículas 30S.

I.2.5.2 Formación del complejo de iniciación 70S:

I.2.5.2.1 Unión de la subpartícula 50S. Liberación y reciclado de los factores:

Con el agregado de la subpartícula ribosómica de 50S, hay hidrólisis de GTP (92). La unión en sí de la subpartícula, no requiere GTP, ya que puede obtenerse con GMPPCP (89; 97; 112). La hidrólisis de GTP se requiere para liberar a IF_2 del complejo 70S. También se libera IF_1 , pero para ello no se requiere hidrólisis de GTP (96).

Cuando se reemplaza GTP por GMPPCP, IF_2 permanece en el complejo 70S (97; 113), y hay un bloqueo de la formación de la unión peptídica.

Se analizó la hidrólisis de GTP- γ ^{32}P dependiente de IF_2 (97) y se observó que, en ausencia de IF_1 , se realiza en forma estequiométrica. El agregado de IF_1 convierte este proceso en catalítico, lo que apoya la idea de que

IF₂ produce la hidrólisis de GTP una sola vez y que sólo puede ser activado por IF₁, que actúa sobre la superficie del ribosoma y cumple el papel de factor de reciclado de IF₂. La energía que provoca este reciclado proviene de la hidrólisis de GTP. El complejo IF₂-GDP (hipotético), sería convertido en IF₂-GTP por intermedio de IF₁, y liberado así de 70S (112), se usaría nuevamente, en forma repetida.

Esta hipótesis de regeneración a través de otro factor, por un proceso catalítico, semejante a lo que ocurre en el proceso de elongación con T_s (similar a IF₁) y la reutilización de T_u (similar a IF₂) a partir de T_u-GDP, está apoyada por el bloqueo del reciclado de IF₂ con Thiostrepton, antibiótico que inhibe la actividad GTPásica dependiente de 50S y de IF₂, que es esencial para la eliminación del factor (114-a).

Se observó que IF₂ no se elimina del complejo de iniciación 70S en ausencia de IF₁ o cuando se usa GMPPCP (115).

I.2.5.2.2 Sitio de unión de f-Met-tRNA al ribosoma: Se encontró que el f-Met-tRNA unido al complejo de iniciación 70S no reaccionaba con puromicina. Esta es un inhibidor de la síntesis de proteínas que es considerada, por su estructura, como un análogo del aminoacil-tRNA (116), capaz de reaccionar con peptidil-tRNA (117) en presencia de ribosomas (118), dando peptidil-puromicina y tRNA libre. Esta reacción ha servido de base para definir diferentes sitios de unión de aminoacil- o peptidil-tRNA a ribosomas. Cuando el peptidil-tRNA reacciona con puromicina sin el agregado de ningún otro componente, se dice que está unido al sitio P del ribosoma; si, en cambio, se requiere el agregado de GTP y del sobrenadante post-ribosomal, se dice que estos ribosomas tienen el peptidil-tRNA unido al sitio A. Los componentes agregados catalizan la llamada translocación del peptidil-tRNA del sitio A al P. y lo hacen reactivo a puromicina.

La falta de reacción con puromicina del aminoacil-tRNA iniciador, aumada a la observación de que la tetraciclina, un antibiótico que inhibe la unión de aminoacil-tRNA al sitio A de los ribosomas, inhibía la unión de f-Met-tRNA a los mismos (118) hizo pensar que esa unión se realizaba, por lo menos inicialmente al sitio A de los ribosomas; esto lo hacía inaccesible al siguiente aminoacil-tRNA o a su análogo, la puromicina (132).

Posteriormente, esto fué explicado suponiendo la existencia de un sitio pre-P (133) o de un sitio P alterado, o no alineado (134) en que el f-Met-tRNA estaría en un estado de pre-acomodación. Sin embargo, otros autores opinan que la presencia de los factores de iniciación en el complejo es la que impediría el funcionamiento normal del ribosoma (132; 135); la falta de reacción con puromicina por parte de f-Met (132) ó Ac-Phe (135) sería

debida a un bloqueo del sitio A del ribosoma por IF_2 y GMPPCP, más que a una posición errónea del tRNA iniciador, que estaría unido directamente al sitio P. En consecuencia, la conversión de GTP a GDP no sería pre-requisito para la unión de aminoacil-tRNA bloqueado en el amino terminal, al sitio P. Confirmando esta suposición, Benne y col (132) encontraron que la tetraciclina 1×10^{-4} M, a diferencia de lo observado anteriormente, no inhibía la unión de f-Met-tRNA a ribosomas.

Una vez formado el complejo de iniciación 70S-mRNA-f-Met-tRNA, el ribosoma está preparado para incorporar el segundo aminoacil-tRNA, en un proceso que requiere factor de elongación Tu y GTP, y que inicia el proceso de la elongación.

I.3 La actividad disociante en procariotes:

Kohler y col (119) observaron que el bloqueo de la síntesis de proteínas en *Escherichia coli* por la acción de algunos inhibidores, o por cultivo en medios carenciados, llevaba a la acumulación de los productos de desarme de polisomas como ribosomas 70S libres sin que se alterara el nivel de partículas subribosómicas; esto se interpretó como evidencia de la liberación de los ribosomas, en el proceso de terminación, como monómeros y no como subpartículas. Dado que estas últimas son requeridas, según se ha visto, para el proceso de iniciación, se postuló la existencia de un factor que determinaría la disociación de los ribosomas 70S para permitir la reiniciación de cadenas peptídicas, y se supuso que esa actividad estaría en consecuencia vinculada a este último proceso y asociada a los factores de iniciación.

Se observó, en efecto, que los extractos provenientes del lavado de las subpartículas 30S de *E. coli* con NH_4Cl 1M contenían una actividad que provocaba la rápida disociación de los ribosomas 70S libres a concentraciones fisiológicas de Mg^{++} (4mM) (120-b). El factor requerido para la disociación era de naturaleza proteica y actuaba sobre ribosomas libres en forma estequiométrica más que catalítica; no era capaz de disociar, en cambio, los ribosomas polisómicos (120-121). Tampoco mostraba una marcada especificidad de especie bacteriana (122), ya que los extractos de *Pseudomonas aeruginosa* o *Bacillus megaterium* eran tan activos sobre ribosomas 70S de *E. coli* como el extracto ribosómico homólogo. Se comprobó además que las subunidades formadas por efecto del factor disociante, aisladas en gradiente de sacarosa, eran activas en la síntesis de proteínas dirigida por RNA de fago MS₂ (122).

La presencia de esta actividad disociante en los extractos ribosómicos de *E. coli* fue confirmada por Miall y col (123), quienes la purificaron parcialmente y encontraron que la disociación, medida a concentración de Mg^{++} 5mM era proporcional a la cantidad de factor disociante presente.

González y col (124) encontraron una actividad disociante en extrac-

tos ribosómicos de *Bacillus stearothermophilus*, cuyas propiedades compararon con las del factor de disociación de *E.coli*, y encontraron que eran algo diferentes. La reacción de disociación en ambos es temperatura dependiente, aunque en *B.stearothermophilus* lo es por encima de 30°. Pero mientras en *E.coli* se alcanza un estado final, en *B.stearothermophilus* la reacción "in vitro" no llega aparentemente a una meseta, aún después de 60 minutos de incubación a 45°. Este factor se inactiva parcialmente por preincubación durante 5 minutos a 50° ó 65° y totalmente si es a 70°. Parece ser de naturaleza proteica, ya que es inactivado por tripsina y se lo extrae tanto de polisomas como de ribosomas 70S y pudo detectarse aún en el sobrenadante de 100.000 x g.

No se observó especificidad de especie (124), cuando se usaron mezclas híbridas de ribosomas y factor de disociación de *E.coli* y *B.stearothermophilus*. La actividad disociante en estos últimos presenta una variación considerable a lo largo del ciclo de crecimiento de la bacteria, desapareciendo casi completamente en la fase estacionaria; esta variación es paralela a la de la velocidad de síntesis de proteínas.

Estos autores (124) observaron además que la incorporación de aminoácidos radioactivos en respuesta a mensajeros sintéticos, aumentaba cuando se preincubaban los ribosomas 70S con factor de disociación, lo que indicaría que las partículas subribosómicas liberadas por efecto disociante del extracto ribosómico eran activas en la síntesis de proteínas.

Con preparaciones crudas o parcialmente purificadas del factor de disociación, tanto de *E.coli* como de *B. stearothermophilus*, se observó una estimulación del efecto disociante sobre ribosomas bacterianos por el GTP 1 mM (122; 124) y también por ATP y los análogos GMPPCP y AMPPCP (122). Otros autores, sin embargo, no han observado este efecto (83; 121; 123; 108). Además, resultados posteriores mostraron que con factor disociante purificado de *E.coli* no se requería GTP para la reacción de disociación (84).

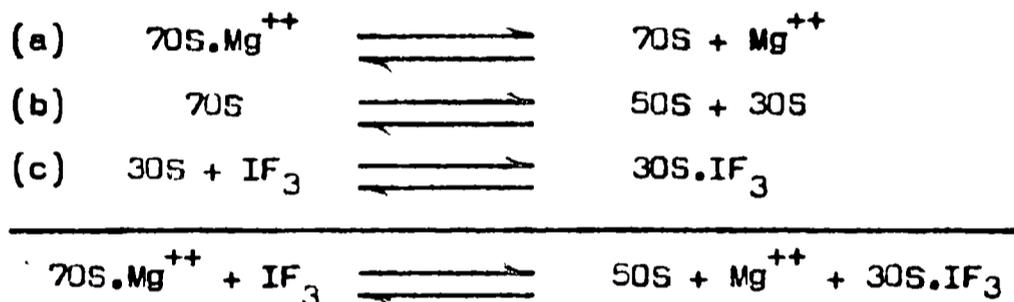
Por fraccionamiento de las preparaciones crudas de factores de iniciación se encontró que el factor de disociación estaba asociado a la fracción IF₃ (121) y no a IF₁ como parecieron indicar los resultados de Miell y col (123). Esto se confirmó con preparaciones más purificadas del factor (83-84; 108-a y b; 125). Por su P.M. y la cantidad de IF₃/célula (83-84), se ha calculado que *E.coli* contiene menos de 0,1 moléculas de IF₃ por ribosoma. Esto significa que el factor está presente en cantidades que pueden dar origen solamente a un número limitado de partículas subribosómicas libres.

Por estudio de la reacción de disociación a distintas concentraciones de Mg⁺⁺ se determinó que la disociación a 5mM era mucho menos eficiente

que a concentraciones menores de este ión (aproximadamente 1/10 o menos de la observada a 1,5mM Mg⁺⁺ (84)).

Como la unión de IF₃ a la subpartícula 30S es independiente de la concentración de Mg⁺⁺ entre 5 y 15mM (105), la mayor actividad disociante observada a baja concentración de Mg⁺⁺ y viceversa (84) no sería debida a un cambio de la afinidad de la subpartícula 30S por el factor. El efecto del Mg⁺⁺ que promueve la asociación de las subpartículas ribosómicas no parece estar pues, directamente relacionado con IF₃.

Con análisis por centrifugación en gradientes de sacarosa no se ha podido detectar ningún intermediario ³⁵S-IF₃-70S, aún en experimentos llevados a cabo a 0° y 10mM Mg⁺⁺ (108), condiciones en que prácticamente no existen subpartículas 30S libres ni posibilidad de disociación de 70S (84), con el consiguiente intercambio espontáneo de partículas subribosómicas (126-127). Por otra parte, favoreciendo, por aumento de la temperatura (37°), el intercambio de partículas subribosómicas, se observa que a los 15 minutos hay un 34% de intercambio, pero que el agregado de IF₃ no lo aumenta ni causa una disociación neta de los ribosomas 70S (108). Estos resultados, sumados a evidencias previas, parecerían indicar (105; 128) que IF₃ actuaría según el siguiente esquema:



en el que el efecto del Mg⁺⁺ sería independiente de IF₃, los ribosomas 70S no tendrían un sitio libre para la unión del factor y el mecanismo de la disociación sería un desplazamiento de la reacción (b) causado por la reacción (c) (108). Recientemente, Beller y col (129) han demostrado la reversibilidad de la reacción de disociación entre los ribosomas y el factor de disociación de E.coli, usando ribosomas marcados en lugar de IF₃ marcado.

Los estudios realizados por Thibault y col (106) con IF₃-³⁵S apoyan las conclusiones de Sabol y Ochoa (108).

Esta formulación está vinculada a una concepción del ciclo polisómico en la que los ribosomas liberados por terminación de las cadenas peptídicas en polisomas, son monómeros 70S y no subpartículas libres. Tal como se refiere en la sección I.4, parece más probable la concepción opuesta (los productos de terminación serían las subpartículas), en cuyo caso el esquema anterior debería ser revisado.

Recientemente se ha detectado la existencia de cepas de E.coli con

mutaciones ambar que afectan la actividad del factor disociante, disminuyéndola en forma considerable. La introducción de supresores fuertes restaura los niveles de actividad disociante a los de la cepa salvaje (130). Se está estudiando la obvia posibilidad de que esas mutaciones afecten el gen que codifica para el factor de disociación.

Agsteribbe y col. (131) han observado que el factor de disociación obtenido de ribosomas de *E. coli*, que es específicamente activo para los ribosomas mitocondriales de "*Neurospora crassa*", es en cambio, incapaz de disociar los ribosomas citoplasmáticos.

I.4 El ciclo ribosómico en Procariotas:

En el ciclo ribosómico en bacterias pueden discernirse distintos pasos: la unión secuencial de las partículas subribosómicas al RNA mensajero, la traducción simultánea de una molécula de mRNA por varios ribosomas desfasados, en una estructura polisómica, y la liberación de las unidades ribosómicas activas después de completar la traducción (14). Este proceso cíclico involucraría la disociación de los ribosomas después de cada evento de traducción completa (136) y la asociación de las partículas subribosómicas para iniciar nuevamente la síntesis (137-138)

No se conoce con certeza el momento preciso en que se disocian los ribosomas. En particular está en discusión si al completar la cadena peptídica, los ribosomas se liberan del mRNA en forma de monómeros o si la disociación es simultánea con la terminación y se liberan como partículas subribosómicas.

La acumulación de monómeros a expensas de los polisomas en condiciones en que disminuye la velocidad total de síntesis de proteínas, tales como la limitación de la fuente de carbono (119;139), la carencia de aminoácidos (119; 136), el agotamiento de f-Met-tRNA (52; 140), el enfriamiento lento de los cultivos en crecimiento (141), o el estar de las células en fase estacionaria(141), han sido interpretados como evidencia de que los ribosomas son liberados en una forma estable: como monómeros libres y no disociados, que solo posteriormente son convertidos en partículas subribosómicas (119). Su disociación en partículas 30S y 50S nativas dependería de la acción de un factor de disociación ribosómica (120), identificado ahora con el factor de iniciación $IF_3\beta$ (83; 84; 125).

Sin embargo, en estudios "in vitro" se ha observado que durante la síntesis de proteínas, existe un intercambio continuo de partículas subribosómicas entre la fracción de los ribosomas que participan de la traducción

y el reservorio de las partículas 30S y 50S libres, en tanto que los ribosomas monómeros (que no sintetizan) no se equilibran rápidamente con las partículas subribosómicas; esto se considera como evidencia de que los ribosomas se disocian al terminar la traducción y se liberan como partículas 30S y 50S (136; 142; 143). En condiciones subóptimas para la síntesis de proteínas estas partículas subribosómicas se reasocian fácilmente para formar monómeros (142-143), que son distintos de los ribosomas monómeros en polisomas , según se evidencia por su disociación específica en presencia del ión Na^+ (142; 143), RNasa (144-145) o el factor de disociación (122), o también por efecto de la presión hidrostática generada durante la centrifugación a alta velocidad (146). Se propuso (128; 142) que estas partículas 70S libres (que no están unidas a cadenas polipeptídicas ni a mRNA (140; 141), y que no provienen de la degradación de polisomas, ni son monosomas de iniciación o terminación), serían productos laterales del ciclo ribosómico; las mismas constituirían una reserva de ribosomas inactivos que participaría en el proceso de traducción sólo cuando las células necesitaran mayores velocidades de síntesis de proteínas. El factor IF_3 , que impediría la reasociación de las partículas subribosómicas 30S y 50S y, en consecuencia la formación de ribosomas 70S, controlaría así el número de ribosomas activos; lo haría por regulación del balance de los flujos de las partículas subribosómicas hacia polisomas o hacia monómeros libres inactivos en la síntesis. De acuerdo a este esquema de Kaempfer, estos ribosomas no estarían en equilibrio con las partículas subribosómicas. Sin embargo, Spirin (127) ha demostrado la existencia de un equilibrio dinámico entre monómeros y partículas subribosómicas, "in vitro". Por otra parte, experimentos de marcación con pulsos "in vivo", con precursores de proteínas o de RNA, sugieren que la mayor parte de los ribosomas 70S participan activamente como intermediarios del ciclo (147).

La formación de ribosomas híbridos densidad intermedia, como producto de la desagregación simultánea de una mezcla constituida por polisomas endógenos marcados con isótopos pesados y un exceso de polisomas no marcados o "livianos" (148), en condiciones que no permiten la reiniciación, dió base de sustentación a la idea de que los productos inmediatos de la terminación eran las partículas subribosómicas libres e inestables; su reasociación produciría los ribosomas 70S observados, libres y estables, como producto secundario. En este caso la terminación liberaría simultáneamente partículas 30S y 50S livianas y pesadas, que al reasociarse indiscriminadamente, darían lugar a los ribosomas híbridos (142).

Se encontró posteriormente que puede producirse la disociación de los ribosomas pesados libres a medida que sedimentan en un gradiente de sa-

carosa, por la presión hidrostática, mimetizando la formación de híbridos (126). Eliminando entonces este "artefacto" mediante la fijación con glutaraldehído antes del análisis por sedimentación, pudo observarse que en los experimentos de desagregación mixta ya referidos, los ribosomas libres eran capaces de intercambiar rápidamente sus subunidades con las partículas 30S y 50S libres (126; 149; 150) no sólo durante, sino también después de la terminación de la síntesis de las cadenas peptídicas; en consecuencia, ese intercambio no proveía evidencias claras de la formación de partículas subribosómicas libres durante el proceso de liberación de las unidades ribosómicas activas, ya que la formación de los ribosomas híbridos, al ocurrir también después de este proceso, no es capaz de discriminar entre los dos modelos de liberación de ribosomas.

Con mezclas de polisomas semejantes, Subramanian y Davis (151) prácticamente eliminaron el intercambio de partículas subribosómicas post-liberación por los ribosomas libres, usando polisomas purificados (relativamente libres de partículas 30S y 50S y, en consecuencia, de los factores de iniciación, de los cuales son la principal fuente), e incubándolos ya sea a temperaturas menores (25°) o a concentraciones de Mg^{++} superiores (12-14mM) a las convencionales (37° y Mg^{++} 10mM). En esas condiciones, o en presencia de puromicina (100 μ g/ml), la incubación de polisomas marcados con isótopos pesados en presencia de un exceso de polisomas livianos lleva a una acumulación de los ribosomas liberados, sin intercambio de partículas subribosómicas, como ribosomas libres (según se confirmó por disociación con Na^+ (143)). De estos resultados los autores dedujeron que los ribosomas eran liberados del mRNA por un cambio conformacional de la partícula 70S intacta, más que por disociación de los mismos. Puede sin embargo argumentarse que las condiciones utilizadas para llegar a estas conclusiones podrían alterar la liberación normal de los ribosomas.

Algranati y col (152), por su parte, para dilucidar la forma de liberación de los ribosomas polisómicos en el proceso de terminación utilizaron condiciones más fisiológicas: midieron el intercambio de partículas subribosómicas durante y después de la terminación de la síntesis de cadenas peptídicas, en presencia de espermidina, en un sistema acelular "in vitro", con mRNA endógeno y partículas 30S radioactivas, agregadas a distintos tiempos, en condiciones en que no se produce iniciación de la síntesis de proteínas ni formación de complejos de iniciación. La espermidina, que estabiliza los monómeros 70S que aparecen liberados de los polisomas (128), bloqueando cualquier intercambio subsecuente de sus subunidades (152), no modificaba el intercambio de partículas subribosómicas con los ribosomas 70S mien-

tras tenía lugar la síntesis de proteínas, pero sí anulaba el observado como proceso independiente después de la terminación; en estas condiciones se observaba además una estrecha correlación entre el grado de liberación de cadenas peptídicas terminadas (y por ende, de sus respectivas unidades ribosómicas) y el concomitante intercambio de subunidades. Estas evidencias llevaron a la conclusión de que los ribosomas sufrían una disociación simultánea con el proceso de terminación y liberación de las cadenas. En este sistema la reasociación ocurre inmediatamente ya que se detectan partículas 70S en gradientes de sacarosa; éstas deberían ser nuevamente disociadas para poder reiniciar la síntesis de proteínas. Sin embargo no puede descartarse que parte de esas partículas subribosómicas liberadas sean utilizadas directamente en nuevos ciclos de traducción, ni la posibilidad de que las partículas 70S reasociadas sean un paso necesario, aunque rápido, del ciclo ribosomal.

El uso de espermidina en el estudio del intercambio de partículas subribosómicas con los ribosomas liberados, en presencia de puromicina (153), llevó a conclusiones semejantes a las de Subramanian y Davis (151): los ribosomas desasociados del mRNA después de la liberación de cadenas peptídicas incompletas por el antibiótico, son monómeros 70S. En qué radicaría la diferencia entre esta terminación y la fisiológica? En ambas ocurrirían cambios conformacionales que llevarían a una "apertura de las subunidades del ribosoma para abandonar el mRNA, pero mientras que en el primer caso (liberación por puromicina) se mantendrían unidas, en la terminación natural tendría lugar un cambio drástico que llevaría a la disociación.

Se observó que el ácido fusídico impide el intercambio de partículas subribosómicas en la terminación natural, y que también inhibe el efecto de la puromicina aumentando dicho intercambio (153). Como los inhibidores de la translocación bloquean también la ruptura de polisomas en presencia de puromicina (155), es posible que los ribosomas descargados se muevan a lo largo del mensajero, más allá del punto de liberación del péptido por la droga y que se necesita una, alguna o muchas translocaciones de las partículas ribosómicas de los polisomas, vacantes por puromicina, antes de que ocurra su liberación.

Las conclusiones de Subramanian y Davis y de Algranati y col. coinciden, según vemos, son respecto al estado de los ribosomas polisómicos al ser liberados como monómeros por efecto de la puromicina; pero discrepan en cuanto a la terminación natural. Si bien la cuestión no puede considerarse definitivamente resuelta, el modelo de ciclo propuesto por Algranati y col. en bacterias, concuerda con el generalmente aceptado en eucariotes.

I.5 El proceso de la iniciación en eucariotes:

En el citoplasma de células nucleadas la iniciación de cadenas peptídicas se ha revelado como un proceso que, si bien tiene rasgos generales semejantes a los de las bacterias, ostenta un grado de complejidad mayor, y aún no se puede dar un panorama detallado claro de los pasos y reacciones involucrados.

Como en las bacterias, en la iniciación de eucariotes intervienen subpartículas ribosómicas (ahora 40S y 60S), mRNA, aminoacil-tRNA iniciador, GTP y una serie de factores proteicos de iniciación, cuyo número ha ido incrementando (véase por ejemplo la revisión de Haselkorn y Rothman-Devies (16)).

Como en otros campos de la bioquímica, el paulatino aumento del grado de purificación y homogeneidad de las distintas fracciones que intervienen en el proceso de iniciación, ha permitido poner de manifiesto la intervención de nuevos factores, hasta entonces ignorados. Pero siguen surgiendo nuevos requerimientos que revelan que la incógnita sobre el número total de factores intervinientes aún sigue en vigencia y que, en eucariotes, el mecanismo del proceso de iniciación no ha sido totalmente dilucidado; pero el desarrollo de nuevos métodos para el aislamiento y purificación, así como de los sistemas para medir su actividad "in vitro", permiten entrever la posibilidad de que en un futuro próximo pueda definirse en forma inequívoca el orden de los pasos y los componentes macromoleculares que se requieren en cada uno de los mismos.

I.5.1 Aminoacil-tRNA iniciador:

En organismos superiores nunca se ha encontrado f-Met-tRNA_f, excepto en mitocondrias (157-158) y en cloroplastos (158). En estas organelas, que tienen semejanzas con los procariontes, el f-Met-tRNA_f parece funcionar como iniciador sobre los ribosomas 70S.

La ausencia de aminoácido N-terminal con el grupo amino bloqueado en células de eucariotes (33; 159-162) sugirió que las mismas tendrían que utilizar un mecanismo de iniciación diferente del observado en los sistemas bacterianos. Sin embargo, varios laboratorios (24; 163-167) encontraron que el citoplasma de células de algunos eucariotes también contenía dos especies de Met-tRNA. Aunque estos sistemas no tienen transformilasas, con frecuencia se encuentra que uno de esos Met-tRNA puede ser formilado por enzimas bacterianas (con excepción del trigo) (14; 137) y así funcionar como iniciador en sistemas acelulares de E.coli, con iguales requerimientos y propiedades que el f-Met-tRNA_f de E.coli (137; 156), lo que indica que los ribosomas 80S no interactúan con tRNAs con aminoácidos bloqueados.

La especie formilable (designada Met-tRNA_f es la que actúa como i-

niciadora (24) mientras que la otra, designada Met-tRNA_m, incorpora metionina sólo en posiciones internas de la cadena polipeptídica.

Esta excluyente especificidad de codificación de las especies de tRNA^{Met} en la iniciación o en la elongación, ha sido estudiada en distintos sistemas. Así, en sistemas acelulares de reticulocitos de conejo con tRNAs homólogos (169-170) o heterólogos (29) se observó que el tRNA_f^{Met}, transfiere metionina a polipéptidos en respuesta al codón inicial de metionina (AUG), mientras que el tRNA_m^{Met} la transfiere en respuesta a codones de metionina interna (AUG). Iguales resultados se obtuvieron en un sistema acelular de tumor ascítico con mRNAs sintéticos (167) y en citoplasma de *Neurospora crassa* (42).

En sistemas acelulares de germen de trigo (171) se separaron tres especies de tRNA^{Met}, de las cuales dos parecen funcionar en la iniciación de cadenas. De éstas, la especie menor es formilable por una transformilasa muy activa, existente en extractos de germen de trigo. La especie mayor, designada tRNA_i^{Met}, no es formilable. Un estudio de su localización celular, en hojas de trigo (172) mostró que se encuentra en el citoplasma, mientras que la especie formilable está en los cloroplastos y funciona en la iniciación, en los mismos, como f-Met-tRNA. Se mostró que el Met-tRNA_i^{Met} es capaz de transferir metionina a la posición N-terminal de péptidos producidos "in vitro" en un sistema acelular de embrión de trigo con un mRNA natural, el de TMV (34). La incorporación de metionina de Met-tRNA_m^{Met} ocurre sólo en posiciones internas de las cadenas peptídicas, luego de un intervalo de tiempo inicial, lo que es consistente con una función en la elongación de cadenas.

Las semillas de *Vicia faba* (1) también contienen tres especies de tRNA^{Met}, con características y funciones semejantes a las de germen de trigo, de acuerdo a los resultados obtenidos por análisis de los productos de incorporación de aminoácidos dirigida por mRNA endógeno, poli-AUG ó poli-UG (35). Aquí también uno de los tRNAs iniciadores parece funcionar en las organelas celulares.

También la cadena alfa A₂ de alfa cristalina de ternera se inicia con la incorporación de un residuo metionina donado exclusivamente por Met-tRNA_f^{Met}; la metionina interna es donada por la otra especie de Met-tRNA (43).

I.5.2 Factores de iniciación:

Aunque ha habido un rápido progreso en la separación, purificación y parcial caracterización funcional de varios factores proteicos involucrados, aún no está claro su rol en el mecanismo de la iniciación de cadenas peptídicas en eucariote (173-175).

Los resultados obtenidos provienen fundamentalmente de estudios rea-

lizados en sistemas acelulares de reticulocitos de conejo, hígado y músculo de rata, músculo de embrión de pollo, oviducto de gallina, levadura, germen de trigo, insectos, larvas de crustáceos y tumores. La localización celular de los factores varía en los distintos sistemas y tejidos.

Los factores de iniciación obtenidos de ribosomas de reticulocitos de conejo, por lavado con altas concentraciones salinas, fueron estudiados en el laboratorio de Anderson (176-185). Estos factores, obtenidos de células que han perdido su núcleo, son muy semejantes, si no idénticos a los obtenidos de ribosomas de células nucleadas de hígado de conejo (186). Se han encontrado algunas fracciones o factores individuales de otros sistemas de eucariotes que funcionan en forma semejante a los factores de iniciación de reticulocitos. Otros, en cambio, no han sido comparados o resulta difícil establecer su correspondencia con los obtenidos de otras fuentes.

I.5.2.1 Obtención de los factores a partir de distintas fuentes y propiedades de los mismos:

I.5.2.1.1 Extractos ribosomales: A semejanza de lo observado anteriormente en bacterias, se encontró, en reticulocitos de conejo, que ciertas fracciones proteicas extraídas de los ribosomas con altas concentraciones de cationes monovalentes, son necesarios para la síntesis "de novo" de proteínas en el sistema acelular. Así, en 1967, Miller y col (173-a) observaron que los ribosomas lavados con KCl 0,5M, que habían perdido la capacidad de sintetizar globina con mensajero endógeno, la recuperaban por el agregado del extracto ribosomal. Este extracto no purificado provocaba, además, una disminución de la concentración óptima de Mg^{++} requerida para la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U (173-b), y promovía la reactivación de ribosomas agotados (que habían perdido su capacidad de síntesis de proteínas por incubación exhaustiva en un sistema acelular completo) y la reformación de polisomas a partir de los mismos (175-a). Al hacer un análisis más detallado de la naturaleza del extracto ribosómico, se encontró que, por centrifugación en gradientes de sacarosa, podía separarse la actividad en dos fracciones que tenían distintas funciones y actuaban sinérgicamente (175-b).

Anderson y col (176-185) confirmaron los resultados de Miller y lograron separar cuatro factores, M_1 , M_{2A} , M_{2B} y M_3 , cuyas propiedades y funciones se describen en el Cuadro II.

De los estudios realizados por dichos autores con estos factores surge que las principales diferencias entre los modelos natural y artificial (con mensajero sintético) de iniciación en mamíferos, son el requerimiento de GTP para la unión de Met-tRNA_f y el requerimiento de M_3 para la síntesis de la primer unión peptídica con mRNAs naturales (endógeno o exógeno); esto

CUADRO II

FACTORES DEL EXTRACTO RIBOSOMICO DE CONEJO (según Anderson y col.)

PROPIEDADES	FUNCIONES
<p>M₁ No es retenido por DEAE-celulosa (177). PM (Sephadex G-150):95.000 (186). Coeficiente de sedimentación:3,4S (186). Purificado 480 veces (fraccionamiento en (NH₄)₂SO₄ y cromatografía en Sephadex G-200, carboximetilcelulosa y fosfo-celulosa, donde eluye con KCl 420mM (187)).</p>	<p>M₁ 1) Requerido para unir f-Met-tRNA_f a 40S lavados (173). Reacción estimulada por M_{2B}; no requiere GTP. 2) Requerido para unir Phe-tRNA y N-acetil-Phe-tRNA a ribosomas lavados, en presencia de poli-U, a baja concentración de Mg⁺⁺ (178). Puede ser parcialmente sustituido por IF₂ de E.coli (177)</p>
<p>M₂ Eluye de DEAE-celulosa con KCl 0,22-0,4M (177) (178;180). Sephadex G-200: separación en dos componentes: M_{2A} y M_{2B} (173). PM (Sephadex G-75) M_{2B}:19.000 (176) (semejante al de células de hígado, PM:21.000). Coeficiente de sedimentación de M_{2A}:6,65S (176). M_{2A} purificado 460 veces (luego de ser separado de M_{2B}, se purificó por cromatografía en fosfo-celulosa)(187).</p>	<p>M₁+M₂ 1) Requeridos para la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U a baja concentración de Mg⁺⁺ (5mM) (175-b; 176) 2) Estimulan la unión enzimática de Met-tRNA_f a ribosomas lavados, en presencia de AUG (179); se requiere GTP (180) (sustituible por GMPPCP (182)). Con mensajero natural, sólo actúan con GTP (185) 3) Requeridos para la síntesis de Met-puromicina, en presencia de AUG, a baja concentración de Mg⁺⁺ (180). No requieren factor de elongación T₁ (diferencia con sistemas bacterianos). Para la formación de la unión peptídica se requiere hidrólisis de GTP (182).</p>
<p>M_{2B} Purificado 260 veces (fraccionamiento en (NH₄)₂SO₄, DEAE-celulosa y gel filtración en Sephadex G-75) (187).</p>	<p>M_{2A} 1) Cataliza hidrólisis de GTP dependiente de ribosomas, con ribosomas lavados o con subpartículas 40S (a semejanza de IF₂ de E.coli (183)). 2) Hidroliza ATP (posible rol de ATP en iniciación, sugerido también por por resultados en embrión de trigo (188-189) y en hígado (190)).</p>
<p>M₃ Eluye de DEAE-celulosa con KCl 0,18M (173-b; 176-177). No es retenido en Sephadex G-200 (177). Se lo aisló en forma inestable (177). Es más estable luego de purificarlo por cromatografía en fosfo-celulosa (184).</p>	<p>M_{2B} 1) Estimula la unión de f-Met-tRNA dirigida por AUG (183).</p>
<p>DF Factor de disociación: Eluye con M_{2A} y trazas de M₃ y EF-1, de Sephadex G-200. Se eliminan estos tres factores contaminantes por cromatografías sucesivas. Geles de poli-acrilamida:3 bandas (una mayor (un 60%) y dos menores (187))</p>	<p>M₃ 1) Requerido para síntesis globina (sistema acelular reticulocitos. Sólo en su presencia M₁, y M_{2A} y B estimulan (183)); no con mRNA sintético 2) Requerido para la primer unión peptídica (sistemas naturales con mRNA endógeno (181) o exógeno (181; 185)); formación de Met-Val en globina DF 1) No reemplaza a M₁, M_{2A}, M_{2B}, ni M₃ (187). Veáse la sección I₆ para una descripción de su acción disociante.</p>

último marca una evidente diferencia con lo observado en bacterias. Es importante recalcar que la manifiesta necesidad de M_3 para la traducción de mRNA de mamíferos, sólo surgió de estudios con modelos naturales; ninguno de los modelos artificiales descritos habría podido predecir su requerimiento.

Schreier y Steehelin (191) separaron del extracto ribosómico de reticulocitos de conejo cuatro factores, necesarios para la síntesis de globina, que denominaron $IFE_1, 2, 3$ y 4 (E por eucariotes). Purificaron IFE_3 y encontraron que era semejante al M_3 de Anderson y col., pero IFE_2 no se asemejaba, de acuerdo a su afinidad en DEAE-celulosa, a ninguno de los factores descritos por estos investigadores. Se purificó también un factor IFE_3 de células de tumor ascítico de Krebs de ratón y de hígado de cobayo. En todos los casos su principal característica es su gran tamaño (191). Ambos factores son sensibles a NEM.

Gupta y col. (192-195) por preincubación de los ribosomas (en lugar del lavado habitual con altas concentraciones iónicas), obtuvieron un sistema de reticulocitos de conejo que dependía del agregado de varios factores de iniciación. Obtuvieron una fracción I (lavado de los ribosomas con KCl 0,5 M) que separaron en por lo menos tres factores, por cromatografía en DEAE celulosa: IF1, IF2 y IF3. Para obtener la máxima incorporación de metionina (Met-tRNA_f pre-formado) se requieren los tres factores; estos parecen corresponder a los factores M_2 y M_3 descritos por Anderson y col. Los ribosomas preincubados no requieren el agregado del extracto ribosomal o la suma de los tres factores para incorporar fenilalanina- ^{14}C en respuesta a poli-U, lo que sugiere que los mismos retienen al factor M_1 .

Por reextracción con KCl 1M de los ribosomas lavados previamente con KCl 0,5M (194), se obtuvo otro factor proteico, F_x , que se une a Met-tRNA_f y a otros tRNAs, en ausencia de GTP. Posiblemente se une inespecíficamente a distintas especies de RNA, ya que su unión con Met-tRNA_f es inhibida por tRNA deacilado de reticulocitos, poli-U, poli-A y poli-U:poli-A. Esta fracción F_x es capaz de inhibir la síntesis de proteína dirigida por poli-UG, poli-AUG o poli-U en forma marcada. Aparentemente esta actividad inhibitoria no se expresa mientras F_x está en los ribosomas; su rol fisiológico no ha sido aclarado aún.

Heywood (196-197), describió la presencia de factores de iniciación en extractos ribosómicos de ribosomas de músculo de embrión de pollo. Posteriormente aisló tres factores (198-199). El factor EF_3 eluía de Sephadex G-200 en forma semejante al M_3 , y tenía también funciones semejantes. El factor EF_1 tenía características similares al factor M_1 . De reticulocitos de embrión de pollo fueron aislados también factores semejantes (280)/ en células L de ratón, por fraccionamiento del extracto se obtuvieron tres factores: IFL-1, 2 y 3) (201-204)

De polisomas del oviducto de pollo puede extraerse con KCl una fracción soluble, AvF, capaz de estimular unas diez veces la síntesis de proteínas por ribosomas lavados, dirigida tanto por mensajeros endógenos (o naturales) como exógenos (sintéticos) y capaz también de producir una disminución de la concentración de Mg^{++} requerida para la síntesis óptima de proteína en ambos tipos de sistemas (205). La fracción AvF es inactivada por calentamiento a 60° , pronasa o NEM, pero no por RNAsa, lo que sugiere que tiene una naturaleza proteica.

Grummt y Bielka (206) aislaron una fracción proteica de ribosomas de hígado de rata por precipitación de los mismos con $MgCl_2$ 50 mM y subsiguiente lavado con $MgCl_2$ 10 mM. Esa fracción permite la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U, con ribosomas lavados, a baja concentración de Mg^{++} (3 mM) y es indispensable para la iniciación del polipéptido. La formación del dipéptido inicial, N-acetil-fenilalanil-puromicina, depende del lavado ribosomal.

Ilan e Ilan (207), estudiando los requerimientos para la iniciación en sistemas acelulares de insectos, encontraron en extractos ribosomales de Tenebrio tres factores (I_1 , I_2 e I_3) que se requieren para la traducción del mRNA natural. Con $AUG(U)_n$ se necesitan solo los factores I_1 e I_2 . El factor I_3 fué aislado del complejo de ribonucleoproteína que se libera de los polisomas por tratamiento con KCl 1M.

I.5.2.1.2 Sobrenadantes post-ribosomales : También se han encontrado factores de iniciación en los sobrenadantes post-ribosomales de reticulocitos de conejo (208;216-217), hígado de rata (209-212), células de tumor ascítico (213), embrión de trigo (188-190; 214-215) y Artemia salina (218-221).

Así, Fuhr y col. (208) describieron un factor de iniciación presente en lisados de reticulocitos, que se obtenía del sobrenadante de la precipitación a pH 5, por precipitación con $(NH_4)_2 SO_4$ a 40% de saturación. Este factor elufa de Sephadex G-200 en forma semejante al factor M_3 y estimulaba la síntesis de globina por ribosomas totales crudos (obtenidos por precipitación a pH 5 y redisolución).

Gees-Clough y Armstein (216), también en lisados de reticulocitos, describieron la presencia de un factor de iniciación en la fracción del sobrenadante de $100.000 \times g$ que precipita con $(NH_4)_2 SO_4$ a 40-70 % de saturación. Este factor se inactivaba por congelamiento y descongelamiento de la preparación. Era semejante a M_3 por su comportamiento en cromatografía en Sephadex G-200. Estimulaba la síntesis de globina por ribosomas derivados con igual capacidad que un extracto ribosómico en KCl 0,5 M.

También en el sistema acelular crudo de reticulocitos de conejo se ha observado la existencia de un factor (o factores) soluble, involucrado en la etapa de iniciación (217), que es termolábil y que se consume o inactiva a lo largo del funcionamiento de la síntesis de proteínas.

En hígado de rata, la fracción soluble cruda promovía la unión de N-acetil-fenilalanil-tRNA a 40 S y, en menor grado, a 80 S y a 40+60 S (209). El poli-U y el GTP no afectaban la unión de éste aminoacil-tRNA a 40 S. Por sus características, puede distinguirse claramente esta actividad de la del factor de elongación T_1 (209). Esta fracción cruda promovía también la unión de phe-tRNA, poli-U dependiente, a subpartículas 40 S de hígado o de músculo de rata, a baja concentración de Mg^{++} . Esa unión requería GTP y era inhibida por NEM (210). El factor que promovía la unión (209-211), fué posteriormente aislado y considerablemente purificado por cromatografía en DEAE celulosa e hidroxapatita (212). Su P.M. determinado por Sephadex G-200, es aproximadamente 93.000. Por sus características cromatográficas y funcionales se asemeja al factor M_1 de reticulocitos.

En células de tumor ascítico el sobrenadante postmicrosomal contiene los factores que catalizan la unión de phe-tRNA a ribosomas 40 S de músculo esquelético de rata, la síntesis de polifenilalanina a baja concentración de Mg^{++} y la traducción de mRNA de virus de encefalomiocarditis (EMC) por ribosomas reconstituidos a partir de subpartículas ribosómicas; contiene por lo tanto, los factores de iniciación de mamíferos M_1 , M_2 y M_3 (213 a), a diferencia de los sobrenadantes de hígado de rata o de músculo, que contienen solo M_1 . La fracción extraída con KCl 1M de microsomas de estas dos últimas fuentes (213 b) contienen M_1 y M_2 . En ninguna de las dos hay, en cambio, factor M_3 activo para la traducción del mRNA de virus (213 b).

En sistemas derivados de embrión de trigo se aislaron dos factores (C y D) análogos a los factores IF1 e IF2 de sistemas bacterianos y a M_1 y M_2 de reticulocitos. Pero en embrión de trigo son componentes del sobrenadante (188-190). En experimentos preliminares se obtuvieron indicios de un tercer factor que estaría asociado a los ribosomas (214).

Los factores de iniciación del crustáceo *Artemia salina* se encontraron en el sobrenadante (218-221). El factor que promueve la unión a 40 S de f-Met-tRNA_f de *E. coli*, dirigida por AUG, a baja concentración de Mg^{++} (218) es básico y tiene un P.M. de aproximadamente 145.000; parece estar constituido por dos subunidades idénticas (221). Por sus propiedades se le ha encontrado semejanza con el factor M_1 de reticulocitos. A diferencia de este último, que no es sensible a NEM (219), los factores de sobrenadante tanto de *Artemia salina* como de hígado de rata y células L, son inactivados por este reactivo

de grupos sulfhidrilos, al igual que en el extracto ribosómico de oviducto de pollo.

Se había observado que el factor M_{2A} de reticulocitos es capaz de hidrolizar no solo GTP, sino también ATP, lo que marca una diferencia con el sistema de procariones y apuntaría a una posible función del ATP en la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes, como lo observara Marcus en embrión de trigo (188-199). Maxwell (190) observó, en el sobrenadante post-microsomal de hígado un factor capaz también de hidrolizar tanto GTP como ATP.

El extracto ribosómico de reticulocitos contiene un factor que promueve la disociación de los ribosomas monómeros en subpartículas ribosómicas de 40 S y 60 S (187; 222-224). Como estas subpartículas están directamente involucradas en el proceso de iniciación, y en *E. coli* el factor de disociación de ribosomas (DF) ha sido identificado con uno de los factores de iniciación (el factor IF_3 (83-84)), se consideró importante determinar si el factor de disociación en reticulocitos era idéntico o no a alguno de los factores de iniciación, particularmente a M_3 (con el que había sido identificado en forma tentativa por algunos autores (224)). En estudios preliminares se había encontrado esa actividad en la fracción M_{2A} (222). Sin embargo, una mayor purificación (cromatografía en columnas de fosfocelulosa, DEAE-celulosa e hidroxapatita), permitió establecer la falta de identificación del factor de disociación con los factores conocidos, a quienes no podía reemplazar en ensayos de síntesis de polifenilalanina (187).

Las características de este factor de disociación serán discutidas más adelante. Su posible relación con las preparaciones de factores de iniciación de reticulocitos aislados en otros laboratorios (191; 193-195), no han sido establecidas aún.

I.5.3 Pasos en el proceso de iniciación:

El mecanismo que lleva a la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes es, a grandes rasgos, semejante al observado en bacterias. Uno de los primeros intermediarios de la iniciación es, aparentemente, el complejo 40S-mRNA-tRNA iniciador, al que se uniría luego la subunidad ribosómica de 60 S, para dar el complejo de iniciación 80 S.

La interacción del mRNA con la subunidad 40 S ha sido demostrada por Heywood (196-197), usando mRNA de miosina purificado de músculo esquelético de embrión de pollo. Esa unión, que ocurría en presencia de GTP, tRNA y factores de iniciación, era previa al agregado de la subunidad 60 S. El factor EF_3 , que promovía esa unión, lo hacía también en presencia de GMPPCP (198-200) y era capaz, además, de discriminar entre los mensajeros de miosina.

y hemoglobina. La unión del mRNA a ribosomas era promovida, junto con EF_3 , por el factor EF_1 .

Que las partículas subribosómicas son precursoras directas de las unidades ribosómicas en polisomas surge de experimentos con células HeLa (225) que demostraban que las subpartículas entraban a los polisomas antes de combinarse para formar monómeros. Se hicieron observaciones similares en células de tumor ascítico (226). En base a ellas Hogan y Korner propusieron que las subpartículas estaban directamente involucradas en la formación y ruptura de los polisomas, siendo los ribosomas 80S sólo un reservorio de subunidades. En levaduras (227) se demostró, por experimentos de transferencia a medio de cultivo con isótopos pesados, que los ribosomas sufren un intercambio de subunidades durante el crecimiento.

En reticulocitos de conejo se observó la estimulación de la iniciación por el agregado de partículas subribosómicas (3). Durante la incubación en el sistema celular había una disminución de las subpartículas que llevaba a una pérdida paralela de la capacidad de los ribosomas de iniciar cadenas peptídicas.

Hertz y McCarty (228) observaron que, en incubaciones de lisados de reticulocitos en presencia de NaF 10mM, podían aislarse complejos de polisomas que consistían en subunidades ribosómicas 40S unidas a mono, di, tri y tetrasomas; estos complejos representaban intermediarios en la síntesis de proteínas y correspondían a complejos 40S-mRNA (el NaF inhibe específicamente la unión de la subpartícula 60S). En células enteras incubadas en ausencia de NaF fué posible observar también, aunque en pequeñas cantidades, estas estructuras transitorias, visualizadas por picos intermedios en el perfil de absorbancia de los polisomas; las mismas son muy lábiles.

El reconocimiento del mRNA por la subunidad 40S tiene lugar en presencia de NaF, pero es bloqueado por ácido aurintricarboxílico (ATA) (229) que como se sabe, inhibe específicamente la unión del mRNA a los ribosomas (104; 230). Esto permitió resolver el proceso de la iniciación en dos pasos: a) la unión de 40S a los polisomas, que tiene lugar en presencia de NaF pero es bloqueada por ATA; y b) el agregado de la subunidad 60S para dar el complejo de iniciación 80S, que es inhibido por NaF.

En conejos expuestos a fosfato-³²P por un corto lapso (2h), la mayor parte de la marca radiactiva se encontró asociada a las subpartículas ribosómicas de 40S (231). El análisis en gradientes de sacarosa del contenido de RNA de esas partículas indicó que la marcación correspondía casi exclusivamente a mRNA (95). Por exposiciones más prolongadas (24h), se evidenció que había RNA ribosómico (18S, mRNA y tRNA asociado a 40S).

Le bleu y col. (232) con mRNA de globina purificado (aislado de polisomas como ribonucleoproteínas, por tratamiento con EDTA) confirmaron que hay una unión selectiva a 40S de reticulocitos, y que el ATA actúa como inhibidor.

En sistemas heterólogos se ha observado también la incorporación de subunidades ribosómicas de 40S a polisomas. En efecto, con 40S-³H de hígado de rata, se pudo observar, por análisis en gradiente de sacarosa, que en un lisado crudo (1:2) de reticulocitos había incorporación de las partículas heterólogas a polisomas. Esta unión era dependiente de energía (ATP - GTP), sistema generador de energía (PEP-PK) y de la temperatura, y era inhibida por ATA (233).

Crystal y col. (181) observaron, en gradientes de sacarosa, la formación de un complejo ³⁵S-Met-tRNA_f-40S-mRNA, por incubación, en un sistema acelular de reticulocitos de conejo, de ribosomas lavados con KCl 0,5 M (que conservan su mRNA endógeno), extracto ribosómico crudo y GTP, en presencia de tRNA iniciador; en una incubación similar en que se agregó además Val-tRNA y factor de elongación T₁, pudo observarse la presencia del dipéptido: ³⁵S-Met-Val en la región polisómica (el Met-tRNA_f unido no puede formar la primer unión peptídica si no está presente M₃) (181;185). Se requiere la hidrólisis de GTP para la formación de la primera unión peptídica (182). La reacción es inhibida por ácido fusídico (182). En presencia de ambas subunidades la unión del tRNA iniciador ocurre predominantemente en la región de 80S. Se requieren ambas subpartículas para la síntesis de los dipéptidos N-terminales Met-puromicina y Met-Val (181).

En el sistema acelular de embrión de trigo (214), al incubarse con mRNA de virus satélite de la necrosis del tabaco, subunidades derivadas y factores de iniciación C y D, en presencia de GTP y ATP, pudo aislarse, en gradientes de densidad de sacarosa, el complejo Met-tRNA_f-40S-mRNA, que sedimenta aproximadamente a 50S. Si se agregan subunidades 60S hay un desplazamiento de la marcación hacia la zona de monómeros. El GTP puede ser sustituido por GMPPCP (214). El sistema puede ser programado con otros virus de plantas. El ATA inhibe la formación del complejo 40S; el KF la del complejo 80S.

Burgess y Mach (234) observaron la formación de un complejo de iniciación específico para Met-tRNA_f, con 40S aislados de plasmocitoma de ratón. Ese complejo, formado a bajas concentraciones de Mg⁺⁺, requiere GTP, factores de iniciación y el triplete AUG y es detectado sobre filtros de membrana. El agregado de subunidades 60S no estimula esta unión.

En general los requerimientos para la unión de Met-tRNA_f en el sistema de mamíferos parece ser semejante a los del sistema bacteriano, excepto

te por la ausencia de formilación del Met-tRNA.

En sistemas acelulares de insecto (207) se observó que la formación del complejo de iniciación $40S-AUG(U)_n-Met-tRNA_1$ requiere factor I_2 y GTP (se mide por retención en membranas de nitrocelulosa), pero no hay prácticamente hidrólisis de GTP-gamma ^{32}P . Al agregar subunidad 60S se forma el complejo de iniciación 80S, paso en que sí hay hidrólisis de GTP.

La capacidad de los lisados no fraccionados de reticulocitos de formar complejos de iniciación $^3H-Met-tRNA-40S-mRNA$ (visualizados en gradientes de densidad de sacarosa), desaparece por agotamiento del mismo por incubación prolongada. La pérdida concomitante de la actividad iniciadora y de la capacidad de formar complejos de iniciación, sugieren que el factor de iniciación lábil del sobrenadante (217) podría intervenir en la formación de dichos complejos.

La fracción soluble cruda de hígado de rata (210) promovía la unión de Phe-tRNA a 40S, dirigida por poli-U, a baja concentración de Mg^{++} , unión que requería GTP. Esta fracción catalizaba además la reasociación de las subpartículas ribosómicas, dependiente de poli-U y Phe-tRNA, en condiciones en que no ocurría espontáneamente (211) (en buffer con reasociación inhibida; Tris 10mM, $MgCl_2$ 3,5mM, KCl 120mM y mercaptoetanol 10mM). El factor que promovía la unión de Phe-tRNA aislado y purificado considerablemente, no requería GTP, pero sí poli-U (212); en contraste con los resultados preliminares con la fracción cruda (210). Esta unión era parcialmente inhibida por la subpartícula 60S (212). Este factor promovía también la unión a 40S de f-Met-tRNA_f y de N-acetil-Phe-tRNA, en presencia de poli-U.

El factor de iniciación del sobrenadante de Artemia salina que promovía la unión a 40S de f-Met-tRNA_f de E.coli, dirigida por AUG, a baja concentración de Mg^{++} (218), tampoco requería GTP. La reacción es inhibida por ATA y por edeína y NEM.

En el extracto ribosómico de reticulocitos de conejo, Gupta y col. (192-195) aislaron un factor (IF_1) que unía específicamente Met-tRNA_f en presencia de GTP, dando un complejo que era retenido por membranas de nitrocelulosa (a semejanza del factor IF_2 de E.coli (92; 109-a)). Este complejo ternario, que parece ser un paso esencial para la transferencia de metionina de Met-tRNA_f a la posición N-terminal de los péptidos sintetizados, fué obtenido también por Dettman y Stanley (235). La eficiencia de transferencia de metionina catalizada por IF_1 en respuesta a poli AUG es de 3 a 4 veces mayor que en respuesta a poli-UG (194). La unión a IF_1 es específica para el tRNA iniciador, e inhibida por la presencia de ribosomas (195) y por bajos niveles (60 micromolar) de ATA (235). En cambio es insensible a NaF (1 a 10mM) o

pactamicina ($1,8 \times 10^{-6}$ M a $1,8 \times 10^{-4}$ M). Los otros dos factores aislados (IF_2 e IF_3) actúan sinérgicamente con IF_1).

Levin y col. (201-204) habían encontrado que un factor proteico del denominado extracto ribosómico (con KCl 1M) de células L, formaba un complejo ternario específico con Met-tRNA_f de hígado de rata y GTP, independiente de mRNA y ribosomas, que es retenido por membranas de nitrocelulosa (semejante al complejo observado en reticulocitos de conejo (192; 235)).

Esos mismos autores observaron que la unión del complejo ternario, que parece ser un "transportador" de tRNA iniciador, precede a la incorporación del mRNA (203-204). En efecto, este complejo factor-Met-tRNA_f-GTP, es capaz de unirse a la subunidad 40S en presencia de GTP y de las otras fracciones aisladas del extracto ribosómico por pasaje a través de DEAE-celulosa (se usaron subunidades ribosómicas lavadas con KCl); se forma así un complejo que, por la subsecuente asociación con 60S lleva a la formación de un complejo 80S. Este complejo es funcional, como lo demuestra su capacidad de sintetizar el dipéptido Met-puromicina en presencia de este antibiótico.

El factor L_3 era el que promovía la formación del complejo ternario. Este se formaba por unión a Met-tRNA, tanto en presencia de GTP como de GMPPCP (204).

El factor L_2 funcionaba como factor requerido para la inserción del RNA mensajero. L_1 aumentaba considerablemente la formación del complejo 80S, en presencia de L_2 y L_3 ; este complejo requería GTP, que no podía, en este caso, ser sustituido por sus análogos (beta o gamma metilén-GTP).

El factor que forma el complejo ternario fué luego identificado como factor IFL_3 (204). La reacción de unión de mRNA de reovirus, estimulada por la presencia de IFL_2 , lleva a la formación del complejo 40S-Met-tRNA_f-mRNA, al que se asocia la subunidad 60S. Se requiere GTP en todos los pasos pero, salvo en el último, éste puede ser sustituido por GMPPCP. Puede aceptarse que, en términos generales, son esos los pasos que llevan a la obtención de un complejo de iniciación 80S listo para comenzar la etapa de elongación.

En abierta divergencia con los resultados precedentes, que enfatizan la participación del mRNA en la constitución del complejo de la partícula 40S con Met-tRNA_f, estudios recientes sugieren que la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes a diferencia del mecanismo generalmente aceptado en bacterias, ocurriría por unión del Met-tRNA_f iniciador a la subunidad ribosómica 40S, independientemente del mRNA. Se sugirió que este complejo sin mRNA (40S-Met-tRNA_f), promovido por factores de iniciación de mamíferos, era el primer intermediario natural de la iniciación. Este modelo supone que es el tRNA iniciador el que dirige la unión y correcta puesta en fase del mRNA,

y no a la inversa.

Schreier y Staehelin (191), en efecto, aislaron cuatro factores de iniciación en extractos ribosómicos de reticulocitos: IF-E_{1,2,3} y 4 y observaron que, con IF-E₂ y IF-E₃, la unión de (³H)-Met-tRNA_f a 40S, detectada por análisis en gradientes de sacarosa, era igualmente eficiente en presencia o en ausencia de mRNA natural. Como IF-E₂ es capaz de formar un complejo, GTP dependiente, con el tRNA iniciador, que no requiere ribosomas ni mRNA, se presume que la unión a 40S del Met-tRNA_f, promovida por IF-E₃ según se demostró, se haría probablemente con este tRNA complejado con IF-E₂ y GTP. En presencia de mensajeros artificiales (poli AUG) se requiere solo IF-E₂ para la unión de Met-tRNA_f a 40S, GTP dependiente. La unión de la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S requiere un factor adicional: IF-E₄.

Las partículas 40S que no tienen Met-tRNA unido sedimentan a aproximadamente 48S, lo que es compatible con una subunidad 40S complejada con el factor IF-E₃ (que es bastante grande: aproximadamente 15 a 17S). Esto sugiere que el factor se combinaría inicialmente a la subunidad ribosómica pequeña para dirigir la unión del tRNA iniciador. Luego IF-E₃ se disociaría del complejo de iniciación, cumpliendo un funcionamiento cíclico (191).

Este modelo de iniciación concuerda con las conclusiones de Darnbrough y col. (236-237), quienes observaron que, en un lisado crudo de reticulocitos, existía una asociación específica de Met-tRNA_f con una alta proporción de 40S nativas, que llevaba a la formación de complejos estables a la centrifugación en medios con baja concentración de Mg⁺⁺. Esos complejos no tenían mRNA y desaparecían cuando se inhibía la iniciación (237-238), ya sea con RNA de doble cadena (239-240), con glutatión oxidado (241), o por ausencia de hemina (242).

El complejo 40S-³⁵S-Met-tRNA podía convertirse en complejo de iniciación 80S-³⁵S-Met-tRNA por agregado, al lisado incubado con esparsomicina, de mRNA como RNA de globina purificado (RNA 9S de reticulocitos) o como mRNA endógeno de lisado de reticulocitos. También se observó con el trinucleótido AUG (243). El ATA inhibía la formación del complejo de iniciación 80S mRNA-dependiente, pero no tenía efecto sobre la formación del complejo 40S-Met-tRNA_f. Este último complejo era utilizado preferentemente en la iniciación, en lugar del Met-tRNA_f libre. En el complejo 40S hay intercambio entre el Met-tRNA_f unido y el de citoplasma; en el complejo 80S no existe este intercambio.

Los resultados experimentales, que indican la existencia de un intermediario obligatorio 40S-Met-tRNA, no deben considerarse necesariamente en conflicto con la idea de que el mRNA estimula la unión de Met-tRNA_f a 40S. Esa estimulación podría ser explicada si se considera que los factores

necesarios para formar el complejo 40S-Met-tRNA podrían liberarse para reciclar solo cuando se une el mRNA. Otra posible explicación sería que esa estimulación se produce como consecuencia de una relativa inestabilidad del complejo 40S-Met-tRNA con respecto al complejo 40S-mRNA-Met-tRNA, en las condiciones usadas.

Según hemos visto, Darnbrough y col. (236-237) habían observado la unión de S^{35} -Met-tRNA a 40S aislados por gel-filtración en Sepharosa 6B, en ausencia de mRNA. Otros autores, que obtuvieron resultados semejantes usando ribosomas crudos o lavados con sales (181;185;243), han considerado, tácita o abiertamente, que el mRNA participaba en esos complejos; sin embargo se ha demostrado la posibilidad de que se formen complejos de mRNA independientes cuando se usan ribosomas no fraccionados (237).

I.5.4.1 Sitio de unión del Met-tRNA_f al ribosoma: La unión del tRNA iniciador a

la subunidad ribosómica de 40S ocurre en un sitio que puede denominarse sitio I (iniciador) (244). El hecho de que el sitio P (peptidil) resulte de la asociación de la subunidad 60S al complejo 40S sugiere que es generado por componentes de cada una de las dos subunidades. Uno de los componentes sería evidentemente el sitio I sobre 40S, ya que, como se deduce de su reactividad con puromicina, la molécula de aminoacil-tRNA iniciador unida a esta subunidad, aparece directamente en el sitio P del ribosoma 80S (244-245).

La afinidad de varias especies de tRNA deacilado por el sitio P del ribosoma 80S fué observada por distintos autores, en ribosomas de reticulocitos de conejo (con tRNA^{Phe} (161) y tRNA_f^{Met} (246), hígado de rata (245) (tRNA^{Met}) células L (247) (tRNA_f^{Met} y m, tRNA^{Phe} y tRNA no fraccionado) o embriones de Artemia salina (244) (tRNA_f^{Met} de E.coli, tRNA^{Val}, tRNA^{Tyr} de levadura, tRNA^{Arg} y tRNA no fraccionado de E.coli o Artemia salina). Esa unión parece ser debida a una gran afinidad intrínseca de ese sitio, P, por tales tRNAs. Se sugirió que el tRNA deacilado puede tener una función regulatoria sobre la iniciación, interfiriendo la unión del Met-tRNA_f^{Met} al sitio P.

En ausencia de factores proteicos exógenos, las subunidades ribosómicas de 40S de hígado de rata (obtenidas por disociación de los ribosomas con KCl 0,88 M (248)) unen Met-tRNA_i en mayor proporción que Met-tRNA_m, en soluciones con concentraciones relativamente altas de Mg⁺⁺ (245). Si se agregan subunidades 60S al complejo ya formado, se obtienen complejos 80S en que el Met-tRNA_i es capaz de reaccionar con puromicina, en una reacción no afectada por el agregado de factores de elongación y GTP, indicando que el sitio de unión es el sitio P.

En experimentos de unión no enzimática semejantes a los anteriores,

con ribosomas de embreión de trigo y de *E. coli* (249); se observó también esa marcada afinidad para la unión preferencial del Met-tRNA_i (iniciador) en presencia de AUG.

Aunque se considera que la discriminación entre las moléculas de tRNA^{Met} que se usan para la iniciación y las que se usan para codones internos ocurre a nivel de los factores de iniciación, estos resultados sugieren que las partículas ribosómicas en sí, tienen cierta capacidad para participar en la reacción de reconocimiento, confiriendo un grado de especificidad a la unión del tRNA iniciador.

I.6 La actividad disociante en eucariotas:

Como resultado de estudios que forman parte de esta tesis y que aquí se describen "in extenso", en 1970 y 1971 hemos comunicado (329 a-b), que el extracto ribosómico de reticulocitos posee una actividad disociante de ribosomas 80S dependiente de ATP.

Simultáneamente, J. Pébre (250) extrajo por lavado con NH₄ Cl, en presencia de Mg⁺⁺, la fracción ribosómica de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida en partículas subribosómicas nativas, y obtuvo un factor proteico capaz de disociar los respectivos ribosomas citoplasmáticos en subpartículas 40S y 60S.

Posteriormente Lawford y col (251) describieron un factor de disociación extraído con KCl de la fracción ribosómica de hígado de rata. Este factor actuaba sobre ribosomas exentos de mRNA y de cadenas peptídicas crecientes. Los ribosomas utilizados como sustrato eran obtenidos por disociación de polisomas en presencia de puromicina y altas concentraciones de KCl y posterior reasociación de las subpartículas así obtenidas por disminución de la fuerza iónica (9). Un factor F₃ purificado, preparado de células de tumor ascítico (252), también tuvo actividad disociante sobre los ribosomas de hígado.

Los factores de disociación de levadura, de hígado de rata y ascites muestran analogías en sus propiedades y modo de acción, con el factor estudiado en bacterias; la disociación es rápida, es proporcional a la cantidad de factor y es antagonizada por el ión Mg⁺⁺.

En 1972 Lubsen y Davis (222) detectaron, en extractos ribosómicos de reticulocitos de conejo, un factor de disociación capaz de disociar ribosomas libres, a bajas concentraciones de Mg⁺⁺ (0,15-0,3 mM). Estos ribosomas eran monómeros 80S liberados por desarme de los polisomas durante la incubación de células enteras en presencia de NaF 10 mM (253) o de puromicina 75 microgramos/ml. La cinética de la disociación es rápida: se completa en un minuto a 37°C. La reacción es muy sensible a la temperatura, depende de la

concentración de Mg^{++} , (Si se eleva la concentración del ión a 5 mM se revierte la disociación obtenida a concentraciones bajas del mismo) y parece ser estequiométrica más que catalítica.

Este factor de disociación, como los otros estudiados en eucariotes se asemeja, en todos los aspectos estudiados al factor de disociación de *E. coli*. Como este último ha sido identificado con el IF_3 (83-84) se pensó que el factor de disociación de reticulocitos podría también ser uno de los factores de iniciación. Por sus características de elución en columnas de DEAE-celulosa (con KCl 0,2-0,3 M), fué tentativamente identificado por Lubsen y Davis (222) con la fracción M_2 .

Ayuso-Parrilla y col.(343) usaron ribosomas de tumor ascítico de Ehrlich y confirmaron que el extracto ribosómico de reticulocitos (dializado) disocia los ribosomas monómeros, a bajas concentraciones de Mg^{++} (0,35 mM) (222); las subpartículas 40S así producidas estaban asociadas a las mismas cantidades de proteínas no ribosómicas observadas en los dos tipos de subpartículas 40S nativas que ellos habían estudiado (254-256). Véase I.7.

Mizuno y Rabinovitz (224) observaron también una actividad disociante en extractos ribosómicos de reticulocitos de conejo, capaz de disociar ribosomas 80S obtenidos por desagregación de polisomas producida por incubación de lisados en mezclas sin hemina (242;257) o en presencia de butanol 0,1 M (258). Pero identificaron este factor como M_3 ya que ambas actividades se superponían en su elución de DEAE-celulosa con KCl 0,1-0,16 M (184). Estos autores observaron que la reacción de disociación requería una fuente de energía y que era inhibida por el GMPPCP, lo que les hizo suponer que el requerimiento era la energía generada por hidrólisis de GTP.

Posteriormente (187) se purificó el factor de Lubsen y Davis por cromatografía en Sephadex G200, fosfocelulosa, DEAE-celulosa e hidroxapatita, y se encontró que el mismo era incapaz de reemplazar a los factores M_1 - M_2A M_2B ó M_3 , o a los factores de elongación EF-1 y EF-2, en la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U, o en la síntesis de globina dirigida por mRNA endógeno. Ninguno de los factores mencionados, a su vez, evidenciaron actividad disociante. Por lo tanto, el factor de disociación es diferente de cualquiera de los factores de iniciación e elongación conocidos.

Más recientemente se ha encontrado que los reticulocitos contienen los factores de iniciación asociados a las subpartículas nativas (223). Los extractos de cada una de las partículas subribosómicas exhiben una actividad semejante del factor de disociación, en contraste con lo observado en bacterias, en que los factores de iniciación (el de disociación incluido (120)),

están asociados solo con la partícula subribosómica pequeña(56;60). Esto confirma resultados anteriores de los mismos autores (222) y señala la existencia de por lo menos dos factores disociantes, concurrentes; la actividad disociante se ha observado también en extractos ribosomales de vegetales. Williams y col. (259), con extracto de ribosomas de porotos (extraídos de las hojas), obtuvieron la disociación de ribosomas monómeros en partículas subribosómicas. La fracción activa se mostró heterogénea en cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

I.7 Ciclo ribosómico en eucariotes:

Hemos ya mencionado, al describir la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes, el cúmulo de evidencias que demostraron que las partículas subribosómicas nativas eran las precursoras de las unidades activas en la síntesis de proteínas, sobre los polisomas. (3; 197; 225-226; 232; 260-264)

Esto llevó a descartar el modelo original de ciclo polisómico (117; 265) que postulaba que los ribosomas, liberados como monómeros luego de terminar la síntesis de proteínas sobre los polisomas, se unían nuevamente al mRNA, sin disociarse, e iniciaban la síntesis de una nueva cadena polipeptídica.

Además, la falta de equilibrio de los ribosomas monómeros con partículas subribosómicas o polisomas en sistemas acelulares de reticulocitos (242-c; 264) y de tumor ascítico de Ehrlich (226;254), implica que la mayoría de los ribosomas 80S son relativamente inactivos y que no están directamente involucrados en el ciclo polisómico.

Los resultados obtenidos en estudios sobre el flujo de subpartículas ribosómicas recién sintetizadas (marcadas con isótopos radiactivos), a polisomas, en células intactas (225-226; 260; 263) y de la velocidad de marcación de las distintas partículas ribosómicas en animales inyectados con ácido orótico radioactivo (266) llevaron a idénticas conclusiones.

Sin embargo, en ciertas condiciones, al menos parte de esa población de ribosomas 80S libres es utilizada para la reformación de polisomas (267). En efecto, los monómeros pueden ingresar lentamente al ciclo, como lo indica su eventual equilibrio isotópico con polisomas y el hecho de que los monómeros generados y acumulados por diversos tratamientos, como incubación en medios carenciados (falta de glucosa o de aminoácidos esenciales (268)), presencia de ciertos inhibidores (NAF (269)) o aumento de la temperatura (270), pueden ser reincorporados a polisomas cuando se revierten estas condiciones.

De lo que antecede emerge la imagen de un proceso en el cual los ribosomas, liberados al terminar las cadenas peptídicas, son generalmente convertidos en partículas subribosómicas (o se liberan como tales) y continúan

el ciclo reiniciando la síntesis de nuevas cadenas y que, ocasionalmente, divergen hacia la formación de monómeros libres, partículas que no tendrían participación activa en el proceso (254; 267; 271).

Es concebible que la falta de equilibrio rápido entre monómeros y polisomas se deba enteramente a condicionamientos espaciales, y que los ribosomas recién liberados de los polisomas reciclen en forma preferencial debido, por ejemplo, a su proximidad con el sitio de iniciación del mRNA (242-c; 262; 264). Sin embargo, la idea más generalmente aceptada es que esa falta de equilibrio se debe a que los monómeros inactivos son formados como producto de una reacción lateral.

Al terminar de leer el mRNA, los ribosomas serían liberados como partículas subribosómicas, que reciclarían o, si está bloqueada la iniciación, se recombinarían para formar monómeros (7b; 254). Esta reacción de recombinación sería la reacción lateral que se mencionó anteriormente. Esta idea está apoyada por los resultados de Falvey y Staehelin en el sistema acelular de hígado de rata e ratón (7). En ese sistema, en condiciones en que no hay iniciación, observaron una rápida incorporación de subpartículas ribosómicas exógenas en monómeros, durante el proceso de terminación, lo que demostraba que esas subpartículas agregadas compiten con las endógenas en la reacción de recombinación. Esto fué confirmado en el sistema acelular crudo de reticulocitos (utilizando ATA para inhibir la iniciación (104; 230)) con 40S-¹⁴C aisladas de células de tumor ascítico de Ehrlich (254) y en el sistema fraccionado de tumor ascítico (polisomas y 40S de tumor ascítico y factores solubles de reticulocitos), en el que no hay iniciación (254).

Se observó, sin embargo, que no toda la incorporación de subpartículas ribosómicas a monómeros en estos sistemas depende del proceso de terminación. En efecto, a 0° ó a 37° después que este proceso ya no es detectable (15 min.), existe una incorporación que representa presumiblemente un intercambio directo entre las partículas subribosómicas libres y las subunidades intrarribosómicas de los ribosomas monómeros: intercambio post-terminación (7b; 254)

La existencia de ese intercambio directo hizo concebir una nueva posibilidad ya que no puede excluirse la idea de que partículas liberadas durante el proceso de terminación sean monómeros de un tipo especial (una minoría con respecto al total y que no estarían en equilibrio con el resto), que se convertiría preferencialmente en partículas subribosómicas nativas y serían capaces de intercambiar rápidamente sus subunidades con las subpartículas ribosómicas libres (254). La liberación de éstos monómeros "especiales" puede,

de todas maneras, integrarse al modelo de ciclo como etapa rápida del proceso de terminación, en que los ribosomas, liberados como monómeros, se separarían enseguida en partículas subribosómicas.

Las partículas subribosómicas nativas de 40S y 60S tienen baja afinidad por la subpartícula complementaria y difieren funcionalmente de las subunidades intrarribosómicas (254). Como intermediarias obligatorias del ciclo ribosómico entre la terminación y la iniciación de cadenas peptídicas, pueden participar en varias vueltas del ciclo sin entrar en el reservorio de monómeros, productos de una reacción lateral (254;264).

Sin embargo, en condiciones en que la utilización de las subpartículas en la iniciación es menor que la velocidad de liberación de las mismas en la terminación, gran cantidad de partículas subribosómicas entran o salen del reservorio de monómeros sin cambios demasiado evidentes en el número de partículas subribosómicas libres (230).

Surge entonces el interrogante sobre qué es lo que determina si las subpartículas liberadas en la terminación se reasociarán inmediatamente con mRNA para reiniciar la síntesis de proteínas o formarán un monómero libre, inactivo en la síntesis, pero que sirve como reserva potencial de subpartículas y qué es lo que controla la cantidad de subpartículas libres.

Existen varias evidencias que sugieren que la asociación de las partículas subribosómicas pequeñas con factores proteicos sería la responsable del bloqueo de la unión de ambas partículas subribosómicas y de promover, por lo tanto, su participación en la iniciación. Así, las partículas subribosómicas que no se combinan directamente para formar monómeros, lo hacen luego de un tratamiento con soluciones salinas concentradas, que elimina factores proteicos de los ribosomas (254). Estos factores son los que se necesitan para la formación de los complejos de iniciación (I.5.2 e I.5.3) y también promueven la disociación de los monómeros o bloquean la unión de las subpartículas (I.6).

En extractos acelulares de hígado de rata hay evidencias que sugieren que parte de las subpartículas 40S nativas contiene más proteínas que las subunidades 40S derivadas de monómeros o polisomas (272). En el sistema acelular de tumor ascítico de Ehrlich (255) se encontró que las partículas 40S que se encuentran libres en el citoplasma, están combinadas, en forma altamente específica, con cantidades detectables de proteínas no ribosómicas, que son intercambiables. La cantidad de proteínas asociadas a las partículas subribosómicas nativas es suficiente para permitir la separación de éstas respecto de las subpartículas derivadas (Obtenidas por disociación de 80S con KCl 0,5M), en base a su densidad boyante (255). En gradientes de densidad de

CsCl aparecen dos bandas heterogéneas de 40S nativas, con densidad 1,49 (40S-H) y 1,40 (40S-L) g/cm^3 respectivamente y una banda de densidad 1,51 g/cm^3 de 40S derivadas.

Iguales diferencias de densidad en CsCl (1,52 y 1,45 g/cm^3 respectivamente), fueron observadas en subpartículas de hígado de rata (272).

Las subpartículas 40S nativas aparecen frecuentemente, en análisis en gradientes de densidad de sacarosa como un pico asimétrico y, a veces, como un doble pico de $A_{260\text{nm}}$ en la región de 40S (255). Esta heterogeneidad de las partículas 40S en gradientes de sacarosa ha sido observada también por Jacobs-Lorena y Baglioni en células HeLa (262-b), pero estos autores no hicieron estudios sobre diferencias en la densidad boyante. La velocidad de entrada de las subpartículas más pesadas, (43S : obtenidas por tratamiento de las células con NaF) en polisomas es mayor que la de las partículas 40S (262-b).

Experimentos realizados en reticulocitos de conejo (242-a) sugieren que existen dos clases de partículas subribosómicas pequeñas: unas activas, que llegan rápidamente a un equilibrio con polisomas marcados, y otras inactivas, que no están en equilibrio.

Zehavi-Willner y Danon (231) observaron también dos formas de subpartículas 40S en reticulocitos de conejo, con densidades boyantes 1,44 y 1,51 g/cm^3 , pero atribuyeron esa diferencia a la formación del complejo 40S-mRNA-proteína-tRNA iniciador, ya que encontraron que partículas 40S nativas marcadas con fosfato- ^{32}P (40 horas) contenían mRNA y tRNA.

Por análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida se encontró (255) que, asociadas a las partículas 40S nativas, hay unas pocas proteínas de alto PM (comparado con el de las proteínas ribosómicas) y parecería que no todas las subpartículas llevan la totalidad de las mismas, lo que es consistente con la heterogeneidad previamente observada con respecto al contenido de proteínas.

El rol fisiológico de estas proteínas accesorias podría ser el de servir de factor de disociación (120; 254; 343), quizás para mantener la funcionalidad de las partículas subribosómicas en el ciclo polisómico, impidiendo que se recombinen cuando se liberan de los polisomas en el proceso de terminación. Otras evidencias indirectas (343) sugieren que estas proteínas podrían ser también factores de iniciación que promueven la formación del complejo de iniciación. En efecto, por tratamiento de las subpartículas 40S nativas con KCl 0,5M, se obtienen partículas sin proteínas asociadas, que se asocian rápidamente con las 60S derivadas; además los extractos ribosómicos crudos de ribosomas de reticulocitos contienen proteínas que se asocian espe-

eficemente a las partículas 40S derivadas y las transforma en subpartículas con proteínas extra en cantidades iguales a las de las dos formas nativas (343). Estas proteínas tienen alta afinidad por las subpartículas 40S (que no depende de co-factores dializables o de un sistema generador de energía). Se observó también que el extracto ribosómico pierde su capacidad de estimular la iniciación cuando se eliminan del mismo las proteínas que se unen a las subpartículas 40S. Además las proteínas asociadas a estas subpartículas les confieren la capacidad de unir mRNA sintético (poli-U). Parecen ser las proteínas unidas a las partículas 40S-L (livianas) las que proporcionan esta aptitud. Para unir aminoacil-tRNA, sin embargo, se requieren factores adicionales (343).

Hirsch y col. (255) observaron que cuando decrece el aporte de energía o de aminoácidos a las células, hay un aumento moderado de la subpartícula 40S con menor cantidad de proteínas (40S-H, densidad $1,49 \text{ g/cm}^3$). Este aumento precede al aumento de monómeros. En base a ello los autores postularon que en las células en crecimiento, la cantidad de monómeros libres es pequeña y existiría un reservorio, también pequeño, de proteínas de 40S-H libres. Si disminuyera la iniciación con respecto a la elongación de cadenas peptídicas, las subpartículas que se generaran en la terminación excederían a la cantidad de factores proteicos accesorios que se liberarían en la iniciación. Aumentaría entonces el número de partículas 40S-H hasta que el reservorio de proteínas se vaciara y recién entonces empezarían a acumularse los monómeros.

Aunque se observó (254) que las subpartículas ribosómicas 60S nativas y derivadas diferían funcionalmente, no se pudieron determinar las bases químicas de esa diferencia. Se especuló sobre la posibilidad de que la fosforilación de una de las proteínas de 60S nativas, observada por Kabat (263-b) (en la partícula 60S intrarribosómica no está fosforilada), fuera la alteración que produciría esa diferencia funcional.

I.8 Discriminación entre distintos mRNAs:

El posible rol de los factores de iniciación en la selección, para su traducción, de ciertos mRNA específicos y, por lo tanto, el control de este proceso, ha sido motivo de controversia en los últimos años.

El control de la expresión del gen a nivel de la traducción del mRNA en secuencias peptídicas, requiere la existencia de un mecanismo que discrimine entre distintos mRNAs, y mediante el cual los ribosomas pueden, en el medio celular, traducir una clase de mensajero en detrimento de otra. Factores de discriminación de éste tipo se han encontrado en *E.coli* (76;86) asociados al IF₃ y se los denominó factores de interferencia (86a).

Para probar la universalidad de ese mecanismo de control, se investigó la presencia de factores semejantes en varias células de mamíferos. Se encontró, sin embargo, que pueden traducirse mRNAs exógenos heterólogos en sistemas acelulares o en células no diferenciadas, "in vivo", sin el agregado de factores de iniciación (Cuadro III) lo que supone una falta de especificidad de los mismos. La posibilidad de intercambiar factores de iniciación entre ciertos sistemas acelulares (Cuadro IV), apoya esta idea. Pero otros resultados, en contraste con los anteriores, sugieren la existencia de factores capaces de seleccionar y de unirse específicamente a los RNA mensajeros (Cuadro V).

En general los sistemas acelulares en que se ensayan los mRNA heterólogos se preincuban para reducir la síntesis endógena y se los hace dependientes de factores de iniciación. Es posible entonces que la traducción del mRNA agregado se deba a que sus propios factores de iniciación específicos han sido inactivados. Sin embargo, ha sido posible traducir mRNAs exógenos en lisados de reticulocitos no preincubados (274 a; 276; 278-279). Una posible explicación en este caso, sería la existencia de una capacidad para competir por los factores de iniciación endógenos. Todo esto lleva a pensar que la especificidad no sería absoluta y apoya la idea de que los mRNA estarían agrupados en clases, cada una de las cuales tendría sus factores específicos (300).

Estos factores discriminatorios de mensajeros fueron propuestos por Heywood en células diferenciadas de eucariotes (198) y descritos en extractos ribosómicos de reticulocitos (301) y sobrenadante postribosomal de células de Krebs ascites (302).

El mecanismo de discriminación entre varios mRNAs por factores de iniciación, parecería basarse en que esas proteínas tienen una gran afinidad por varios mensajeros. Un factor dado promoverá pues la traducción de una clase determinada de mRNAs, y no de un mRNA o de un cistrón específico. Cuando distintos mensajeros compiten por los ribosomas esa actividad discriminatoria se agudiza (288; 301; 305). Este modelo explicaría como podría controlarse la traducción sin necesidad de postular un factor de iniciación para cada RNA mensajero en la célula. El mecanismo no sería así excesivamente restrictivo con respecto a los mensajeros que puede aceptar y traducir correctamente.

CUADRO III

TRADUCCION DE mRNAs EXOGENOS EN SISTEMAS HETEROLOGOS

(sin agregado de factores de iniciación homólogos)

A.-SISTEMAS ACELULARES	mRNA TRADUCIDO
<p>1. Reticulocitos de: a) conejo</p> <p>b) cobayo, con Rb de hígado trucha o raíces de habas</p> <p>c) pato</p> <p>2. Tumor ascítico de Krebs, de ratón</p> <p>3. Hígado de rata a) crudo b) reconstituido (Rb+sobrenadante)</p> <p>4. Cerebro de cobayo</p> <p>5. Trigo</p> <p>6. Células L ratón</p> <p>7. E.coli</p> <p>8. Sarcoma 180 ratón</p>	<ul style="list-style-type: none"> - globina de ratón (273) - beta-globina de reticulocitos de ratón (274) - globina humana (pacientes con anemias hemolíticas:talasemia, anemia falsiforma) (275) - ovalbúmina de oviducto de gallina estimulado por estrógenos (276) - ferritina y otras proteínas de hígado de conejo (277-a) - albúmina de polisomas unidos a membranas de hígado de conejo (277-b). - inmunoglobulina (cadena kappa) de mieloma de ratón (278-a) - cristalina (cadena alfa-A₂ de ternera (279)) - queratina de plumas de embriones de pato (280). - globina de reticulocitos de conejo (281) - cristalina (cadena alfa A₂) de ternera (282) . - globina de reticulocitos de conejo (283-287) - globina de reticulocitos de ratón (288) - inmunoglobulina (kappa) mieloma de ratón (278-b) - cristalino (alfa-A₂) de ternera (289) - globina eritrocitos inmaduros de pato (290) - globina humana (288). - globina de reticulocitos de conejo (291-b) - globina de reticulocitos de conejo (291-a) - globina de reticulocitos de conejo (292-a) - TMV y globina de reticulocitos conejo (293) - proteína de la cápside de reovirus (294) - globina de reticulocitos de conejo (274-a) - mengovirus y RNA total huevos erizo de mar (295).
<p>B.-CELULAS NO DIFERENCIADAS</p>	<p align="center">mRNA TRADUCIDO</p>
<p>1. Oocitos de Xenopus laevis</p>	<ul style="list-style-type: none"> - cristalina de ternera (269-a). -globina de reticulocitos de conejo (296-b y c). - globina de reticulocitos de pato (297).

CUADRO IVFACTORES INTERCAMBIABLES POR DISTINTOS SISTEMAS ACELULARES

FACTOR QUE INTERVIENE EN	SISTEMAS QUE LO INTERCAMBIAN
<p>Iniciación (en especial M_3)</p> <p>Unión de tRNA iniciador a 40S (semejante a IF_2 de E.coli)</p> <p>Formación del complejo F_1-Met-tRNA_f-GTP</p>	<p>Hígado de conejo y reticulocitos de conejo (186).</p> <p>Artemia salina e hígado de rata (212) Artemia salina y fibroblastos de ratón (219)</p> <p>Reticulocitos de conejo y de pollo, hígado de conejo y de pollo y músculo de embrión de pollo (298)</p>

CUADRO V

MRNAs QUE REQUIEREN FACTORES ESPECIFICOS

mRNA de	Requerimiento	Observaciones
<p>miosina de músculo de embrión de pollo</p> <p>globina de reticulocito de conejo</p>	<p>Factores de iniciación de ribosomas de músculo (199; 197; 198), en especial F_{3m} (200)</p> <p>Factores de iniciación de ribosomas de reticulocitos, para traducción en sistema de células de tumor ascítico. (299-300).</p>	<p>Los otros factores F₁ y F₂ de eritroblastos de músculo son igualmente efectivos. El requerimiento es menos estricto a altas concentraciones de mRNA.</p> <p>El extracto ribosómico de ascites puede inactivar al mRNA de globina (299). Los factores de iniciación pueden seleccionar al mRNA-globina en presencia de mRNA viral (300-301) o endógeno (300) (de ascites). La actividad discriminadora fué purificada: I_{Hb}, factor proteico dis-tinto de M₃; podría ser semejante a factores de interferencia de bac-terias. (86-a)</p>
<p>EMC-virus</p> <p>proteínas de hígado de X.laevis adulto</p>	<p>Factor de iniciación del sobrenadante de células de tumor ascítico, Krebs (302).</p> <p>sobrenadante post-ribosomal hígado Xenopus laevis (303).</p>	<p>Es inactivo con mRNA de hemoglobina.</p> <p>Con sobrenadante de hígado de rata no hay iniciación.</p>
<p>Tenebrio (insecto) (pupa o larva)</p> <p>globina humana (palcientes βtalasemia)</p> <p>globina de reticulocitos de pato y de conejo.</p>	<p>Factor de pupa o de larva respectivamente (207).</p> <p>Ultrafiltrado del ER de los reticulocitos (304).</p> <p>Factores de iniciación de reticulocitos conejo, en sistema hígado rata (305).</p>	<p>Los factores sólo reconocen mRNAs de etapas del desarrollo equivalentes.</p> <p>Estimulación específica de producción de cadena beta. La actividad parece debida a un RNA de bajo PM.</p> <p>Los mRNAs agregados sólo se traducen con igual eficiencia; juntos se traduce sólo el de conejo. El requerimiento de factores de iniciación es distinto para traducción de globina de pato y de conejo.</p>

MATERIALES Y METODOS

M.1 Drogas:

ATP, GTP y creatina fosfato (todos ellos sales sódicas) y creatina quinasa (ATP:creatina fosfotransferasa, E.C.2.7.3.2) se obtuvieron de Boehringer-Mannheim; UTP, CTP, ADP, AMP (sales sódicas), de Pabst; AMPPCP y AMPCPP, y poli-U (sal de amonio), de Miles Laboratories; L-aminoácidos, de Mann Research Laboratories; 2-mercaptoetanol y ácido aurintricarboxílico, de Fluka.

Antibióticos: Cicloheximida, esparsomicina y pactamicina fueron obtenidos por cortesía de Upjohn Co., puromicina de Nutricional Biochemicals.

Radioactivos: L-valina-¹⁴C (U) y L-fenilalanina-¹⁴C (U) de Radiochemical Centre, Amersham, o de New England Nuclear Corp.; L-metionina-CH₃-³H de New England Nuclear Corp.; fosfato inorgánico-³²P de alta actividad específica (en solución HCl 0,02M), de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Líquido de centelleo: Tolueno grado analítico FBR, o grado nitración P.A.S.A.; Omnifluor, de New England Nuclear Corp.; Tritón X-100, de Rohm y Haas.

La silicona líquida MS200 era de Midland Silicones. El sulfato de amonio y la sacarosa fueron de grado enzimático, de Mann. Todas las demás drogas fueron de grado analítico. El agua fué bidestilada sobre vidrio.

M.2 Soluciones utilizadas:

Solución A - Solución neutra de fenilhidrazina: clorhidrato de fenilhidrazina 2,5%, pH 7,5 (neutralizada con NaOH), con 2-mercaptoetanol 2,5mM.

Solución B₁- Solución salina isotónica NKM; para suspender y lavar reticulocitos enteros (modificada de Borsook (306)): NaCl 130mM, KCl 5mM y Mg(CH₃-COO)₂ 1,5mM.

B₂- Solución B₁ concentrada cuatro veces (NKM 4x).

Solución C₁- Medio de lisis: Mg(CH₃COO)₂ 1,5mM.

C₂- Medio de lisis: Mg(CH₃COO)₂ 2mM, 2-mercaptoetanol 3mM.

Solución D - Solución para ajustar el medio iónico de lisados: Mg(CH₃COO)₂ 4mM, KCl 250mM y Tris.HCl(pH 7,5) 10mM.

Solución E₁- Medio salino para gradientes: Mg(CH₃COO)₂ 2mM, KCl 70mM y Tris.HCl (pH 7,5) 2mM.

E₂- Como E₁, con 2-mercaptoetanol 3mM.

E₃- Mg(CH₃COO)₂ 1,5mM, KCl 10mM y Tris.HCl(pH 7,5) 10mM.

Solución F - Medio de redisolución de fracciones ribosómicas: Sacarosa 0,15M con 2-mercaptoetanol 3mM.

Solución G - Soluciones para gradientes de sacarosa analíticos:

G₁- Sacarosa 15% en solución E₁.

G₂- Sacarosa 50% en solución E₁.

Soluciones para gradientes de sacarosa preparativos:

G₃- Sacarosa 15% en solución E₂.

G₄- Sacarosa 45% en solución E₂.

G₅- Sacarosa 30% en solución E₂.

Solución H₁- Medio de redisolución de fracciones enzimáticas SA40-70: Tris.HCl (pH 7,5) 100mM, 2-mercaptoetanol 3mM y EDTA sódico 0,1mM.

H₂- Medio de diálisis de fracciones enzimáticas: Tris.HCl(pH 7,5) 20mM, 2-mercaptoetanol 3mM y EDTA sódico 0,1mM.

Solución I - Medio de diálisis de extractos ribosómicos (También se utiliza para equilibrar columnas de Sephadex-G25: KCl 100mM, Tris.HCl(pH 7,5) 2mM y 2-mercaptoetanol 3mM.

Solución J - Medio salino de incubación acelular: Mg(CH₃COO)₂ 2mM, KCl 70mM, Tris.HCl(pH 7,5) 26mM y 2-mercaptoetanol 16mM.

Solución K₁- Medio para tRNA: Tris.HCl(pH 7,5) 100mM, Mg(CH₃COO)₂ 3mM y KCl 24mM,

K₂- Medio para tRNA: Sacarosa 0,9M, Mg(CH₃COO)₂ 4mM, KCl 25mM. Ajustado a pH 6,0.

Solución L₁- Líquido de centelleo: Omnifluor 0,5% P/V en tolueno.

L₂- Líquido de centelleo: Omnifluor 0,5% P/V en mezcla de un volumen de Tritón X-100 y dos volúmenes de tolueno.

Solución M - Pactamicina 0,8mM en ácido acético 1mM, preparada inmediatamente antes de ser usada.

Los antibióticos se disolvieron en agua bidestilada. El pH de la solución de Tris.Hcl fué ajustado a 20°. La mayor parte de las soluciones se conservaron congeladas a -20° y fueron mantenidas en frío durante su descongelamiento.

M.3 Animales:

Se utilizaron conejos jóvenes de raza neocelandesa de 1,8 a 2,5 Kg de peso.

M.4 Tratamiento de los animales:

Se les indujo la reticulocitosis por una modificación del método de Borsook y col (306). Los animales se inyectaron diariamente, durante 5 días consecutivos, con solución A, por vía subcutánea, en dosis de 10mg de fenilhidrazina/Kg de peso. Al 7° día fueron sangrados a blanco por punción cardíaca. Se controló la reticulocitosis contando los elementos teñidos con azul brillante de cresilo, contrastado con May-Grünwald. Los valores obtenidos oscilaban entre 85 y 99%. El volumen de hematocrito oscilaba entre 13 y 20%.

M.5 Obtención de reticulocitos:

En un Erlenmeyer heparinizado (con solución de heparina 400 unidades/ml en solución isotónica B₁) se recibió la sangre, directamente de la aguja de

punción, agitando suavemente para evitar la formación de coágulos. Se filtró por doble capa de gasa, recibiendo en recipiente enfriado en baño de hielo y agua. Se agitó para asegurar una buena aereación y un enfriamiento rápido. Todas las operaciones posteriores se realizaron entre 2° y 4°.

Se centrifugó la sangre durante 5 minutos a 2.000 x g en centrífuga refrigerada (Sorvall modelo RC-2). Luego de separar el plasma por aspiración, se resuspendieron las células en solución isotónica B₁ (volumen igual al del plasma), agitando suavemente para evitar la ruptura de las mismas. Se repitió la centrifugación y se separó, nuevamente por aspiración, el líquido de lavado y también las células blancas, que forman una delgada capa blanquecina sobre las células sedimentadas. Se repitió el lavado una vez más y los reticulocitos así obtenidos fueron lisados, o bien se suspendieron en solución B₁ (1 volumen/volumen de células).

M.6 Preparación de extractos acelulares (lisados):

M.6.1 Lisado 1:1: Se utilizó una modificación del método descrito por Lamfrom y Knopf (307). El lisado de reticulocitos se obtuvo por choque hipotónico: a un volumen de reticulocitos sedimentados se le agregó igual volumen de agua bidestilada, homogeneizando en frío con varilla de vidrio y dejando 15 minutos. El sobrenadante de la centrifugación a 12.000 x g a 2° (Sorvall) durante 20 minutos (libre de células no lisadas, membranas y mitocondrias) constituye el lisado 1:1.

A este lisado se lo usó inmediatamente, o se lo congeló en forma rápida y conservó a -80°.

M.6.2 Lisado 1:1 en sales: Se obtuvo en forma semejante al anterior, pero sustituyendo, para la lisis, el agua bidestilada por solución C₂.

M.6.3 Lisado 1:1 enriquecido en polisomas: La fracción de ribosomas pesados obtenida a partir de un lisado 1:1 en sales (M.6.2) por sedimentación durante 15 minutos a 30.000 rpm a 2°, en tubos de 2,5ml en el rotor 50 de la ultracentrífuga preparativa Spinco (modelo L-2), se suspendieron cuidadosamente en 1/4 de su volumen original, utilizando para ello el sobrenadante de 105.000 x g del mismo lisado (obtenido por centrifugación durante 40 minutos a 50.000 rpm en tubos de 2,5ml en el mismo rotor).

M.6.4 Lisado 1:4: Un volumen de reticulocitos lavados y sedimentados fue lisado en 4 volúmenes de medio de lisis (solución C₁) con agitación suave, en frío, durante 10 minutos. Se mezcló luego un volumen de solución D para ajustar la composición iónica. Luego de centrifugar durante 20 minutos a 12.000 x g a 0° (Sorvall) se decantó cuidadosamente el sobrenadante, que constituye el lisado 1:4. Este se utilizó para preparar ribosomas y fracción soluble (sobrenadante total o en-

zimas 40-70).

M.6.5 Lisado 1:2: Un volumen de reticulocitos se lisó en dos volúmenes de solución C₁ y se agregó 0,25 volúmenes de solución D. El resto de las operaciones se efectuó como en M.6.4.

M.7 Obtención de la fracción ribosómica total:

Se obtuvo esta fracción por ultracentrifugación de los extractos acelulares.

M.7.1 Ribosomas totales-1 (RbT-1): A partir de los lisados 1:1 (M.6.1 ó M.6.2) que se centrifugaron durante 150 minutos a 50.000 rpm en tubos de 2,5 ml del rotor 50 (Spinco) (cuando el volumen era menor de 2,5ml, se completaba con silicona MS200). Se enjuagó cuidadosamente el sedimento con solución F y se disolvió en un pequeño volumen de la misma solución, mezclando suavemente con una varilla. Los restos insolubles fueron descartados por sedimentación durante 10 minutos a 10.000 x g. Este último procedimiento se utilizó también para clarificar las demás preparaciones ribosómicas aquí descritas.

M.7.2 Ribosomas totales-2 (RbT-2): Se obtuvieron por centrifugación del lisado 1:4 (M.6.4) durante 4 horas a 30.000rpm en el rotor 30 (Spinco). El sedimento de ribosomas se redisolvió en un pequeño volumen de solución F (destinado a ser conservado a -80°), o en medio salino (solución E₂) para su fraccionamiento en gradientes preparativos.

El sobrenadante de esta centrifugación es el que se utilizó para la preparación de la fracción enzimática SA40-70.

M.8 Obtención de fracciones ribosómicas nativas purificadas:

El fraccionamiento de la población ribosómica total contenida en los extractos acelulares se realizó en base a las distintas velocidades de sedimentación que tienen los diversos tipos de partículas ribosómicas nativas (polisomas, monómeros 80S y subpartículas 40S y 60S).

Los ribosomas totales RbT-2 (M.7.2), obtenidos de los extractos de reticulocitos normales y redisueltos en solución E₂, se centrifugaron en gradientes de densidad preparativos de sacarosa 15-45% (M.22 y M.22.2)

Se fraccionaron los gradientes por lectura de la absorbancia a 254nm (M.22.3) y se seleccionaron por sus picos de absorbancia las fracciones correspondientes a las subpartículas 40S y 60S y los ribosomas monómeros 80S. Estas fracciones se sedimentaron durante 4 horas a 50.000 rpm a 2° en el rotor 50 (Spinco), se disolvieron en la solución F, y se conservaron a -80°.

Los polisomas purificados, que se acumulan en el fondo del tubo del gradiente preparativo, se redisolviéron también en solución F y se conservaron en iguales condiciones.

En la Figura 1, cuadros A₁ y A₂, se muestran respectivamente el diagrama de un fraccionamiento de ribosomas totales, y el análisis de los monómeros 80S nativos obtenidos.

M.9 Obtención de partículas ribosómicas nativas marcadas con ³²P:

La población de ribosomas nativos se marcó "in vivo" inyectando a cada conejo anémico, por vía intradérmica, 48 horas antes de sacrificarlos, 10 mCi de fosfato inorgánico-³²P en solución B₁ (neutra). En las condiciones fisiológicas de estos conejos, las células eritroides (precursoras de los reticulocitos), están sintetizando activamente ribosomas. Luego de ese prolongado lapso de marcación (48 horas) muchas células eritroides marcadas en la médula ósea han sido volcadas al torrente sanguíneo. En esas circunstancias, en las células circulantes aproximadamente 99% de la radioactividad de ³²P de la fracción ribosómica se encuentra en forma de RNA ribosómico-³²P (263).

Los reticulocitos-³²P aislados de la sangre obtenida por punción cardíaca, fueron lavados dos veces en solución B₁ e incubados en medio para incubación de células enteras (M.16), durante 15 minutos a 37°; luego se lavaron con solución B₁ y se lisaron (lisado 1:2, M.6.5).

El extracto acelular se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 x g (Sorvall) y luego se fraccionaron los ribosomas del lisado en el rotor 30 (Spinco), centrifugando 12,5ml del lisado sobre gradientes (20ml) de sacarosa 15-30% en solución E₂ (M.22.2), durante 3 horas a 30.000 rpm. Se separaron los ribosomas pesados sedimentados; el contenido líquido de los tubos, que tenía aún disuelta la fracción ribosómica liviana RbL-³²P, se dializó contra solución E₂ (tres cambios, 8 litros totales), durante 1 hora y se sedimentó por centrifugación durante 6 horas a 30.000 rpm (rotor 30, Spinco).

La fracción RbL-³²P, disuelta en solución E₂, se fraccionó en un gradiente lineal preparativo de sacarosa 15-45% (M.22.2 y M.22.3) y se recogieron las fracciones correspondientes a los componentes 40S, 40+60S, 60S y 80S (Figura 2, I-fracciones A, B, C y D respectivamente). Estas fracciones se sedimentaron 4 horas a 50.000 rpm en el rotor 50, se disolvieron en solución F y fueron conservadas a -80°. De cada una se leyó la A_{260nm} y se midió en el contador proporcional la radioactividad de ³²P en el precipitado de ácido tricloroacético 7,5%. Las radioactividades específicas de las fracciones ³²P obtenidas fueron:
40S: 11,45 x 10⁴ cpm/mg; 60S 10,18 x 10⁴ cpm/mg; 40+60S: 13,28 x 10⁴ cpm/mg;
80S: 6,46 x 10⁴ cpm/mg.

Estas fracciones fueron analizadas en gradientes analíticos de sacarosa 15-50% (Figura 2; Cuadros A a D). No se hizo una purificación posterior de las mismas para evitar nuevas manipulaciones y preservar en lo posible su carac-

terfética de partículas nativas.

M.10 Obtención de ribosomas agotados:

M.10.1 Ribosomas totales agotados. RbT-ag: Los ribosomas totales (M.7.1. ó M.7.2) fueron incubados (3 a 5 mg/ml) en un sistema acelular con componentes solubles definidos (M.19) durante 90 minutos a 37°, período en el que el sistema agotaba su capacidad de síntesis de proteínas; luego de enfriar y completar el volumen con solución E₂, los ribosomas agotados fueron sedimentados durante 120 minutos a 50.000 rpm en el rotor 50 (Spinco) y se redisolviéron en un pequeño volumen de solución E₂. Esta preparación contiene un gran predominio de monómeros 80S y una pequeña proporción de subpartículas 40S y 60S.

M.10.2 Ribosomas 80S agotados, a partir de ribosomas totales. 80Sag-A: Los ribosomas totales agotados RbT-ag (M.10.1) fueron fraccionados en un gradiente preparativo (M.22.2 y M.22.3). La fracción correspondiente al pico de A_{254nm} de 80S, se sedimentó durante 4 horas a 50.000 rpm (rotor 50) y se redisolvió en solución F. Esta preparación contiene monómeros 80S con una muy pequeña impurificación de subpartículas 60S.

M.10.3 Ribosomas 80S agotados, a partir de polisomas. 80Sag-B: Se obtuvieron en igual forma que los anteriores, pero a partir de polisomas purificados (M.8), incubados durante 90 minutos a 37° en el sistema acelular con componentes solubles definidos. En la Figura 1, cuadro B₁, se muestra el fraccionamiento en el gradiente preparativo, y, en el cuadro B₂, el análisis en gradiente de los ribosomas 80S agotados resultantes, en el que se observa una pequeña contaminación de subpartículas 60S, y de agregados pesados.

M.11 Obtención de ribosomas 80S de células incubadas con NaF. 80S-F:

Se incubaron reticulocitos enteros en un medio de incubación para células enteras, con NaF 10mM, durante 60 minutos a 37°. Se lavaron los reticulocitos cinco veces en frío con solución B₁, para eliminar el ión fluoruro, se lisaron (lisado 1:4; M.6.4) y se aislaron los ribosomas sin fraccionar por el mismo procedimiento que para la fracción ribosómica total RbT-2 (M.7.2). Esta preparación está constituida casi exclusivamente por monómeros 80S, con muy poca contaminación de partículas subribosómicas y polisomas (Figura 1, cuadro C).

M.12 Obtención de ribosomas 80S reasociados. 80S-R:

Se obtuvieron según una modificación del método de Falvey y Staehelin (7), utilizando polisomas purificados (M.8) que fueron incubados 90 minutos a 37°, en el sistema acelular con componentes solubles definidos (M.19)

~~66~~

y en el mismo medio de incubación se aumentó la concentración de KCl a 0,5M, dejándose durante 15 minutos a 0°. Esto provocó la disociación de los ribosomas a subunidades. Las mismas se reasociaron por dilución con solución de $Mg(CH_3COO)_2$ 2mM, Tris.HCl(pH 7,5) 2mM y 2-mercaptoetanol 3mM, hasta alcanzar la concentración final de K^+ 60mM. Los ribosomas 80S-R se aislaron sedimentándolos durante 4 horas a 50.000 rpm en el rotor 50 (Spinco), y redisolviéndolos en solución F. La preparación contenía una pequeña proporción de subpartículas (Figura 1, cuadro D).

M.13 Preparación de la fracción enzimática SA40-70:

Se obtuvo a partir de sobrenadante postribosómico resultante de la preparación de AbT-2 (M.7.2), por una modificación del método de Allen y Schweet (308). Todas las operaciones se llevaron a cabo a 0°-4°. Se agregó al sobrenadante, lentamente y con agitación, sulfato de amonio en polvo fino, hasta 40% de saturación (22 g/100ml). Una vez disuelto se dejó 30 minutos. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 12.000 x g (Sorvall) se descartó el precipitado formado y se ajustó el pH del sobrenadante a 6,5 con ácido acético 1M. Se agregó sulfato de amonio en polvo hasta 70% de saturación (18,2 g/100ml), se dejó 30 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 x g, descartándose el sobrenadante.

Se redisolvió el precipitado en solución H_1 (mitad del volumen original de sobrenadante) y se ajustó a pH 6,5 con ácido acético 1M. Se llevó nuevamente a 70% de saturación con sulfato de amonio en polvo (43,6 g/100ml de solución $H_1 + CH_3COOH$), se dejó 30 minutos y se separó el precipitado por centrifugación (15 minutos a 12.000 x g). Este se suspendió en un pequeño volumen de solución H_1 y se dializó durante 15 a 18 horas contra tres cambios de solución H_2 . La fracción enzimática dializada se clarificaba por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 x g. Se usó fresca o se conservó en pequeñas porciones, congelada a -80°. Se descongeló sólo una vez antes de ser utilizada, ya que pierde actividad por descongelamientos sucesivos.

M.14 Preparación de tRNA de hígado de conejo:

Se efectuó según una modificación del método de Mosteller y col (309). Las operaciones se realizaron a 0°-4°, excepto donde se indica otra temperatura.

Se dejaron dos conejos en ayunas durante 24 horas, luego de lo cual se los sacrificó y se les extrajo rápidamente los hígados, que se recibieron sobre agua helada. Luego de secarlos y pesarlos (300g) se los cortó en pequeños trozos y se los homogeneizó en 800ml de medio de homogeneización (solución K_1), en licuadora, se filtró por gasa triole y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 x g y 15 minutos a 30.000 rpm, en el rotor 30 (Spinco). El sobrenadante, filtrado por gasa para eliminar la capa de lípidos, se ajustó a pH 5,0 con ácido acético

1M, se le agregó bentonita lavada (concentración final 5 g/l) y se centrifugó durante 20 minutos a 8.000 x g (Sorvall). El precipitado, suspendido en aproximadamente 200 ml de solución K_2 , se centrifugó durante 20 minutos a 8.000 x g. Se redisolvió el precipitado en Tris.HCl (pH 7,5) 0,1M (1,0 ml/g de hígado) y se homogeneizó en un homogenizador de Potter. Se agregó luego dodecilsulfato de sodio a concentración final 1% y se extrajo con un volumen de fenol:H₂O 90% (recientemente destilado), por agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se separó las dos fases por centrifugación. Se lavó la capa fenólica con agua bidestilada. Las capas acuosas reunidas se reextrajeron con fenol por agitación durante 20 minutos y centrifugación. Se agregó a la capa acuosa un décimo de su volumen de acetato de potasio 1,0M pH 5,0 y se precipitó el RNA con etanol de 96° (dos volúmenes), a -20° durante 12 horas. Se centrifugó y el precipitado resultante se extrajo tres veces con NaCl 1M (10 ml cada vez) mediante resuspensiones y centrifugaciones repetidas. A los sobrenadantes reunidos se les agregó un décimo de su volumen de acetato de potasio 1M pH 5 y dos volúmenes de etanol frío (dejando nuevamente durante 12 horas a -20°).

El precipitado centrifugado, se redisolvió en Tris.HCl (pH 7,5) 10mM, con un décimo de volumen de suspensión de bentonita, y se dializó contra Tris.HCl (pH 7,5) 10mM, durante 15 horas. Se eliminó la bentonita por centrifugación del líquido dializado durante 15 minutos a 30.000 rpm (rotor 50, Spinco).

La concentración del tRNA resultante se midió por espectrofotometría a 260 nm.

M.15 Obtención de extractos ribosómicos. ER-1 y ER-.5:

Se prepararon dos tipos de extractos ribosómicos crudos, ya sea en un medio con KCl 1M (denominado ER-1) o con KCl 0,5M (llamado ER-.5)

A la fracción ribosómica total RbT-2 (M.7.2) disuelta en un volumen de solución F (concentración: 50 mg ribosomas/ml), se le agregó solución de KCl 4M (1/3 volumen para la concentración final de KCl 1M o bien 1/7 volumen para 0,5M final), y se incubó a 0° durante 15 minutos, con agitación ocasional. Se transfirió a tubos de 2,5ml del rotor 50 (Spinco) en los que se puso como máximo 1,5ml por tubo y el resto del volumen se completó con Silicona MS200 (menos densa). Se centrifugó durante 90 minutos a 50.000 rpm. Se extrajo cuidadosamente la capa de extracto sobrenadante coloreado (acuoso), con pipeta, cuidando de no tocar el sedimento. Como control se verificó siempre, por análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, que el extracto estuviera exento de partículas subribosómicas. (Ver ejemplo en Figura 14).

M.15.1 Extracto ribosómico dializado. ER-d: Se dializó el ER crudo (ER-1 ó ER-.5) contra solución I (5 cambios, volumen total 2 litros), durante 2 a 5 horas. El

ER-d así obtenido tiene una concentración de KCl 0,1M.

M.15.2 Extracto ribosómico desalado en Sephadex G25. ER-G25: El ER crudo (M.15) fué pasado a través de una corta columna (10 x 80 mm) de Sephadex G25, equilibrada y eluida con solución I (velocidad de flujo: 28 ml/cm², hora). Se recogieron las fracciones de alto peso molecular (coloreadas por la presencia de hemoglobina). El eluido (ER-G25) tiene también una concentración de KCl 0,1M.

M.15.3 Relación extracto ribosómico a ribosomas (ER:Rb): La proporción de ER en las incubaciones fué expresada como la cantidad (en mg) de ribosomas totales crudos RbT-2 cuyo extracto se agregaba por mg de ribosomas 80S presentes en la mezcla de incubación.

Para calcular esta relación con ER-d ó ER-G25, se midió su dilución luego del tratamiento de diálisis o de desalado, en base a la disminución de la lectura de A_{415nm} (hemoglobina), respecto del extracto crudo.

M.16 Incubación de células enteras:

Para la incubación de los reticulocitos enteros se empleó una mezcla que contenía, por ml de volumen final:

Tris.HCl(pH 7,5)	10 micromoles
NKM 4x (solución B ₂)	0,113ml
Plasma dializado contra NK (solución B ₁ sin Mg(CH ₃ COO) ₂)	0,050ml
Glucosa	0,500mg
Sulfato ferroso amónico	0,2 micromoles
Aminoácido- ¹⁴ C (de la actividad específica indicada)	0,5 micromoles
Mezcla de los 19 aminoácidos restantes (según Borsook (306))	0,035ml
Agua destilada c.s.p.	0,500ml
Suspensión de reticulocitos 1:1 V/V, en solución B ₁	0,500ml

La mezcla se incubó a 37° en baño termostatzado, con agitación circular, durante los tiempos indicados en cada caso. Para el estudio de la incorporación de aminoácidos a proteínas las muestras (0,2ml) se recibieron sobre 10 ml de agua bidestilada fría. El lisado así obtenido se centrifugó durante 20 minutos a 12.000 x g (Sorvall) y en el sobrenadante se determinó la incorporación de aminoácidos radioactivos (M.23.1) en alícuotas de 2,0ml. Para el examen de las poblaciones ribosómicas, los reticulocitos incubados se lavaron en solución B₁ fría y se lisaron en la forma en que se preparan los extractos acelulares (lisado 1:4, M.6.4).

M.17 Sistema acelular con lisado no fraccionado:

La mezcla de incubación contenía los siguientes componentes:

Mg(CH ₃ COO) ₂	2mM
KCl	60mM
Tris.HCl(pH 7,5)	10mM
2-mercaptoetanol	6mM
ATP	1mM
GTP	0,25mM
Creatina fosfato	5mM
Creatina quinasa	0,03 mg/ml
Aminoácido radioactivo (actividad específica determinada)	0,04mM
Mezcla equimolar de los 19 aminoácidos restantes	0,04mM
Lisado 1:1	0,8 v/v final

La temperatura y tiempo de incubación se indica en cada caso.

M.18 Sistema acelular con polisomas y sobrenadante:

La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes:

Mg(CH ₃ COO) ₂	2mM
KCl	70mM
Tris.HCl(pH 7,5)	26mM
2-mercaptoetanol	16mM
ATP.Mg	1mM
GTP.Mg	0,2mM
Lisado 1:1 enriquecido en polisomas (M.6.3)	0,04ml
Volumen final	0,0625ml

En cada caso se especifica la temperatura y tiempo de incubación.

M.19 Sistema acelular con componentes solubles definidos:

La mezcla contenía:

Mg(CH ₃ COO) ₂	2mM
KCl	72mM
Tris.HCl(pH 7,5)	36mM
2-mercaptoetanol	16mM
ATP.Mg	1mM
GTP.Mg	0,2mM
Creatina fosfato	7,2mM
Creatina quinasa	0,04 mg/ml
tRNA de hígado	0,072 mg/ml
Fracción enzimática A640-70	3 mg/ml
Aminoácido- ¹⁴ C de actividad específica determinada	0,04mM

Mezcla equimolar de los 19 aminoácidos restantes	0,04mM
Fracción ribosómica	1 mg/ml

El volumen final de la mezcla fué habitualmente de 0,125ml ó 0,250ml, según se indica en cada caso; también se especifica la temperatura y tiempo de incubación y otras modificaciones introducidas.

M.20 Incubaciones con agregado de hemina:

En algunas incubaciones se incluyó hemina (0,025mM) sobre la base de observaciones originales de London y col (325) y de Waxman y col (326) en el sentido de que su presencia era necesaria para que tuviera lugar la iniciación de la síntesis de cadenas de globina. Experimentos posteriores mostraron que en varios casos esa estimulación fué errática o inexistente, por lo cual se la omitió en los ensayos subsiguientes.

M.21. Determinación de la concentración de las fracciones ribosómicas, de RNA y de proteína:

Se realizó por espectrofotometría a longitudes de onda de 260 y 280nm.

Para ribosomas a 260nm; 1 mg/ml = 11,2 unidades de A_{260}

Para RNA a 260nm; 1 mg/ml = 21,4 unidades de A_{260}

La concentración de proteína se midió de acuerdo a la absorbancia a 260 y 280nm, utilizando el nomograma de E.Adams basado en los coeficientes de extinción dados por Warburg y Christian (310).

M.22 Gradientes de densidad de sacarosa:

Se generaron mediante una bomba peristáltica (Desaga) multicanal. En un recipiente de mezcla con buena agitación, se colocó una cantidad medida de la solución de sacarosa más concentrada, correspondiente a la mitad del volumen total de los gradientes a preparar; se hizo llegar a este recipiente la solución menos concentrada, a través de uno de los canales de la bomba. La mezcla de ambas soluciones salía, en proporción de dos volúmenes por volumen de entrada, a través de dos canales de la bomba que iban a cargar sendos tubos, depositándose en capas sucesivas, en un gradiente lineal. Los gradientes se prepararon a temperatura ambiente, pero se enfriaron siempre a 2° antes de ser utilizados.

M.22.1 Ultracentrifugación en gradientes analíticos: En tubos del rotor SW41-T1 (Spinco) se prepararon gradientes lineales de sacarosa 15-50%, de 12ml, con las soluciones G_1 y G_2 . Sobre ellos se depositaron muestras de 0,10-0,25ml conteniendo 0,4 a 1 unidad de A_{260nm} de las fracciones ribosómicas purificadas, o con 10 a 20 unidades de A_{415nm} en el caso de las poblaciones ribosómicas de los lisados.

Los gradientes se centrifugaron 135 minutos a 40.000 rpm ó 215 minutos a 36.000 rpm en el rotor SW41-T1, a 2°.

Las modificaciones de las condiciones de ultracentrifugación efectua-

das en algunos experimentos, se han indicado en cada caso.

M.22.2 Ultracentrifugación en gradientes preparativos: En tubos del rotor oscilante SW25-2 (Spinco) se generaron gradientes lineales de sacarosa 15-45% de 56 ml, con soluciones G_3 y G_4 .

Los gradientes preparativos se sembraron con 200 a 600 unidades de A_{260nm} de ribosomas totales RbT-1 ó RbT-2 (M.7.1 ó M.7.2) o con 100 a 400 unidades de A_{260nm} de ribosomas totales agotados o polisomas agotados (M.10), redissueltos en 1 a 3 ml de solución E_2 , y se sedimentaron durante 12 horas a 25.000 rpm.

Con las soluciones G_3 y G_5 se prepararon gradientes de sacarosa 15-30% de 20ml, en tubos del rotor angular 30 (Spinco). Estos últimos gradientes se utilizaron para el fraccionamiento de la población ribosómica total de los lisados.

M.22.3 Análisis espectrofotométrico y fraccionamiento de los gradientes: Se empleó un monitor de absorbancia a 254nm Isco (Modelo UV-2), acoplado a un registrador Sargent potenciométrico SRL con respuesta lineal de absorbancia. Se adaptó, intercalado entre el monitor y el registrador, un atenuador de la señal (contruido en el laboratorio), que permitió obtener a plena escala de éste último, registros de 2,5, 1,0 ó 0,5 unidades de A_{254nm} . El tubo de la ultracentrífuga, conteniendo el gradiente, se adaptó a la entrada de la celda del aparato; se desplazó el gradiente a través de la celda, empujando desde el fondo con una solución de sacarosa al 70%, impulsada a velocidad constante por una bomba a jeringa de flujo continuo (Sage Modelo 255-1).

Si la muestra era coloreada o contenía sustancias que absorban a 254nm (2-mercaptoetanol o nucleósidos fosfato, por ejemplo), previo a su análisis se aspiraba la parte superior del gradiente (0,5 - 1,5ml) mediante una jeringa con aguja de punta roma, sin perturbar las capas inferiores del gradiente.

La dirección de sedimentación en todos los gráficos es de derecha a izquierda. Las abscisas son proporcionales a las distancias desde el fondo del tubo.

Los valores de coeficientes de sedimentación asignados a las distintas fracciones se obtuvieron por comparación con los diagramas de sedimentación en gradientes de densidad publicados por otros autores (3; 311) en condiciones experimentales comparables con las nuestras. Se tomó como punto de referencia el pico característico de ribosomas monómeros, y se adoptó el valor genérico de 80S para los ribosomas monómeros y de 40S y 60S para las partículas subribosómicas nativas (311). Estos valores de coeficientes de sedimentación asignados son puramente convencionales, y no implican la medición de esa propiedad.

Las distribuciones cuantitativas de las poblaciones ribosómicas se obtuvieron por integración gráfica de la superficie bajo los picos respectivos, con un planímetro.

En los fraccionamientos, las porciones sucesivas del líquido de salida del monitor Isco se recogieron en tubos a 2°.

M.23 Determinación de la incorporación de aminoácidos radioactivos:

M.23.1 Incorporación a proteínas: Las muestras de los distintos sistemas (alícuotas de los lisados de reticulocitos enteros (2ml) o la muestra completa, con el agregado de 0,025ml de plasma de conejo como portador, en los sistemas acelulares), se precipitaron por agregado de ácido tricloroacético (TCA) conteniendo aminoácidos de hidrolizado de caseína 0,1%, hasta concentración final de 5%. Se dejó madurar el precipitado a temperatura ambiente durante 20 minutos, se centrifugó a baja velocidad durante 10 minutos y se agregó al precipitado 1ml de NaOH, en el que era inmediatamente disuelto. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se agregó 2 ml de agua destilada fría (enjuagando las paredes del tubo) y 1 ml de TCA al 30% y se calentó durante 15 minutos a 85°. Se enfrió y se filtró con succión a través de discos de papel de filtro S&S 589³, banda azul, de 25mm de diámetro, previamente humedecidos con TCA. Los precipitados se lavaron con TCA 5% y los discos ya sea se pegaron sobre planchetas de aluminio y se secaron, si se contaban en el contador proporcional, o bien se secaron y colocaron en frascos con 5ml de líquido de centelleo (Solución L₁) si se contaban en el contador de centelleo líquido.

Se usó un contador proporcional de flujo gaseoso a gas de cañería, con tubo proporcional Friesake & Hoepfner y escalímetro Nuclear (Modelo EMSP 6401) con cambiador automático de planchetas F & H (Modelo FAT 7708). Se midió ¹⁴C en la región proporcional, sin ventana, con una eficiencia del 32%; la radiación de fondo era de 18 cpm. Debido a la pequeña cantidad de muestra sólida depositada en los filtros, no fué necesario aplicar correcciones por autoabsorción.

Se empleó también un contador Packard Tri-Carb (Modelo 3320) de centelleo líquido. Se contó ¹⁴C con una ventana entre 50 y 1000, con 13% de ganancia. La eficiencia en esas condiciones fué de 45%, con una radiación de fondo de 20 cpm.

Los reticulocitos enteros, así como los sistemas acelulares derivados, sintetizan globina en forma prácticamente exclusiva (o polifenilalanina si se agrega poli-U como mensajero).

La radioactividad de las muestras procesadas en la forma descrita es una medida de la incorporación de aminoácidos en cadenas peptídicas (globina o polifenilalanina sintetizada).

Los resultados se expresan en picomoles del aminoácido radioactivo incorporado en proteína, por ml de reticulocitos enteros o por mg de ribosomas, al tiempo y temperatura especificados.

Cuando se dan porcentajes de inhibición se refieren a la relación en-

tre las incorporaciones en presencia de inhibidor versus la muestra sin inhibidor, a tiempos fijados.

M.23.2 Incorporación a proteínas más aminoacil-tRNA unido a ribosomas: En los experimentos en que se estudió la unión de metionil-tRNA a la subpartícula 40S, se determinó no sólo la radioactividad de proteínas, sino también la de los compuestos lábiles del tipo aminoacil-tRNA. Para ello se recibieron las muestras sobre 0,5ml de agua bidestilada que contenía 0,010ml de plasma de conejo como coprecipitante, en tubos colocados en baño de agua hielo; se precipitaron con TCA 5% a 0°, se sedimentaron y redisolviéron en 0,3ml de NaOH 0,5M y, sin otra precipitación, se trasvasaron directamente a frascos del contador de centelleo. Se agregaron 10 ml de líquido de centelleo (Solución L₂) y se midió la radioactividad de ³H y ¹⁴C.

Para ³H se usó un canal con ventana entre 50 y 350, con 90% de ganancia, en el que se contaba ³H con 7,75% de eficiencia. En este canal se contaba un 15,6% de las cuentas de ¹⁴C. La radiación de fondo fué de 5 cpm.

Para ¹⁴C se usó un segundo canal con ventana entre 210 y 1000, con 10% de ganancia, obteniéndose una eficiencia del 32%. Se contaba sólo el 0,8% de las cuentas provenientes de ³H. La radiación de fondo era de 14 cpm.

Las eficiencias se obtuvieron con muestras standard de tolueno-³H y tolueno-¹⁴C.

M.24 Determinación de la radioactividad de partículas ribosómicas marcadas con ³²P:

Las fracciones de los gradientes de densidad de sacarosa se recibieron sobre 3 ml de solución E₁ fría, se filtraron por discos de 25mm, de membranas de nitrocelulosa Sartorius, de 0,45 micrones, con velocidad regulada, y se lavaron dos veces con solución E₁ fría. Los filtros se secaron y se pegaron sobre planchetas de aluminio. Se midió la radioactividad de los ribosomas adsorbidos en las membranas en el contador de flujo gaseoso, en la región proporcional, sin ventana. Para comparar mediciones hechas no en el mismo día, se corrigieron de acuerdo a la curva de desintegración del ³²P.

RESULTADOS

R.1 Estudios sobre el ciclo polisómico en reticulocitos y la participación de los ribosomas monómeros 80S nativos:

R.1.1 Ribosomas monómeros, precursores de unidades ribosómicas activas en células enteras:

En reticulocitos, tanto en células (263) como en extractos acelulares (242c), no se detecta una activa participación de la población de ribosomas monómeros en el ciclo polisómico. Sin embargo, en condiciones especiales, al menos parte de esa población de monómeros es utilizada en la reformación de polisomas (267).

Así se ha observado que en reticulocitos cultivados "in vitro" en distintas condiciones metabólicas (ausencia de hierro (267), o de hemo (312), o bloqueo del metabolismo energético (269)), o en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como el NaF, que inhibe selectivamente la iniciación de la síntesis de proteínas (269) la proporción relativa de las poblaciones de ribosomas monómeros y polirribosomas sufre cambios muy pronunciados, aumentando la primera a expensas de la última. Estas modificaciones son reversibles, ya que los monómeros acumulados pueden ser transferidos a polisomas al recuperarse las condiciones fisiológicas normales (263).

Hemos repetido estas observaciones preincubando reticulocitos enteros durante 10 minutos a 37°C en el medio para incubación de células enteras, e incubándolos luego en el mismo medio en presencia o no de NaF 10 mM. Alícuotas duplicadas conteniendo células enteras, obtenidas de cada una de estas mezclas, se incubaron en el medio para incubación de células enteras (M.16) en presencia de valina -¹⁴C 0,5 mM, para medir la incorporación de aminoácido marcado en proteína (M.22.1), o se lisaron en Mg⁺⁺ 1,5 mM, en presencia de cicloheximida 0,5 mM y se analizaron las poblaciones ribosómicas en gradientes de sacarosa 15-50% (Mg⁺⁺ 2mM, K⁺ 70mM, Tris.HCl(pH 7,5) 2mM). La cicloheximida, cuya acción resulta en el bloqueo de la elongación de cadenas peptídicas crecientes (313) se agrega aquí para estabilizar de ese modo la distribución de la población ribosómica; el análisis de ésta resulta así representativo de su estado real en el momento de la toma de la muestra.

En la Figura 3 se representan los resultados tanto de la actividad de síntesis proteica como de los análisis en gradiente. Las células incubadas en medio normal durante 10 minutos a 37° tuvieron una sostenida incorporación de valina-¹⁴C (curva A), que se correspondía con una distribución de ribosomas (gradiente A) en que, además de monómeros 80S y subpartículas 40S y 60S (en menor cantidad), había una fuerte preponderancia de polisomas. Las mismas células incubadas en el mismo medio durante 120 minutos, mostraban una acti-

vidad aún mayor (curva B) y conservaban su población de polisomas (gradiente B) si bien en este caso ligeramente disminuida a favor de los monómeros. El agregado de NaF 10 mM durante la incorporación de valina- ^{14}C trajo una rápida disminución de la actividad de síntesis (curva A + NaF) que cesaba completamente entre los 5 y 10 minutos. ^{a los 15 min,} Se había incorporado solamente 17% de lo observado en (A) sin inhibidor. Una incubación con NaF similar, durante 60 minutos, condujo a una inhibición total (curva C + NaF) y el respectivo perfil ribosómico del gradiente C (a 120 minutos la distribución fué idéntica) mostró una total desagregación de los polisomas y su conversión en monómeros 80S.

La inhibición por NaF es reversible: al eliminar el NaF por repetidos lavados de las células, la reincubación de éstas en medio fresco, durante 5 minutos, condujo a una gradual recuperación de la actividad de síntesis (curva D), que se hacía mayor si la reincubación era de 60 minutos (curva E). Esta recuperación fué concomitante con la reformación - también gradual - de los polisomas, a expensas de los monómeros 80S. Ello se ve en los comienzos del proceso, en el gradiente D (5 minutos de recuperación) que indica la reaparición de pequeños picos de polisomas y la disminución del pico de 80S. La franca recuperación a los 60 minutos se muestra en el gradiente E (similar al B) con una distribución en que los polisomas (dímeros hasta heptámeros) vuelven a predominar, y los monómeros 80S han disminuido fuertemente.

En la incubación de los reticulocitos en presencia de NaF 10 mM, frente al gran aumento de ribosomas monómeros (3 a 4 veces), el nivel de las partículas subribosómicas nativas, contrariamente, se mantiene constante o a lo sumo aumenta ligeramente (gradiente C). Esto confirma resultados anteriores obtenidos en este laboratorio, coincidentes con estudios similares de Bishop (314), en reticulocitos; otros investigadores (Colombo y col. (315) en reticulocitos y en células HeLa, y Hogan y col. (226) en células de tumor ascítico de ratón) encontraron que la preincubación con NaF causaba la acumulación de monómeros 80S, y junto a ello una disminución del nivel de subpartículas, discrepancia con nuestros resultados cuyo significado no conocemos. Lo que importa señalar es que, coincidentemente, todos estos resultados permiten descartar que exista un rápido equilibrio espontáneo de disociación-asociación entre monómeros 80S y partículas subribosómicas en el medio intracelular.

Los experimentos aquí presentados confirman que en el restablecimiento de la actividad de síntesis de proteínas después de eliminar el inhibidor, la reconstitución de los polisomas activos se hace mediante la utilización del grueso de los ribosomas monómeros libres, y por lo tanto, en las condiciones elegidas, éstos pueden ser canalizados hacia la formación de unidades ribosómicas de polisomas.

R.1.2 Las partículas subribosómicas nativas como precursoras de polisomas, en sistemas acelulares de reticulocitos:

La existencia de las partículas subribosómicas nativas en distintos sistemas biológicos, el reconocimiento de su participación en el proceso de iniciación de cadenas de globina en el sistema de reticulocitos de conejo (3), y otras evidencias surgidas de estudios metabólicos sobre la síntesis de ribosomas en células HeLa (225), células L (261) y tumor de ascites (226), han llevado a proponer a las partículas subribosómicas como precursoras directas de las unidades ribosómicas en polisomas. Heywood (197), en el sistema acelular de embrión de pollo y Kaempfer y col. (148) en levaduras, obtuvieron resultados semejantes.

En un trabajo previo de este laboratorio, E.Zylber (316) encontró que en el sistema acelular de reticulocitos de conejo para la síntesis de hemoglobina, se unen a los polisomas partículas de 40S y 60S nativas marcadas con ^{32}P , cuando tiene lugar la síntesis peptídica; esto no ocurre en cambio cuando se omite energía (ATP + GTP + creatina fosfato + creatina quinasa) en el medio de incubación. El agregado de estas subpartículas estimulaba también la incorporación de aminoácido- ^{14}C a proteínas (316).

Para confirmar y extender estas observaciones, hemos utilizado partículas subribosómicas- ^{32}P nativas, purificadas. La obtención y aislamiento de estas partículas marcadas con ^{32}P en su RNA constitutivo, se detallan en la sección Materiales y Métodos (M.9).

La validez metodológica de la utilización de este tipo de material marcado se basa en que el procedimiento de marcación "in vivo" asegura que el 99% de la radioactividad- ^{32}P de las partículas se encuentra en su RNA constitutivo (263-b). Como las condiciones de trabajo están muy lejos de las que determinan que las subpartículas ribosómicas involucradas pierdan sus proteínas constituyentes (y haya por lo tanto algún intercambio parcial de las mismas) cualquier incorporación de ^{32}P medida refleja la participación integral de la partícula subribosómica como tal.

Estas partículas subribosómicas marcadas fueron incubadas durante 15 minutos a 30° en un sistema acelular con componentes solubles definidas (M.19), en presencia de polisomas no marcados (M.8), con el agregado de enzimas, tRNA, aminoácidos, energía (en forma de ATP + GTP + creatina fosfato + creatina quinasa) y en condiciones iónicas adecuadas para la síntesis de proteínas ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 2,5mM, KCl 70mM, Tris.HCl (pH 7,5) 26mM y mercaptoetanol 16mM). Al término de la incubación se analizó, en gradientes de sacarosa 15-50%, la distribución de la población ribosómica y de la radioactividad de ^{32}P .

Los resultados de un experimento así realizado con la fracción de partículas subribosómicas de 40S + 60S-³²P se muestran en la Figura 4. La parte A del mismo corresponde al análisis de la fracción subribosómica, luego de ser incubada en la mezcla con todos los componentes, excepto que se ha omitido la presencia de los polisomas. La parte B muestra los resultados de la incubación de la misma en la mezcla completa ya mencionada; el perfil de absorbancia es la suma de las contribuciones del material de la fracción subribosómica marcada, que se observa en A, más el que proviene de la adición de los polisomas purificados no marcados. Se observa que las partículas subribosómicas son capaces de incorporarse a agregados más pesados, apareciendo 30 % de la radioactividad en partículas de 80S o más: hay una transferencia de un 16 % de material de 40S + 60S-³²P a 80S y un 14 % a agregados más pesados (B). Esto puede apreciarse en el gráfico diferencial (B - A), en el que se evidencia la desaparición de parte de la radioactividad asociada a la zona de las partículas subribosómicas, tanto 40S como 60S, con un aumento concomitante en la región de 80S y de polisomas. Este aumento aparece dependiente de la presencia de polisomas en el medio: los mismos contribuirían con su mRNA para permitir la formación de unidades ribosómicas de iniciación a expensas de las subpartículas. En estos experimentos la disminución de la radioactividad de las partículas 40S es mayor que la de 60S. Sin embargo no puede calcularse la relación estequiométrica en que las mismas son utilizadas: Esto se debe a que desconocemos la radioactividad específica efectiva de las partículas-³²P en la mezcla de incubación, ya que es modificada por dilución con partículas ribosómicas no marcadas (de la preparación de polisomas) en proporciones diferentes, no determinadas.

Si el experimento se realiza eliminando la energía de la mezcla de incubación, la incorporación de las subpartículas a material ribosómico más pesado disminuye en forma marcada (ver C y gráfico diferencial C - A): se transfiere solo un 3 % de radioactividad a la zona de 80S y un 7 % a la zona de polisomas. Comparando estos resultados con los anteriores (B), resulta evidente que la transferencia de radioactividad es, en su mayor parte, dependiente de la presencia de energía. Este efecto del agregado de energía se visualiza mejor en el gráfico diferencial (B - C): en presencia de energía se incrementa en 20 % la radioactividad en monómeros + polisomas (En otro experimento similar, en 10 minutos a 30°, la transferencia de ³²P dependiente de energía fué de 21 %). Estos experimentos sugieren que la incorporación de partículas subribosómicas a polisomas y ribosomas, requiere el concomitante funcionamiento del sistema en la síntesis de proteínas. Comparando los trazados de absorbancia a 254 nm de los gráficos B y C, puede observarse una

desagregación parcial de los polisomas, acompañada de un aumento del pice de monómeros, por incubación en el medio completo con energía (B). Esto puede atribuirse a un funcionamiento del sistema en el que no está balanceada la velocidad de reiniciación con la de terminación de la síntesis de cadenas peptídicas, por deficiencias, probablemente, de los factores de iniciación. Esto es habitual en los sistemas acelulares fraccionados, en que, comparativamente con el lisado crudo, ciertos componentes para la iniciación resultan limitantes, determinando, en consecuencia, que la capacidad de reiniciación sea reducida o nula (3;307;317).

En el experimento de la Figura 4 (B-A) en presencia de energía, se ha observado la formación de una alta proporción de monómeros marcados que contienen más de la mitad de la radioactividad transferida de subpartículas ribosómicas a regiones pesadas. El efecto puede ser explicado teniendo en cuenta que, durante la síntesis (dependiente de energía) se originan unidades ribosómicas-³²P que pueden llegar a sintetizar y completar cadenas peptídicas y dar lugar a la liberación de monómeros 80S de terminación también marcados con ³²P. Esta interpretación es apoyada por la dependencia del fenómeno respecto de la presencia de energía: en ausencia de ésta, en que no tienen lugar los procesos de elongación y terminación de cadenas, la formación de 80S-³²P cae a 1/5 de la anterior (C - A). De acuerdo con este punto de vista la radioactividad de ³²P observada en monómeros 80S debe sumarse a la radioactividad de polisomas para la medida de la real entrada de subpartículas ribosómicas -³²P a polisomas. No puede descartarse, sin embargo, la posibilidad de que ocurra un intercambio, si bien pequeño, entre subpartículas y ribosomas 80S libres, a semejanza de lo observado por Henshaw y col. (254).

La utilización tanto de las subpartículas 40S como las 60S en el proceso de unión a polisomas, está corroborada por los experimentos indicados en la Tabla I, en que se describen incubaciones hechas ya sea con subpartículas 40S-³²P o con 60S-³²P, en ambos casos en un sistema con componentes menos purificados, constituido por un lisado enriquecido en polisomas.

En estos experimentos se ve que, por una incubación durante 15 minutos a 25°, se obtuvo una incorporación de 17 % y 19 % de la radioactividad de las subpartículas 40S y 60S originales, respectivamente. Un tercer experimento, con la mezcla de subpartículas 40S + 60S -³²P, mostró que esa incorporación observada a 25° (18 %), ya había tenido lugar a los 7 minutos de incubación.

El conjunto de estos experimentos (y otros no incluidos aquí) muestra que (a) tanto las partículas nativas 40S como las 60S se incorporan a

estructuras polisómicas; (b) esta incorporación requiere la presencia de polisomas y es dependiente de energía.

R.1.3 Los ribosomas monómeros. Su comportamiento en el sistema acelular con componentes definidos:

Según hemos visto en experimentos anteriores (R.1.1), en células enteras los ribosomas monómeros pueden actuar como precursores de unidades ribosómicas activas y ser transferidos a polisomas cuando las células recuperan las condiciones fisiológicas normales, después que se han acumulado ribosomas libres por bloqueo de la iniciación de cadenas peptídicas.

Se trató de dilucidar entonces, si el comportamiento de los ribosomas monómeros en el sistema acelular parcialmente purificado, confirmaba las observaciones efectuadas en células enteras. Esto se ensayó en varios experimentos realizados en condiciones semejantes a las utilizadas (ver Figura 4) para evidenciar la participación de las partículas subribosómicas en la reformatión de polisomas.

El resultado de un experimento (Figura 5) en que se incubó ribosomas $80S-^{32}P$ en el sistema acelular completo con polisomas y energía (B), no muestra variaciones apreciables en la distribución de la radioactividad con respecto al control incubado en un medio salino (A), lo que indicaría que los monómeros son incapaces de unirse a polisomas en condiciones en que sí lo hacen las subpartículas. Esto se visualiza mejor en el gráfico diferencial (B-A), en que se evidencia que la conversión de partículas 80S en polisomas e en subpartículas no es significativa.

Como control respecto del grado de funcionamiento del sistema se verificó que en estas condiciones de incubación hay síntesis de proteínas. En uno de los experimentos de esta serie, se midió la incorporación de aminoácido marcado a proteínas; en una alícuota de la mezcla de incubación con ribosomas $80S-^{32}P$ más polisomas, sobrenadante de 150.000g de un lisado 1:1, y energía (ATP.Mg y GTP.Mg) (en este caso la mezcla no contenía hemina), se agregó valina- ^{14}C 0,04mM, 40 Ci/mol, y se incubó durante 90 minutos a 37°, encontrándose una incorporación de 531 pmoles de valina- ^{14}C /mg de ribosomas (grado de actividad corriente y aceptable en estos ensayos).

Estos resultados, comparados con los obtenidos con partículas subribosómicas- ^{32}P , sugieren que los ribosomas 80S libres son incapaces de actuar por sí solos como precursores de unidades ribosómicas, en la iniciación de la síntesis de proteínas en el sistema acelular parcialmente purificado. Ello marca una diferencia evidente con las observaciones efectuadas en células enteras, e indicaría la deficiencia e inactivación, en ese sistema acelular, de algún componente que sería el que en reticulocitos enteros,

posibilitaría la reutilización de los monómeros.

R.1.4 Participación de los ribosomas monómeros nativos como precursores de polisomas en presencia del extracto ribosómico . ER.:

Los estudios de Miller y Schweat (173) y de Cohen (175) sobre iniciación de cadenas peptídicas, mostraron que un extracto soluble obtenido con solución concentrada de KCl, a partir de ribosomas totales de reticulocitos, confiere a los ribosomas 80S la capacidad de iniciar cadenas peptídicas y formar polisomas en el sistema acelular. Esas observaciones nos sugirieron que la pasividad de los ribosomas 80S-³²P en nuestros experimentos, podría ser alterada mediante el agregado de dicho extracto al sistema celular.

R.1.4.1 Incorporación de monómeros 80S nativos a polisomas concomitante con su escisión en partículas subribosómicas:

Para investigar el último punto, hemos preparado un extracto ribosómico (ER), similar al de Miller y Schweat (173), mediante el tratamiento de ribosomas totales con KCl (M.15). Este extracto crudo, como el de dichos autores, era capaz de estimular la síntesis de proteína por un sistema acelular, unas 2,7 veces respecto del control sin extracto ribosómico en nuestro caso, llevando la incorporación de valina-¹⁴C a 1432 pmoles/mg de ribosomas (en 90 minutos a 37°).

Con este extracto ribosómico hemos estudiado los efectos sobre el comportamiento de los ribosomas monómeros 80S-³²P, durante la incubación de los mismos en un sistema acelular, en condiciones idénticas a las del experimento descrito en la Figura 5-B.

Cuando los ribosomas 80S-³²P (cuyo perfil se muestra en la figura 5A) se incubaron en el sistema acelular completo con polisomas y sobrenadante, pero ahora en presencia de extracto ribosómico (Figura 5C), sufrieron una modificación evidente, tanto en el perfil de absorbancia, indicativo de las distintas partículas ribosómicas resultantes como en la distribución de la radioactividad. La disminución del pico de monómeros fue acompañada de un aumento de las subpartículas 40S y 60S y de la aparición de agregados polisómicos, visibles en la región más pesada. Como puede apreciarse en el gráfico diferencial (C-A), una fracción considerable de la radioactividad inicialmente asociada a monómeros (aproximadamente un 20 %), fue transferida a la región polisómica, lo que confirma la observación de Cohen (175) sobre la formación de polisomas a expensas de monómeros promovida por el extracto ribosómico. Además, se formaron cantidades significativas de partículas 40S-³²P y 60S-³²P (2,5 % y 2,8 % de la radioactividad total respectivamente), que se comportaban como partículas subribosómicas nativas, estables en el medio

con un nivel de Mg^{++} fisiológico.

Estos resultados indicarían que las partículas subribosómicas marcadas que aparecen en la Figura 5-C, eran producto de la escisión específica de los monómeros $80S-^{32}P$ originales, y que ello aconteció como resultado de la presencia en la mezcla de incubación del extracto ribosómico ER-1.

Como ya se ha demostrado, las partículas subribosómicas son capaces de unirse a los polisomas por sí solas, para iniciar la síntesis de cadenas peptídicas. Considerando este último en conjunto con los resultados obtenidos con los monómeros $80S-^{32}P$ en presencia del extracto ribosómico, ello sugiere que la incorporación de los ribosomas ^{32}P a polisomas ha tenido lugar precisamente a través, y con el requisito indispensable, de su disociación previa a partículas subribosómicas nativas.

Nota: Ese efecto disociante podría ser el responsable de una observación realizada durante un experimento con partículas subribosómicas $40S + 60S-^{32}P$ en el sistema acelular con polisomas y sobrenadante, en el que la transferencia de la radioactividad de ^{32}P a polisomas no resultó aumentada cuando se agregó extracto ribosómico (ER), y antes bien, pareció producirse una disminución de la misma. Ello fue debido posiblemente a que el efecto disociante del extracto ribosómico sobre los ribosomas $80S$ (presentes en la misma preparación del material polisómico no marcado), apartó nuevas partículas subribosómicas no radioactivas, que disminuyeron la actividad específica de las originalmente presentes: la incorporación de éstas en polisomas les apartaba menos radioactividad de la esperada.

R.1.4.2 Necesidad de energía en el proceso de utilización de los ribosomas $80S$ nativos:

Los experimentos con ribosomas $80S-^{32}P$ nativos mostraron que el extracto ribosómico ER-1 posibilita la incorporación en polisomas de material proveniente de los monómeros. Sin embargo, en ausencia de energía (ATP + GTP + creatina fosfato + creatina quinasa), este efecto es prácticamente nulo. Esto se observa en los experimentos descritos en la Tabla II, en donde se compara el incremento de radioactividad ^{32}P en la fracción polisómica cuando al realizar la incubación de la fracción $80S-^{32}P$ en el sistema acelular con componentes definidos, ya sea con el solo agregado de ER-1 sin energía (línea 2), o bien con ER-1 más energía (línea 1).

La omisión de energía en la incubación con ER-1 llevó a una marcada disminución en la transferencia de radioactividad a la fracción pesada, la que así quedaba reducida a 1/10 de la observada con ER-1 más energía. La significación de este efecto resulta aún mayor si se hace notar que cuando la

incubación de los ribosomas $80S-^{32}P$ se hizo en presencia del extracto ribosómico solo (línea 2) el pequeño incremento de radioactividad observado en los polisomas ocurría exclusivamente a expensas de la radioactividad asociada a las partículas subribosómicas (la preparación de $80S-^{32}P$ utilizada en este experimento estaba impurificada por dichas partículas). El porcentaje de radioactividad asociada a los ribosomas monómeros permanecía en cambio prácticamente inalterado. La transferencia de radioactividad a la zona de polisomas que tuvo lugar por efecto del agregado de ER-1 más energía (línea 1), por el contrario se hizo a expensas de la radioactividad asociada inicialmente a los ribosomas monómeros, que disminuía en forma equivalente.

En una incubación control (línea 3) se observó que en ausencia de extracto ribosómico, el agregado de energía al sistema promueve la utilización de las subpartículas $-^{32}P$ presentes, cuya radioactividad es transferida a los polisomas y ribosomas monómeros en proporción tres veces mayor que en ausencia de energía (línea 2). Esta observación corrobora la conclusión anteriormente presentada (A.1.2) sobre el muy considerable grado de dependencia respecto de la energía, para la incorporación de partículas subribosómicas en polisomas. De los presentes resultados obtenidos con monómeros $80S-^{32}P$ surge que la transferencia de radioactividad de monómeros a polisomas, totalmente dependiente del extracto ribosómico, requiere también la presencia de energía.

Si aceptamos que la entrada de monómeros en polisomas ocurre en dos etapas, a través de la disociación a subpartículas que luego se unen a los polisomas, el ya referido requerimiento de energía para este último paso hacía previsible que en el proceso global a partir de los monómeros también se manifestara este requerimiento. Existe la posibilidad que además, el ^{pre-}cedente, la disociación de los monómeros mediada por el extracto ribosómico, sea dependiente de la energía. Los experimentos ya presentados no permiten dilucidar este punto: el mismo será encarado en una sección posterior.

1.4.3 Las subunidades obtenidas por efecto del extracto ribosómico forman complejos del tipo de los complejos de iniciación:

Si realmente esta reacción de disociación provee una vía para la utilización de los ribosomas monómeros de la célula, que de esa forma podrían actuar como precursores de polisomas y participar en la síntesis de proteínas, debería esperarse que las subpartículas obtenidas por acción del extracto ribosómico sobre los ribosomas $80S$, fueran activas en la formación de complejos de iniciación.

Hemos explorado, entonces, la posibilidad de formación de complejos de iniciación con las partículas ribosómicas así obtenidas. Estos complejos deberían tener las características señaladas en la introducción: formarse

con partículas 40S, Met-tRNA iniciador y mRNA, con la participación de IF y GFP, en un medio con concentración de Mg^{++} 2 a 3 mM. Las propiedades previsibles de este complejo hacen esperar que en su caracterización experimental se observe que el mismo sedimenta como una partícula de 40S y que tiene en forma ácido precipitable y eliminable por ácido en caliente, metionina, con exclusión de otros aminoácidos. Su formación debería, además, estar inhibida por ácido aurintricarboxílico (ATA), debido al poder de este, de inhibir específicamente la unión a mRNA de la subpartícula pequeña (104). En nuestro laboratorio, la existencia de tal complejo Met-40S, con todas esas propiedades, ha sido observada por E. Bard (217) en extractos acelulares de reticulocitos que contienen partículas subribosómicas 40S nativas, y retienen la capacidad de iniciar cadenas de globina. La formación de estos complejos era inhibida por ATA, pero no por flúoruro. La valina ^{14}C estaba virtualmente excluida de los complejos 40S y parecía estar unida solo a agregados polisémicos, en sistemas sin inhibidores que están sintetizando proteínas.

Basándonos en estos resultados, hemos explorado, entonces, la formación de complejos met-40S a partir de ribosomas monómeros 80S disociados por efecto del extracto ribosómico, en presencia del ión flúoruro (0,02 M), en condiciones similares a las utilizadas por E. Bard (217). Los ribosomas utilizados fueron monómeros 80S aislados de un sistema acelular con polisomas y componentes solubles definidos que ha sido agotado en su capacidad de sintetizar proteínas por incubación durante 90 minutos a 37°. Cuando se incubaron estos ribosomas 80S en un sistema acelular completo (con componentes solubles definidos), durante 10 minutos a 25°, con Met- 3H (2.000 Ci/mol) y val- ^{14}C (50 Ci/mol) y se analizaron las muestras en gradientes de sacarosa, se observó que la incorporación de aminoácido marcado a material ácido-precipitable fué muy baja (Figura 6 (A) control); a lo largo del gradiente fué prácticamente nula la radioactividad de 3H y ^{14}C precipitable por ácido Tricloroacético (TCA) en frío, lo que era de esperar en un sistema con ribosomas agotados y sin suplemento de factores de iniciación. Cuando se hizo la misma incubación pero en presencia de extracto ribosómico y NaF (Figura 6 (B)), la síntesis de proteínas fué reducida, por efecto inhibitorio del flúoruro en la iniciación de las cadenas peptídicas; pero como resultado atribuible a la actividad del extracto ribosómico, una parte considerable de los ribosomas 80S se disociaron en subpartículas 40S y 60S, y apareció una cantidad significativa de Met- 3H (2 picomoles) unida exclusivamente a la subpartícula 40S. La valina- ^{14}C , si bien aparece asociada a 40S, 60S y agregados más pesados, lo está en cantidades mucho menores que la metionina en las fracciones que corresponden al pico de 40S. El grado de selectividad y afinidad

para la formación de los complejos Met-40S se refleja en la variación de la relación molar Met/Val en las distintas fracciones del gradiente, que varía de 0,05-0,2 en las regiones de 80S y pesada, a 3,07, 3,52 y 2,33 en las tres fracciones que comprenden el pico de 40S.

Estos resultados, que concuerdan con los antes referidos, obtenidos por E. Bard con el lisado fresco de reticulocitos, indican que las subpartículas 40S, que resultan de la disociación de los monómeros 80S agotados por efecto del extracto ribosómico, se comportan, en lo que respecta a su capacidad de unir Met-tRNA en complejos presumiblemente del tipo de los complejos de iniciación, en forma semejante a las partículas subribosómicas nativas presentes en el citoplasma.

Esto, sumado a los resultados de incorporación de ribosomas monómeros a polisomas en presencia del extracto ribosómico, indicaría que las partículas subribosómicas obtenidas en estas condiciones son partículas competentes para cumplir el rol de precursores directos de unidades ribosómicas activas en polisomas.

R.2 Actividades del extracto ribosómico:

Los experimentos presentados en el capítulo anterior han indicado que las subpartículas ribosómicas nativas de 40S y 60S son precursoras directas de los polisomas, y que los ribosomas monómeros libres 80S, nativos, pueden ser utilizados para la formación de unidades ribosómicas en polisomas, a través de su disociación en las subpartículas. Este proceso es estimulado por el extracto ribosómico crudo: la actividad disociante así manifestada viene a integrarse a la ya conocida capacidad general del extracto, de estimular la reiniciación de la síntesis de proteínas en sistemas acelulares (173-a).

En los experimentos que se describen a continuación se han caracterizado someramente estas capacidades del extracto ribosómico y en especial, la actividad disociante de ribosomas monómeros y los requerimientos y propiedades de la reacción de disociación.

R.2.1 La estimulación global de la iniciación en la síntesis de proteínas:

El extracto ribosómico total obtenido en un medio con KCl 0,5-1M, (ya referido en R.1.4) es capaz de estimular los procesos de reiniciación de cadenas peptídicas en sistemas acelulares (173), posibilitando así un funcionamiento prolongado de la síntesis de proteínas que, en su ausencia, habría cesado rápidamente. Ya se había mencionado que esto es debido a la marcada labilidad de algunos de los factores de iniciación que conjuntamente con su escasa o nula disponibilidad en los sistemas acelulares purificados, determinan un rápido cese de la iniciación (en esas condiciones sole-

mente puede tener lugar la elongación y terminación de las cadenas peptídicas preexistentes. Al término de este proceso la capacidad sintética de este sistema se dice que se ha agotado).

En el experimento de la Figura 7 se observa que un sistema acelular constituido con componentes solubles definidos y ribosomas totales agotados, que muestran de por sí una limitada capacidad de incorporar aminoácido radioactivo en proteína, aumentan notablemente tanto la velocidad (5,6 veces) como el lapso en que perdura esa incorporación, cuando está presente el extracto ribosómico.

Este efecto estimulante se observó también con otros tipos de preparaciones ribosómicas. Las estimulaciones fueron variables y en ellas influyeron la capacidad endógena de cada tipo de preparación ribosómica y, presumiblemente, su dotación de RNA mensajero. En la Figura 8 se detallan las incorporaciones totales obtenidas con diversos tipos de ribosomas, en un sistema acelular con componentes solubles definidos, ya sea sin adiciones, o bien con el agregado de extracto ribosómico.

Las estimulaciones se vieron tanto con preparaciones de ribosomas no preincubados (ribosomas totales (1) y polisomas (2)), como con los agotados (ribosomas totales agotados (3) y monómeros 80S aislados de preparaciones agotadas (4 y 5)). Particularmente en estos últimos se pudo observar que la actividad es totalmente dependiente del agregado del extracto ribosómico: con ribosomas 80S de polisomas agotados (5), la incorporación de valina-¹⁴C en condiciones basales fué de solamente 3 picomoles/mg y, en presencia de extracto ribosómico, alcanzó a 405 picomoles/mg. Los niveles de incorporación basal observados en este tipo de preparaciones fueron habitualmente bajos. En cambio, las incorporaciones máximas obtenidas con estos ribosomas, pero con distintas preparaciones del extracto ribosómico, han sido variables.

En el experimento detallado en la Tabla 3 se utilizaron ribosomas 80S nativos, componentes fisiológicos de las células que, como ya lo había demostrado Rich (265), prácticamente carecen de cadenas de globina en crecimiento. En este experimento, en que se midió la incorporación de fenilalanina-¹⁴C en vez de valina-¹⁴C, se observó, como era previsible, una muy baja incorporación basal en ausencia del extracto ribosómico, que calculada en términos de la estequiometría de incorporación de fenilalanina y valina en cadenas de globina (32 y 58 restos respectivamente para hemoglobina $\alpha_2\beta_2$ de conejo (319)) representa 51 picomoles de valina/mg de ribosomas. La misma preparación en presencia de extracto ribosómico, tuvo una incorporación de fenilalanina-¹⁴C equivalente a 125 picomoles de valina/mg.

Este nivel de estimulación no difiere sensiblemente de los alcanzados con la generalidad de los ribosomas 80S agotados.

Con este mismo tipo de preparación se ensayó el efecto del extracto ribosómico sobre la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U (Tabla 3). Para ello se llevó la concentración de Mg^{++} a 4,4mM, óptima para la síntesis de polifenilalanina dependiente del extracto ribosómico (173). Aquí nuevamente el agregado de éste estimuló (en 1,5 veces) la formación basal de polifenilalanina.

Esta capacidad de estimular la incorporación de aminoácidos a proteínas depende de la cantidad de extracto ribosómico agregado, Según puede verse en la Figura 9, en el sistema acelular con componentes solubles definidos y ribosomas monómeros agotados (80Sag-B), la incorporación de valina- ^{14}C /mg de ribosomas, es mayor al aumentar la relación ER:Ab. Al llegar a una relación ER:Ab = 5, el sistema estaba prácticamente saturado, mientras que con ER:Ab = 1,25 se había alcanzado 2/3 del efecto total de estimulación.

Un ensayo con inhibidores de la iniciación mostró que el efecto del extracto ribosómico es totalmente sensible a los mismos. En la Figura 10 se ve que la estimulación por el extracto ribosómico es anulada en forma prácticamente total y la incorporación se revierte al nivel basal, cuando en el ensayo están presentes NaF 20mM ó ATA 0,2mM.

La curva del efecto inhibitor de ATA y su coincidencia con la inhibición por NaF muestran que en las concentraciones utilizadas en el ensayo el ATA ha actuado inhibiendo preferencialmente la iniciación sin interferir con los otros procesos de elongación que corresponden a la incorporación basal.

A.2.2 La disociación de ribosomas monómeros por el extracto ribosómico:

La disociación de los ribosomas 80S por efecto del extracto ribosómico (que ya había sido observada en los experimentos con ribosomas 80S- ^{32}P), fué estudiada más detalladamente en cuanto a sus características y requerimientos. El criterio con que encaramos las observaciones iniciales fué que, a semejanza de aquellos experimentos, el efecto debía tener lugar en condiciones fisiológicas normales, aptas para la síntesis de proteínas, y con ribosomas nativos. Para ello utilizamos entonces un lisado 1:1 en sales (M.6.2), cuyo contenido de los diversos componentes del citoplasma (sales, metabolitos, enzimas, partículas), permite un funcionamiento parecido al de las células enteras. El lisado fué incubado a 25° en presencia de energía (ATP + GTP + creatina fosfato + creatina quinasa) y en las condiciones salinas de los sistemas acelulares ($Mg(CH_3COO)_2$ 2mM, KCl 70mM, Tris.HCl. (pH 7,5) 26mM y mercaptoetanol 16mM - Solución J). La concentración de Mg^{++} libre en estos sistemas (2mM) que corresponde a niveles óptimos para la

continuada síntesis de proteínas dirigida por mRNA endógeno (Mg^{++} 2 a 3 mM), permite la estabilización tanto de los ribosomas libres como de los polisomas.

Ensayos previos con este tipo de lisado pusieron en evidencia la necesidad de evitar los procesos de iniciación y terminación de cadenas peptídicas que alteran las proporciones relativas de las poblaciones de polisomas, monómeros y partículas subribosómicas, y que podrían así enmascarar el posible efecto disociante del extracto ribosómico. Se había observado un aumento de los ribosomas monómeros provocado por la desagregación gradual de los polisomas, por simple incubación del lisado durante 10 minutos a 25° (debido probablemente al desbalance entre la terminación de cadenas peptídicas y la decrecida iniciación observada en estos sistemas). No podía tampoco descartarse la posibilidad de alteración en el nivel de subpartículas por participación de las mismas en el proceso de iniciación. Se recurrió entonces al uso de cicloheximida 0,1mM, inhibidor específico de la elongación que estabiliza los polisomas y, por ende, la población ribosómica original, y también al uso de NaF 10mM, inhibidor de la iniciación que impide la reutilización de las subpartículas ribosómicas en la reformación de polisomas. Con estos agregados al sistema acelular descrito, se logró una total conservación de la población de polisomas, y en esas condiciones fué posible apreciar el efecto disociante del extracto ribosómico.

En la Figura 11 se muestran, superpuestos, los trazados de los perfiles ribosómicos de sendas muestras de lisado incubadas con energía y ambos inhibidores, ya sea en ausencia o con la adición del extracto ribosómico crudo. En primer término debe señalarse la total y notable coincidencia en los trazados de la región de agregados pesados, lo que indica que en las condiciones del experimento la presencia del extracto ribosómico no ha provocado ninguna alteración en la población de polisomas. En cambio, sí ha causado una disminución significativa de los ribosomas 80S nativos, y el aumento concomitante de las partículas subribosómicas 40S y 60S, observación que es compatible con la aludida reacción de disociación de los monómeros.

Para obviar los inconvenientes de observación que traía la presencia de los polisomas en estas incubaciones, hemos introducido posteriormente el uso de poblaciones ribosómicas constituidas prácticamente en su totalidad por ribosomas monómeros. Estas se obtenían en cantidades mucho mayores que los monómeros nativos provocando la desagregación de los polisomas por incubación de reticulocitos (M.16) en presencia de NaF 10mM o por incubación del lisado 1:1, o de polisomas purificados en sistemas acelulares (M.17 y M.18). Con los ribosomas resultantes (que tienen gran predominio

de ribosomas 80S) se observó el efecto disociante del extracto ribosómico crudo, manifestado en el aumento de subpartículas a expensas de los monómeros (Figura 12, cuadros A, B y C). Se constató que, como en el ensayo anterior, la disociación era más evidente en presencia de NaF 10mM (Cuadro A₁). El cuadro A₂ muestra, a título comparativo, el efecto del extracto ribosómico en ausencia de NaF: nótese el pequeño aumento de los picos en la zona polisómica, por re formación de los mismos. Se verificó además que el ión fluoruro no produce variaciones "per se", ya que los ribosomas solos, incubados en presencia del mismo no muestran alteraciones con respecto al control.

La utilización de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) en estos experimentos (Figura 12, Cuadro C), permitió visualizar mejor los resultados de la disociación. Ello obedece a que esta preparación, más purificada, está prácticamente exenta tanto de subpartículas (sólo un pequeño pico de 60S) como de material más pesado. Por ello, y por ser asequibles en cantidades razonables, fueron usados en los experimentos posteriores como sustrato de elección para medir la actividad disociante del extracto ribosómico.

El efecto disociante del extracto ribosómico fué medido por planimetría de los registros gráficos a 254nm obtenidos por análisis, en gradientes de sacarosa, de las mezclas de incubación. Se expresó como la disminución del pico de 80S (con respecto al control sin extracto ribosómico), en % del total de ribosomas.

Frecuentemente, en los experimentos en que se mide esta actividad del extracto ribosómico, la disociación de los ribosomas 80S originales produce incrementos, no sólo de las subpartículas, sino que hay también formación de agregados más pesados que 80S. Estos se encuentran habitualmente en una zona del registro gráfico del gradiente que resulta intermedia entre los picos de 80S y dímeros. La naturaleza de esos agregados no está claramente definida: podrían ser productos de la asociación inespecífica de partículas subribosómicas, o bien intermediarios en la reacción de disociación (a semejanza de los observado por Talens y col. (320) en E.coli), o complejos funcionales (229) (monómeros + subpartícula 40S). También es frecuente observar en estos gradientes la aparición de un doble pico en la zona de 40S. Esto podría atribuirse a una heterogeneidad de las partículas subribosómicas, según los observado por Henshaw y col. (254-255). A todos estos componentes les atribuimos el representar productos de disociación formados a expensas de los ribosomas 80S originales, y han sido computados como tales.

R.2.3 Inactivación del extracto ribosómico:

La actividad disociante del extracto ribosómico sobre los ribosomas monómeros se destruye por acción del calor. En la Tabla 4 se observa

que por preincubación del extracto ribosómico a 60° durante 8 minutos, se perdió 90% de su efecto disociante. En forma paralela disminuía en 80% la capacidad del extracto ribosómico de estimular la síntesis de proteínas por ribosomas agotados, en el sistema acelular con componentes solubles definidos (Figura 13).

La pérdida de la actividad disociante se observó también en forma prácticamente total, aún en incubaciones a 53°-55°, durante 5 a 10 minutos. Como en estas condiciones se evitaba la formación de precipitados de proteína coagulada que, en algunos casos, se observaron a 60°, se optó por utilizar dichas condiciones para la obtención del extracto ribosómico inactivado, utilizado en algunos experimentos posteriores.

En un ensayo posterior (Tabla 5) se estudió el efecto de la preincubación del extracto ribosómico durante 10 minutos a distintas temperaturas sobre su capacidad de disociar ribosomas 80S agotados; la actividad disociante se midió por posterior incubación en las condiciones habituales de tiempo y temperatura (10 minutos a 25°). En este experimento se utilizó un extracto desalado por tratamiento con Sephadex G-25. Se observó que ya a la temperatura de preincubación de 37° se producía una disminución de la actividad disociante del extracto ribosómico (medida a 25°) y que esta disminución se hacía más marcada si la preincubación se realizaba a 45°. En base a los resultados anteriores, en los ensayos realizados con posterioridad se siguió utilizando la temperatura de incubación de 25°.

R.2.4 Separación de ambas actividades del extracto ribosómico:

El efecto disociante puede ser separado del efecto estimulante de la iniciación de cadenas peptídicas por simple pasaje del extracto ribosómico crudo a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con una solución de KCl 100mM, Tris.HCl (pH 7,5) 2mM y mercaptoetanol 3mM (Solución I) o por una corta diálisis contra el mismo buffer. Uno u otro procedimiento es suficiente para suprimir la estimulación de la capacidad de reiniciar cadenas; por el contrario, la actividad disociante es resistente a este tratamiento y aparentemente resulta incrementada con el mismo. Esto puede verse claramente en la Tabla 6, donde se muestra que la disociación con respecto al control (Columna I), lograda por agregado del extracto ribosómico crudo (ER-1, línea 1), es notablemente aumentada cuando el extracto ribosómico se dializa (ER-d, línea 2) o es desalado por tratamiento con Sephadex G-25 (ER-G25, línea 3) (ver también Figura 14). Pero mientras el extracto ribosómico crudo tiene una buena actividad estimulante para la incorporación de valina-¹⁴C en el sistema acelular (aproximadamente unas 60 veces la incorporación basal), las preparaciones dializadas o desaladas en Sephadex

G-25, la han perdido completamente (Columna II, líneas 1, 2 y 3); de esto se deduce que sólo se ha conservado la actividad disociante.

En ensayos en que se realizó una diálisis más prolongada (15 horas, 17 horas y hasta 24 horas), se observó que el extracto ribosómico no perdía su actividad disociante por este tratamiento.

No se conocen las causas de la pérdida de la actividad promotora de la iniciación por diálisis o desalado en Sephadex, tratamientos que, por otra parte, llevan al mencionado aumento aparente de la actividad disociante. Es probable que esta actividad aumentada sea reflejo de la verdadera capacidad disociante del extracto ribosómico.

La separación de la actividad disociante respecto de la de estimulación se observó también de otro modo: cuando se extrajeron ribosomas totales que habían sido conservados a -80° durante 4 meses o más (en lugar de ribosomas totales frescos, conservados una semana), el extracto ribosómico resultante carecía totalmente de actividad estimulante, pero su capacidad disociante era la normal (crudo, o tratado con Sephadex G25).

En la preparación del extracto ribosómico dializado (ER-d) de reticulocitos, hemos observado frecuentemente la aparición de turbidez cuando la concentración iónica es disminuida a KCl 0,1M. Esta desaparece por adición de KCl 1M (por lo que las diluciones del extracto ribosómico para determinaciones espectrofotométricas, se hicieron habitualmente en ese medio). No hemos investigado la naturaleza de este material insoluble en KCl 0,1M).

Los extractos ribosómicos desalados pudieron ser conservados a -80° durante 20 días sin mayor pérdida de actividad.

R.2.5 Condiciones en que se extrae la actividad disociante a partir de los ribosomas totales:

Los extractos obtenidos de la población ribosómica total cruda (producto de la simple sedimentación de un lisado de reticulocitos), tanto con KCl 0,5M como 1,0M, tienen un efecto disociante bien evidente. Según puede verse en la Tabla 7, su eficiencia es mayor en el primer caso. Coincidiendo con esto, en general los extractos en KCl 0,5M han tenido mayor actividad disociante. Esta observación se realizó posteriormente a muchos de los experimentos presentados en este trabajo, que se habían llevado a cabo con extracto ribosómico con KCl 1M. Para obtener buenas actividades disociantes los ribosomas totales deben ser extraídos sin sufrir otras manipulaciones después de su aislamiento a partir del lisado. Cuando previamente a la extracción, los ribosomas totales eran lavados por sedimentación en solución F con el agregado de KCl 70 ó 150mM (en presencia de $Mg(CH_3COO)_2$ 2mM). el

efecto disociante del extracto obtenido con KCl 1M disminuía en forma bien evidente (aproximadamente a 1/4 del efecto del extracto ribosómico obtenido de ribosomas sin lavar). Aumentando a 250mM la concentración de KCl de la solución para el previo lavado de los ribosomas (en este caso en presencia de $Mg(CH_3COO)_2$ 10mM para no alterar en forma excesiva la relación K^+/Mg^{++}), el extracto ribosómico obtenido carece totalmente de efecto disociante. No sabemos el mecanismo por el cual ese lavado previo parece así extraer o inactivar en la población ribosómica el factor(es) responsable del efecto disociante, en forma parcial (líneas 3 y 4) o total (línea 5), según la concentración de ión K^+ utilizada. Debe hacerse notar que en este experimento, las condiciones de sedimentación de los ribosomas lavados aseguraban la efectiva recuperación de todas las partículas en la muestra inicial, por lo que no podría atribuirse a deficiencias en ese sentido la pérdida de la actividad disociante en el extracto.

R.3 Algunas propiedades de la reacción de disociación:

R.3.1. Curso de la reacción y efecto de la temperatura:

Se estudió el desarrollo de la reacción de disociación en el tiempo. En la Figura 15 se muestra que a 25° la disociación ha prácticamente llegado a su término ya a los 10 minutos de incubación, pero que a los 5 minutos el grado de disociación alcanzado es la mitad del final. El resultado de 10 minutos a 37° confirma el carácter limitado de la reacción. Este tipo de observaciones ha sido repetido en varios experimentos.

La temperatura de la reacción en el rango entre 0° y 37° determina el grado de disociación alcanzado a 10 minutos (Figura 16). La dependencia de la temperatura que se observa en la reacción es típica de las reacciones bioquímicas mediadas por proteínas. La sola incubación de los ribosomas a distintas temperaturas hasta 45°, no provoca su disociación. En cambio, en presencia del extracto ribosómico hay un aumento progresivo de la disociación con el aumento de la temperatura. Ya a 0° la reacción de disociación, si bien pequeña, no es nula. Por encima de 37°, hay una disminución del efecto disociante, lo cual se corresponde con la observación, realizada anteriormente, sobre la inactivación parcial de la actividad disociante del extracto ribosómico a temperaturas entre 37° y 45° (Tabla 5).

En base a los resultados anteriores se adoptó como condiciones para medir la disociación una incubación a 25° durante 10 minutos.

R.3.2 Efecto de cantidades crecientes del extracto ribosómico:

El efecto disociante depende de la cantidad de extracto ribosómico presente. Se puede observar en la Figura 17 los resultados de tres ex-

perimentos reunidos; la disminución de los ribosomas monómeros 80S, respecto del control (el grado de disociación), crece con el aumento de la relación ER:Ab; sin embargo la curva tiende rápidamente a una meseta. Con las preparaciones del ER utilizadas en estos experimentos, la disociación alcanzaba a un 23%. En otros experimentos, con relaciones ER:Ab no mayores de 4 a 6, se han obtenido disociaciones de hasta 40 y 50% (ver Tabla 8).

Las limitaciones de la concentración del ión K^+ del sistema acelu- lar (70mM) y del mínimo de ribosomas necesarios para obtener registros grá- ficos adecuados, impidieron que en los ensayos con extracto ribosómico cru- do se aumentara la relación ER:Ab más allá de un valor de 6. Pero utilizando extracto ribosómico dializado ER-d (cuya concentración de K^+ se bajó a 0,1M), pudo observarse que cantidades muy grandes del extracto ribosómico (se al- canzó una relación 11,4) llegan a ser en algunos casos, francamente inhibi- torias (Tabla 8). Esto sugiere que existen componentes que resultan inhibi- torios para la disociación y que al aumentar su concentración tienden a con- trarrestar el efecto disociante.

Según hemos visto, la reacción de disociación ya se ha completado sensiblemente en 10 minutos a 25°. En un experimento en que la disminución de 80S por agregado del extracto ribosómico fué de 28%, el reagregado de extracto ribosómico fresco y posterior reincubación, en iguales condiciones de tiempo y temperatura, llevó a un aumento de la disociación (disminución de 80S, en % del total, con respecto al control, 80S sin extracto ribosómi- co = 41) Esto indicaría que aún existen, después de la primera incubación, ribosomas 80S susceptibles al efecto disociante del extracto ribosómico y que el primer agregado de éste no había bastado. Esta observación, sumada a la dependencia que la magnitud de la disociación muestra con respecto a la relación ER:Ab, sugiere que el factor de disociación es utilizado y com- prometido en el transcurso de la reacción, apoyando la idea de una acción estequiométrica, más que catalítica, del extracto ribosómico.

A.3.3 Efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas:

Se probó el efecto de inhibidores que actúan en la iniciación o en distintos pasos de la elongación de cadenas peptídicas, sobre la reac- ción de disociación promovida por el ER-G25. Ninguno de ellos: cicloheximi- da, esparsomicina, puromicina, ácido fusídico, o NaF, usados a concentra- ciones en que inhiben fuertemente la síntesis de proteínas, tiene efecto alguno sobre la disociación (Tabla 9).

En otro experimento, con ER-d, se probó la acción de Pactamicina (inhibidor de la iniciación y de la elongación a la concentración utiliza- da en el ensayo: 1×10^{-4} M (313; 321)) y no se observó tampoco efecto inhi-

bitorio alguno, confirmando los resultados de I.Sadnik (322).

Cuando se intentó observar el efecto de ATA sobre la disociación de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) promovida por el extracto ribosómico, se encontró que concentraciones de 10^{-4} M y aún 10^{-5} M, producían la alteración de los ribosomas monómeros sólo en los controles. A semejanza de lo observado por Lebleu y col. (232) en reticulocitos y por Grollman y col. (104) en E.coli, la presencia de ATA inducía una modificación de la constante de sedimentación (S) de los ribosomas monómeros (que, en el caso de ribosomas de eucariotes, sedimentan entonces aproximadamente con 60S), apareciendo picos de S intermedio en los registros gráficos de los gradientes. Este efecto colateral del inhibidor, que enmascara la disociación, no puede atribuirse a una disminución de la concentración de Mg^{++} producida por una supuesta acción secuestrante del ATA, ya que, como lo puntualizaron Lebleu y col. (232), si la cantidad de subpartículas 40S no cambia, el aumento del pico de 60S no puede ser atribuido a la disociación de los ribosomas 80S. El agregado del ER-G25 pareció reconstituir los ribosomas originales, revirtiendo o previniendo la acción del inhibidor. Heiberg y col. (323), al estudiar el mecanismo de la inhibición de la unión de ribosomas a RNA por ATA (10^{-5} M) habían observado la capacidad del mismo de modificar proteínas citoplasmáticas en tal forma que eran incapaces de unirse a RNA, y sugirieron que el efecto del inhibidor era debido a una interacción con la porción proteica de los ribosomas. Esto nos llevó a pensar que posiblemente el agregado del extracto ribosómico protegía a los ribosomas 80S e impedía su alteración en presencia de ATA, debido al secuestro del inhibidor por su reacción directa con los componentes proteicos del extracto ribosómico, y la consiguiente disminución de su concentración efectiva. Algo semejante parecen sugerir observaciones hechas con distintos sistemas acelulares. Según hemos visto en experimentos (no descritos en este trabajo) llevados a cabo con sistemas crudos (sistema acelular para lisado no fraccionado o reconstituido con polisomas y sobrenadante) y purificados (sistema acelular con componentes solubles definidos) para la incorporación de valina-¹⁴C en proteínas, el efecto de una misma concentración de ATA puede variar de acuerdo a la composición de proteínas del medio. Concentraciones de ATA que en los sistemas crudos inhiben selectivamente la iniciación (3×10^{-4} M), agregadas a un sistema acelular más purificado provocan también la inhibición de la elongación, con el cese prácticamente total de la síntesis de proteínas.

Ensayamos entonces agregar a las mezclas de incubación extracto ribosómico inactivado por incubación durante 5 minutos a 55° (se constató su efecto disociante nulo sobre los ribosomas 80S control). En esas condicio-

nes, en presencia de concentraciones de ATA entre 3 y 10×10^{-5} M, los controles no se alteraban, lo que contrastaba con las modificaciones producidas por el inhibidor sobre esos mismos ribosomas, en ausencia del extracto ribosómico inactivado por el calor. Conseguidos los controles adecuados, se midió entonces la disociación por agregado de igual cantidad de ER-G25, pero fresco, en presencia de ATA y pudo observarse que si bien una concentración de 3×10^{-5} M no tiene efecto alguno sobre la capacidad disociante del extracto ribosómico, a concentraciones mayores (5 a 8×10^{-5} M), hay una inhibición creciente, que llega a ser total cuando se agrega ATA 1×10^{-4} M a la mezcla de incubación (Figura 18).

Sin embargo, una preincubación del extracto ribosómico durante 30 minutos a 0° , en presencia de ATA 10^{-4} M, no llevó a la inactivación de su efecto disociante sobre los ribosomas 80S agotados (80Sag-B), medido por incubación en el medio acelular habitual. Por el contrario, la disociación observada fué igual a la que se obtenía por incubación directa del extracto ribosómico y los ribosomas en presencia de ATA $1,33 \times 10^{-5}$ M, que era la concentración final resultante en la mezcla total de incubación al agregar el pequeño volumen de extracto ribosómico preincubado con ATA 10^{-4} M.

R.3.4 El efecto disociante se ejerce sólo sobre ribosomas 80S libres:

En la sección R.2.2, en experimentos realizados con extracto ribosómico crudo, ya se había visto que al actuar sobre una población de ribosomas totales de un lisado, el efecto disociante se ejercía solamente sobre los monómeros 80S nativos. Al introducir el uso de extractos ribosómicos desalados (ER-G25), se reinvestigó si, además de los ribosomas monómeros, podían ser sustrato de la reacción las unidades ribosómicas de polisomas.

Para poder dilucidar este punto en forma inequívoca, debía asegurarse que durante la incubación y otras manipulaciones experimentales, los polisomas no sufrieran degradaciones que enmascarasen los procesos de disociación investigados. Para sortear esa dificultad, no sólo se tomaron precauciones especiales en la preparación de los polisomas para evitar rupturas mecánicas, sino que, como anteriormente, se recurrió, además, al uso de inhibidores en la incubación. Los polisomas purificados, una vez obtenidos, se resedimentaron 25 minutos a 50.000 rpm (rotor 50, Spinco), para enriquecer la preparación en sus componentes más pesados. Estos polisomas se incubaron en presencia de inhibidores de la elongación (cicloheximida 1mM y esparsomicina 0,1mM) para evitar la degradación de los polisomas, y de la iniciación (ATA 0,03mM) para evitar la asociación de las subpartículas a polisomas. La concentración de ATA utilizada no inhibe la disociación (R.3.3); para evitar que la misma alterase el comportamiento de las partículas ribo-

sómicas de control en la sedimentación, se agregó también extracto inactivado por el calor.

Con todas estas precauciones pudo reducirse la proporción de 80S presentes habitualmente en las preparaciones de polisomas o que aparecen durante la incubación de los mismos (ver Figura 19, Control). Pudo observarse entonces que, por agregado del extracto ribosómico, solamente aparecía disminuido el pico de absorbancia a 254nm correspondiente a 80S, con aumento concomitante de los picos correspondientes a las subpartículas de 40S y 60S, mientras que los polisomas permanecían inalterados. Este resultado, coincidente con la observación realizada con extracto ribosómico crudo y ribosomas totales del lisado, evidencia que sólo los ribosomas 80S libres son disociados por efecto del extracto ribosómico, mientras que las unidades ribosómicas activas, en los polisomas, no son susceptibles de disociación.

R.3.5 Comparación del efecto disociante sobre distintos tipos de ribosomas monómeros 80S:

Se ensayó el efecto disociante del extracto ribosómico sobre ribosomas 80S obtenidos por distintos procedimientos. En especial se comparó el efecto disociante del extracto sobre los ribosomas 80S agotados (80Sag-B), obtenidos en condiciones iónicas fisiológicas y utilizados habitualmente en los ensayos, con el efecto obtenido al actuar sobre los ribosomas 80S nativos (del tipo de los utilizados en los experimentos con ^{32}P), que son constituyentes normales de la población ribosómica total de los reticulocitos.

Se utilizaron (Tabla 10): (a) ribosomas 80S nativos, libres, que se aislaron de un lisado de células normales por fraccionamiento en gradientes de sacarosa, preparativos; (b) ribosomas 80S obtenidos de células enteras incubadas con NaF 10mM, hasta provocar el desarmado de los polisomas, seguido de posterior lisis y sedimentación (80S-F); (c) ribosomas 80S agotados, obtenidos a partir de polisomas aislados de gradientes preparativos, que fueron incubados en un sistema acelular completo, hasta agotamiento de su actividad de síntesis de proteínas, purificados luego por fraccionamiento en gradiente de sacarosa (80Sag-B); (d) ribosomas 80S reasociados, obtenidos de ribosomas 80S agotados, disociados por incubación a 0° en altas concentraciones de KCl (0,5M) y reasociados bajando la concentración de K^+ a 60mM (Este procedimiento, que implica una disociación y reasociación de los ribosomas, es una modificación del método de Falvey y Staehelin (7) para obtener subpartículas ribosómicas. Los ribosomas así obtenidos están más lavados que los aislados por los procedimientos comunes).

Se observó que la magnitud de la disociación sobre ribosomas monó-

meros libres obtenidos por tan distintos procedimientos era semejante en todos los casos (Tabla 10).

Es importante señalar además que con todos estos tipos de ribosomas se evidenció un marcado incremento del efecto disociante del extracto ribosómico por agregado de ATP 1mM (que suple las necesidades de energía (ver secciones siguientes)).

R.3.6 Requerimientos de energía:

En los experimentos llevados a cabo con ribosomas $80S-^{32}P$ se había observado (R.1.4) que para que ocurriera la incorporación de los mismos a polisomas era necesaria la presencia, no sólo del extracto ribosómico, sino también de energía. Quedaba en pie el interrogante de si este requerimiento refleja una esencial participación de la energía en el proceso de disociación de los monómeros por efecto del extracto ribosómico.

En ensayos preliminares del efecto disociante del extracto ribosómico crudo sobre los ribosomas monómeros, se habían obtenido indicios de que la presencia de energía influía en la magnitud de la disociación; en efecto, se había observado en forma repetida, que el limitado efecto disociante propio del extracto ribosómico crudo sin otras adiciones, se veía aumentado cuando en la mezcla de incubación se introducía energía (generalmente en forma de ATP.Mg + GTP.Mg, en concentraciones 1mM y 0,2mM respectivamente).

R.3.6.1. Efecto de la presencia de energía en la actividad disociante de distintos extractos ribosómicos:

Para determinar con mayor certeza el grado de dependencia de la reacción de disociación respecto de la energía, se utilizó preparaciones del extracto ribosómico que habían sido desaladas ya sea mediante diálisis (ER-d) o por gel filtración a través de una columna de Sephadex-G25 (ER-G25). En todos los casos la actividad disociante de esas preparaciones (en ausencia de energía) fué menor que la del respectivo extracto crudo; frecuentemente, el efecto disociante fué pequeño, y en algunos casos prácticamente nulo (Figura 20).

Con estos preparados se ha mostrado en todos los casos que la disociación tiene una muy marcada dependencia respecto de la presencia de energía. Este resultado se observa en la figura 20 (incubación con ER-d + energía), y en la Tabla 11, en que se compara la acción del ER-d y ER-G-25, con la de su extracto ribosómico crudo original, en la disociación de ribosomas 80S agotados, sin y con energía. La fracción de disociación atribuible a esta última, llegó al 42% y esa contribución dependía de la presencia del ER: en su ausencia, el efecto disociador de la energía sobre los monó-

meros era muy pequeña (14%).

A.3.6.2 Acción estimulante de diversos nucleótidos:

Se llevaron a cabo experiencias para dilucidar si el incremento de la disociación por la energía era provocada por la presencia de ambos nucleótidos agregados a la mezcla de incubación (ATP + GTP), o a uno de ellos en particular. Los resultados (Tabla 12) muestran que, tanto con ER-d (columna I) como con ER-G25 (columna II), mientras el agregado de GTP sólo (0,2mM) no produce sensibles diferencias respecto a la disociación promovida por el extracto ribosómico en ausencia de nucleótidos, la actividad disociante es en cambio estimulada en forma marcada por la presencia de ATP sólo (1mM). Por otra parte, el agregado de ambos nucleósido-trifosfatos no produce mayores variaciones con respecto al efecto del agregado de ATP sólo (ello aún en un ensayo en que la concentración del GTP agregado había sido 1mM). De estos resultados surge claramente que el efecto observado es debido exclusivamente a la presencia de ATP en la mezcla de incubación, dado que el GTP no tiene efecto sinérgico ni aditivo visible.

Las diferencias observadas en presencia de los nucleósido-trifosfatos, no puede atribuirse a un efecto secuestrante del ión Mg^{++} ya que los mismos han sido agregados como compuestos de Mg (XTP.Mg). Además los controles, que se efectúan con las mismas concentraciones de nucleósido-trifosfatos, pero en ausencia del extracto ribosómico, no muestran variaciones importantes con respecto a los ribosomas 80S incubados sin energía. En los casos en que, por agregado de energía, se observaron variaciones medibles, se especificó su valor en el experimento respectivo. En algunos ensayos el efecto disociante computado es la disminución de los monómeros 80S en presencia del extracto ribosómico, referido a los mismos ribosomas en presencia del nucleósido-trifosfato utilizado en cada ensayo, tomado como control; en otros el control ha sido de ribosomas 80S sólo (en ausencia de extracto ribosómico y de nucleósido-trifosfatos).

Para confirmar los resultados anteriores se realizó un experimento en el que se estudió el efecto de los distintos nucleósido-trifosfatos sobre la acción disociante del extracto ribosómico (Tabla 13). (Cada uno de ellos se agregó a una concentración 1mM). Puede observarse que el ATP es el único que mostró una estimulación bien definida. El UTP y el CTP, y, en particular, el GTP, son inactivos.

En otro experimento para dilucidar si el ATP podía ser sustituido por otros fosfatos de adenosina (Tabla 14), se observó que, en iguales condiciones, el ADP y el AMP (ambos en concentración 1mM) no son activos en la estimulación de la disociación.

R.3.6.3 Determinación de los niveles óptimos de ATP:

Se investigó cuál era la concentración de ATP en las mezclas de incubación que promovía una mayor estimulación de la disociación de los ribosomas monómeros por efecto del extracto ribosómico. Como se muestra en la Figura 21, dentro del rango de 0,2mM a 2mM, hay una dependencia del efecto disociante del extracto ribosómico respecto de la concentración de ATP presente (agregado siempre como ATP.Mg). Se ha encontrado que en este sistema se alcanza el nivel óptimo entre 1 y 2mM, y que concentraciones mayores no incrementan la disociación.

Se ha encontrado además que, cuando se agrega un sistema generador de nucleósido-trifosfatos (creatina fosfato + creatina quinasa), hay un efecto máximo, aún con niveles de ATP tan bajos como 0,2mM (Figura 21).

R.3.7 Dependencia de la concentración de ión Mg^{++} :

Al igual que lo observado con el factor de disociación de *E.coli* (84) y de otros extractos ribosómicos de eucariotes (223; 250-251), el efecto disociante del extracto ribosómico de reticulocitos disminuye en forma marcada al aumentar la concentración de Mg^{++} . En la Tabla 15 se describe un experimento de disociación realizado en concentraciones de Mg^{++} entre 1 y 5mM: el grado de disociación entre 1 y 2mM (21%), disminuye ya en Mg^{++} 3mM, y en el nivel de 5mM, es menos de 1/3 de los primeros.

En concentraciones extremas de Mg^{++} hay una alteración de los ribosomas monómeros en los controles. Se sabe que por disminución de la concentración de Mg^{++} (4; 5; 12; 13), se obtiene una disociación no fisiológica "in vitro". En concordancia hemos observado que con Mg^{++} 0,5mM hay una disociación en los controles (ribosomas 80S en ausencia del extracto ribosómico) con aparición de subpartículas derivadas. Esta alteración nos impidió determinar el efecto del extracto ribosómico a esa concentración de Mg^{++} . Por otra parte, a altas concentraciones del mismo hay asociaciones inespecíficas de ribosomas monómeros en partículas más pesadas. Esto comienza a visualizarse en concentraciones de Mg^{++} 5mM y a 7mM es bien evidente. El rango de concentraciones de Mg^{++} en que se observa la disociación por efecto del extracto ribosómico, está dentro de los niveles fisiológicos (2 a 3mM) para la síntesis de proteínas en el sistema acelular de reticulocitos de conejo.

R.3.8 Modo de acción del ATP:

Se intentó reconocer el modo de acción a través del cual el ATP ejerce el efecto de estimulación de la disociación promovida por el extracto ribosómico.

Un aspecto de esta cuestión es establecer de qué manera es utili-

zado el ATP. Para ello se estudió entonces si el mismo es reemplazable en la disociación, por análogos del ATP en los cuales una de las uniones pirofosfato ha sido reemplazada por una unión metilén-difosfonato: el adenosín 5'-trifosfato-alfa,beta-metilén-difosfonato (AMPCPP) y el adenosín 5' trifosfato-beta,gamma-metilén-difosfonato (AMPPCP). Con estos análogos es de esperar, que en reacciones enzimáticas que involucran la ruptura del puente pirofosfato alfa-beta ó beta-gamma, su reemplazo por un puente metilénico impida la reacción en que está involucrado el respectivo puente de pirofosfato; un uso similar se ha hecho del análogo del GTP, GMPPCP, en diversos pasos de la síntesis de proteínas.

En este experimento se utilizó un extracto ribosómico dializado (ER-d) exhaustivamente (durante 17 horas), contra el medio habitual, solución I (10 cambios; volumen total 4 litros), pero con el agregado de carbón activado (Norit A, concentración final 1 mg/ml), en el medio de diálisis, para favorecer la adsorción de nucleótidos y asegurar una mejor eliminación de los nucleótidos endógenos.

De los dos análogos ensayados (Tabla 16), el AMPPCP (beta,gamma-metilén) es capaz de reemplazar muy eficientemente al ATP en su efecto de ^{la} ~~promover~~ disociación (82% de la obtenida con ATP a igual concentración; 1mM). El AMPCPP (alfa,beta-metilén), en cambio, es esencialmente inactivo (8%). Este resultado señala que en la acción del ATP es importante la existencia de la unión pirofosfato entre los fosfatos alfa y beta y que, en cambio, el otro puente pirofosfato (entre beta y gamma), es reemplazable por un puente metilénico, y sugiere que la acción del ATP podría ocurrir a través del cliveje de la unión entre los fosfatos alfa y beta.

El otro aspecto considerado fué si la acción del ATP sobre la disociación requiere una interacción del ATP conjuntamente con ambos componentes del sistema, los ribosomas 80S y el extracto ribosómico, o, por el contrario, esa interacción se da inicialmente con uno u otro excluyentemente. Para explorar estas posibilidades se diseñó un experimento en el que se utilizó la propiedad de la reacción global de disminuir considerablemente el grado de disociación de los ribosomas cuando la concentración de ATP era menor que 1mM. Se utilizaron dos tipos de incubaciones:

(a) Preincubación, ya sea del extracto ribosómico o de los ribosomas, en el medio salino acelular (Solución J) y con ATP.Mg 1mM, durante 10 minutos a 25°, y posterior dilución con dos volúmenes del mismo medio, con el agregado del componente faltante, respectivamente ribosomas 80S ó extracto ribosómico (concentración final de ATP.Mg 0,33mM), incubando esta mezcla en condiciones de tiempo y temperatura iguales a las de la preincubación.

(b) Incubación directa conjunta de los ribosomas 80S + extracto ribosómico

en la forma habitual (como lo segunda incubación en (a)), con ATP.Mg 1mM o bien 0,33mM, durante 10 minutos a 25°.

Se observó que el efecto disociante del extracto ribosómico en el experimento del tipo (b) depende de la concentración de ATP en la mezcla de incubación (Tabla 17, líneas 1, 2 y 5). Pero al preincubar los ribosomas 80S con ATP 1mM, la posterior incubación (ATP.Mg 0,33mM final;(línea 4)) en condiciones que son iguales a las del párrafo (b)) mostró un efecto disociante mayor del esperado en una incubación directa con esa concentración final de ATP en el medio; ese efecto fué equivalente al observado en (b) (incubación directa) con ATP.Mg 1mM. Si por el contrario era el extracto ribosómico el que se preincubaba con ATP.Mg 1mM (línea 3), el efecto disociante obtenido al agregarlo a los ribosomas 80S fué el correspondiente a la concentración final de ATP resultante en la mezcla de incubación (0,33mM) (Equivalente a la incubación de la línea 2). Estos resultados fueron coincidentes con los de otro experimento del mismo tipo, pero más limitado, en el que sólo se había hecho la preincubación de los ribosomas 80S con ATP.Mg 1mM y se había observado que el efecto disociante del extracto ribosómico sobre estas ribosomas (con ATP diluído) era igual que el obtenido en la incubación directa con ATP 1mM (control).

Los resultados obtenidos, que consideramos preliminares, inducen a pensar que la acción del ATP se ejerce directamente sobre los monómeros 80S, en una etapa previa a la intervención del factor(es) del extracto ribosómico.

DISCUSSION

En eucariotes, los ribosomas monómeros 80S libres están presentes en el citoplasma de todas las células examinadas. Su rol metabólico y su relación con el ciclo polisómico han sido objeto de numerosos estudios y discusiones. Estas partículas no poseen cadenas peptídicas crecientes y cuando su actividad de síntesis de proteína se mide en sistemas acelulares con un medio de reacción semejante al fisiológico (Mg^{++} 2 a 3 mM), la misma es prácticamente nula, aún en presencia de mensajeros artificiales como el poli-U. Se sabe, sin embargo, que en estos mismos sistemas con poli-U, pero a altas concentraciones de Mg^{++} no fisiológicas (5 a 10 mM), los monómeros llegan a ser activos y sintetizan cadenas peptídicas.

Se ha observado en forma repetida que en eucariotes los monómeros libres no tienen una participación activa en el ciclo polisómico (225; 226; 242-c; 260; 263-b; 267; 271), y ciertos estudios con precursores de RNA sugieren que son una forma pasiva de almacenaje (263). Sin embargo existen evidencias que permiten asignarles un rol potencial en la síntesis de proteínas. En efecto, los monómeros libres, que en las células se acumulan bajo una variedad de condiciones metabólicas adversas (267; 268; 269; 312), pueden reentrar en polisomas en condiciones que favorezcan una mayor velocidad de síntesis (312; 226; 267; 269).

Nosotros corroboramos esta última conclusión al constatar que (como lo mostraran inicialmente Marks y col. (269)) los monómeros acumulados en reticulocitos enteros por efecto del ión fluoruro, estaban directamente involucrados en la reformación de polisomas durante el proceso de recuperación de la capacidad de síntesis de proteínas, una vez eliminado el inhibidor (Figura 3). En esas condiciones, pues, los monómeros libres pueden actuar como precursores de unidades ribosómicas activas y ser transferidos a polisomas, demostrando su convertibilidad metabólica.

Los estudios aquí presentados se han dirigido a la búsqueda de un camino que permita la utilización de los ribosomas monómeros para la formación de polisomas en condiciones fisiológicas.

En primer término debemos referirnos a la elección de condiciones experimentales para las observaciones en sistemas acelulares y señalar la importancia que tiene para el significado de los experimentos el medio iónico y en especial las concentraciones de Mg^{++} y de K^+ . Ya habíamos señalado que variaciones de Mg^{++} respecto del nivel fisiológico conducen a que partículas ribosómicas normalmente inactivas adquieran la capacidad de síntesis de

de uniones peptídicas (caso de la traducción de poli-U); sin embargo, en esas condiciones no son capaces de discriminar señales de iniciación ni las requieren. Precisamente el nivel de ese catión en el medio se ha utilizado como un criterio decisivo para dilucidar los mecanismos naturales de iniciación de síntesis de proteínas tanto en bacterias como en eucariotes, y se ha establecido la necesidad de trabajar con concentraciones bajas de Mg^{++} para reproducir los mecanismos fisiológicos. En nuestro caso todos los experimentos han sido realizados con Mg^{++} 2-2,5 mM y K^+ 70 mM, condiciones en las que, en el sistema acelular de reticulocitos es máxima la reiniciación de la síntesis de cadenas peptídicas de globina, y se consideran semejantes a las que imperan en el medio intracelular normal.

Ya se han expuesto (I.5.3; I.6) las pruebas que existen para proponer, en eucariotes, un modelo de ciclo polisomas-partículas subribosómicas, que lleva a la repetida síntesis de proteínas.

En el mismo, las unidades ribosómicas de los polisomas tienen como precursoras directas a las partículas subribosómicas nativas. Ello fué inicialmente sugerido por Bishop (3) para el sistema de reticulocitos y observado en nuestro laboratorio por Zylber (316).

Este modelo ha sido corroborado por los experimentos que hemos llevado a cabo utilizando partículas subribosómicas marcadas con ^{32}P , en un sistema acelular con componentes definidos, según Allen y Schweet (308). Este tipo de sistema es prácticamente carente de factores de iniciación. Utilizando estas subpartículas (fracción 40S-60S- ^{32}P (Figura 4) ó 40S- ^{32}P y 60S- ^{32}P aisladas (Tabla 1)) hemos verificado que, en esas condiciones de síntesis de proteínas, las mismas se asocian a polisomas.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en sistemas acelulares de reticulocitos de conejo (3; 263; 264; 217; 228; 229; 232; 316); al mismo sistema con subpartículas de células de tumor ascítico de Ehrlich (254-255) o de hígado de rata (233); en el sistema acelular de músculo de embrión de pollo (197), en células enteras HeLa (225; 260; 262-a); en células L (261) y en levaduras (148).

Para la incorporación de las partículas subribosómicas en polisomas se requiere, en gran medida, la presencia de energía. En efecto, su omisión provocó, en nuestro experimento, la reducción de la incorporación de radioactividad- ^{32}P a agregados pesados, a un tercio de la obtenida en su presencia.

Esta dependencia del efecto de energía había sido ya observada (316) y fué corroborada además por los resultados de Ottolenghi y col (318) en lisados de reticulocitos: al agregar energía se duplicaba la velocidad de inter-

cambio de $40S-^{32}P$ con la fracción polisómica. También en lisado de reticulocitos, pero con subpartículas $40S-^3H$ de hígado de rata (233) se observó que su incorporación a polisomas era dependiente de energía (ATP + GTP + fosfoenolpiruvato + piruvato quinasa). El requerimiento de energía reflejaría por una parte la necesidad de funcionamiento del sistema (procesos de elongación dependientes de energía) para generar en el mRNA sitios de iniciación vacantes que permitan la unión de subpartículas ribosómicas a los polisomas; asimismo indicaría el requerimiento de GTP y Met-tRNA_f para la formación de los complejos de iniciación.

A diferencia del comportamiento de las partículas subribosómicas nativas, en idénticas condiciones los ribosomas 80S nativos no son capaces de incorporarse a polisomas en el sistema acelular con lisado enriquecido en polisomas. La observación fué realizada en el experimento de la Figura 5-B, en que los ribosomas $80S-^{32}P$ permanecían prácticamente inalterados, pese al funcionamiento del sistema en la síntesis de proteínas. Estos resultados indican la incapacidad de los monómeros de actuar, en esas condiciones, como precursores de la iniciación de la síntesis de proteínas. Los mismos experimentos señalaron también que los ribosomas monómeros no se disociaron espontáneamente a subpartículas ni intercambiaron subunidades con la población de subpartículas nativas presentes en la preparación de polisomas no marcados.

Estos resultados coinciden con observaciones anteriores sobre la relativa pasividad de los monómeros comparados con las subpartículas nativas, en sistemas acelulares con lisados crudos, (que contienen factores de iniciación), ya sea en activa síntesis proteica en estado de flujo estacionario (Adams y col (242-c)) o en el proceso de reiniciación (Sard (217)). También concuerdan con las indicaciones sobre la falta de equilibrio metabólico con polisomas o con subpartículas nativas, en células de mamífero en estado de flujo estacionario (225; 260; 223), o la falta de un rápido equilibrio de disociación-asociación entre los monómeros y subpartículas durante los aumentos de concentración de los primeros en células enteras (Figura 3-C).

En cambio, se plantea una aparente divergencia con el resultado del experimento en células enteras (Marks y col. (269); Figura 3 D y E), en que los ribosomas 80S acumulados por bloqueo de la iniciación, pueden reentrar en polisomas durante el proceso de recuperación en el que predomina la iniciación. Asimismo, recientemente Ottolenghi y col. (318) han observado que al incubar un lisado de reticulocitos no fraccionado (semejante a nuestros lisados 1:1 (M.6)) con la adición de ribosomas monómeros $80S-^{32}P$ nativos, pero sin agregado de energía, junto con una decrecida síntesis de proteínas, hay un lento

proceso de utilización de los monómeros para la formación de polisomas.

La diferencia de comportamiento de los ribosomas en la célula o en el sistema acelular cuando están en flujo estacionario o cuando realizan preferencialmente la reiniciación, sugieren que hay ciertas condiciones que se dan en células enteras o en lisados no fraccionados, que permiten que a veces los monómeros actúen como precursores de unidades en polisomas para la síntesis de proteínas.

Por otra parte, frente a la incapacidad de los monómeros para actuar en ciertos sistemas acelulares, la potencial actividad de los mismos en las células enteras, (o en lisados (318)), plantea, entre otras posibilidades, la de que ellas posean algún componente que, en los sistemas acelulares reconstruidos con fracciones aisladas, esté inactivado, o sea deficitario o directamente esté ausente, y cuya disponibilidad determinaría la capacidad de los ribosomas SOS de entrar en los polisomas.

Los trabajos de Miller y Schweet (173 a y b) mostraron que, en un sistema acelular de reticulocitos con componentes purificados, podía obtenerse una prolongación de la síntesis de proteínas, a través de la continuada reiniciación de cadenas peptídicas, mediante el agregado de un extracto de ribosomas totales en KCl concentrado. Ese extracto restauraba la perdida capacidad de iniciación de esos sistemas y promovía la reactivación de preparaciones de ribosomas agotados. Cohen (175 a y b) completó estas observaciones mostrando que durante la acción del extracto ribosómico se producía la reformación de polisomas a expensas de los monómeros agotados.

Los resultados de los experimentos presentados en este trabajo, basados en esos estudios de Miller y Schweet, y Cohen, indican que la movilización de los ribosomas monómeros en el sistema acelular y su participación en la formación de polisomas y la iniciación de la síntesis peptídica, se logran a través de la disociación a partículas subribosómicas activas en la formación de complejos de iniciación. La disociación ocurre mediante la acción de un factor (es) de disociación, en el extracto ribosómico, sobre los ribosomas monómeros libres, en presencia de ATP, en un medio iónico con Mg^{++} y K^+ apto para la síntesis peptídica, y en condiciones en que ésta tiene lugar.

Hallazgos en el sistema de reticulocitos relacionados a los nuestros han sido asimismo comunicados por Lubsen y Davis (187; 222; 223) quienes encontraron un factor de disociación en el extracto ribosómico y lo caracterizaron, Mizuno y Rabinovitz (224) que con un factor similar al anterior han descrito muy recientemente la necesidad de energía para la reacción de disociación, y, como ya se mencionara, Ottolenghi y col (318) que obtuvieron

evidencias indirectas de la disociación de ribosomas monómeros. En levaduras (250), en hígado de rata (251), en células de tumor ascítico (252) y en porotos (259) se han descrito también factores de disociación.

Esos resultados serán discutidos conjuntamente con los nuestros en las secciones siguientes.

Nuestras conclusiones, expresadas más arriba, están apoyadas por las siguientes evidencias:

- 1) El extracto ribosómico utilizado en nuestro trabajo estimula la continuada síntesis de proteína en sistemas acelulares con componentes definidos; el curso de la síntesis, que sin el extracto cesa a los 15-20 minutos, es extendido más allá de los 60 minutos, con velocidad aumentada y constante, en presencia del extracto. Esta linealidad de la incorporación podría corresponderse con un aumento de la disponibilidad del o de los factores de iniciación, especialmente los factores lábiles en lisados de reticulocitos, que ya han sido discutidos por otros autores (217; 253; 327); en efecto, la estimulación depende de la cantidad de extracto agregada (Figura 9). La estimulación ha mostrado las siguientes propiedades: es inhibida por inhibidores específicos de la iniciación: NaF y ATA (Figura 10), lo cual confirma que la iniciación está involucrada en el efecto estimulante; es inactivada por el calor (Figura 13); también pierde esta actividad por tratamiento por diálisis o desaleado (R.2.4), lo cual podría atribuirse a la pérdida de una sustancia de bajo peso molecular, o a la destrucción de un factor macromoleculer. No sabemos si el agregado de los componentes que han dializado permite la recuperación de la actividad. La inactivación es llamativa, por cuanto a partir de ese mismo tipo de extracto se obtienen, por múltiples manipulaciones que implican repetidas diálisis, los factores de iniciación (I.5.2) que de por sí son activos en sistemas acelulares reconstituidos. Esto refuerza la sospecha de que la medida de la iniciación en sistemas reconstituidos a partir de fracciones con distintos tipos de factores de iniciación purificados, podría estar reflejando modos de iniciación que no son los del sistema crudo; esto fué señalado por Danbrough y col. (236-238) al describir, en el sistema crudo, la formación de los complejos 40S-Met-tRNA sin mRNA, que no se obtienen en sistemas con componentes purificados. Podría ocurrir que en los sistemas más purificados se produjese una incapacidad para formar estos complejos y se hiciese así indispensable la presencia del mensajero.
- 2) Esa estimulación se ejerce sobre preparados de ribosomas diversos; no sólo sobre polisomas (aún activos en la elongación de cadenas crecientes), sino sobre ribosomas agotados o inactivos, como los monómeros libres.

La estimulación de la incorporación de aminoácido-¹⁴C es más evi-

dente con aquellos ribosomas en que se ha agotado previamente la actividad de síntesis, y en particular en los ribosomas 80S aislados de preparaciones agotadas, en los que la actividad depende totalmente del agregado del extracto ribosómico (Figura 8).

- 3) En el sistema acelular con un lisado enriquecido en polisomas, (que además contienen factores de iniciación en cantidad limitante, enzimas, tRNA, aminoácidos, energía, Mg^{++} y K^+) la presencia del extracto ribosómico posibilita que durante la síntesis de proteínas, los ribosomas monómeros libres, nativos, marcados con ^{32}P , se incorporen a polisomas. Al mismo tiempo se disocian a subpartículas 40S y 60S- ^{32}P . Teniendo en cuenta la demostrada capacidad de las subpartículas nativas de unirse a polisomas e iniciar la síntesis proteica, podría inferirse que esta utilización de los ribosomas 80S para iniciación de la traducción requiere este proceso previo de disociación, cuyos productos (40S y 60S) serían intermediarios en la incorporación a polisomas. Una conclusión análoga ha sido propuesta recientemente por Ottolenghi y col. (318): en sus experimentos con lisado no fraccionado de reticulocitos y ribosomas 80S- ^{32}P , la incorporación de la radioactividad de éstos en polisomas permitía determinar el balance RNA 18S- ^{32}P /RNA 28S- ^{32}P en polisomas, que era selectivamente disminuido cuando se agregaba subpartículas 40S nativas no marcadas; los autores interpretaron que éstas actuarían compitiendo con la incorporación de subunidades 40S- ^{32}P de los monómeros, pero no interferirían con la incorporación de las correspondientes subunidades 60S- ^{32}P . Esto se tomaba como demostración de que la incorporación transcurría a través de la disociación a subpartículas libres 40S y 60S- ^{32}P (que en el experimento no habían sido observadas). En nuestros experimentos, en ausencia de energía la transferencia de radioactividad es mucho menor y es de destacar que no se observa aumento de la fracción de subpartículas ribosómicas (más bien una disminución por incorporación en polisomas de las pocas subpartículas- ^{32}P contaminantes de la preparación de 80S- ^{32}P ; esto estaba en acuerdo con su comportamiento esperable, según los experimentos realizados con 40S+60S- ^{32}P). Así, la existencia del requerimiento de energía para obtener la disociación de los monómeros ha sido sugerida por estos resultados, en una fase temprana del desarrollo de nuestro trabajo. Los experimentos posteriores, que se discutirán más adelante, han corroborado la validez de esta hipótesis.
- 4) El extracto ribosómico posee una actividad de disociación de ribosomas 80S a partículas 40S y 60S, que se manifiesta en condiciones de síntesis de proteínas, y es aumentada por ATP. La reacción y el factor de disociación serán discutidos más extensamente en una sección posterior.
- 5) las partículas subribosómicas 40S y 60S producidas durante la disocia-

ción se comportan como partículas nativas, estables, y sin tendencia a reasociarse espontáneamente en el medio con Mg^{++} 2 a 2,5mM (fisiológico).

Esta estabilidad distingue a estas subpartículas de las subunidades que se obtienen como producto de la disociación de ribosomas libres y también de polisomas, ya sea por disminución drástica del nivel de Mg^{++} , o por aumento del K^+ (4-11). Las subunidades obtenidas por estos procedimientos vuelven a asociarse al recuperarse las condiciones iónicas normales, formando monómeros cuya dotación de componentes proteicos (y aún de RNA 5S) puede ser diferente a la de los monómeros libres nativos, o de los monómeros de terminación.

6) Las partículas 40S resultantes de la disociación son competentes para formar complejos de iniciación con Met-tRNA, como los observados en células enteras por Bard (217) y por Darnbrough y col. (235-238). La observación de la formación de estos complejos a partir de la disociación de monómeros 80S ha sido objeto de una comunicación preliminar (329). Las propiedades utilizadas en el experimento de la Figura 5 para caracterizar dichos complejos han sido semejantes a las que Bard empleó para observarlos; co-sedimentaban con partículas 40S; incorporaron selectivamente metionina-³H en forma precipitable por ácido tricloroacético en frío (y leúcil en caliente (217)), en tanto que había quedado excluida de esta asociación la valina-¹⁴C. Esto permite descartar que se trate de metionina incorporada en un péptido, por corto que fuera, dado que en la construcción de las cadenas de globina la primera unión peptídica ya involucra a un resto de valina contiguo al de metionina N-terminal. El medio de reacción contenía los componentes para la formación de Met-tRNA_f iniciador, como también GTP y presumiblemente los factores de iniciación, requeridos para la unión de Met-tRNA_f a la partícula 40S (191). La presencia de ión fluoruro aseguraba que la reacción no avanzara más allá del estadio de complejo 40S-Met-tRNA_f-mRNA (217; 228-229). El tipo de preparación de ribosomas usada (que en el experimento de la Figura 8 tenía una considerable actividad de síntesis al ser estimulado por el extracto ribosómico) permite suponer que había mRNA disponible para formar esos complejos. Sin embargo no podemos descartar que los complejos observados hayan carecido de mRNA, como los que han mostrado Darnbrough y col. (235-238) y Schreier y Staehelin (191); de todos modos, esos complejos son precursores de unidades de iniciación completas.

En la sección que sigue nos referiremos con más detenimiento a las características de la reacción y del factor de disociación.

La reacción y el factor de disociación:

Si la disociación de ribosomas monómeros en partículas subribosó-

micas por efecto de factor(es) disociante(s) es parte de los procesos fisiológicos generales de la síntesis de proteínas, puede predecirse que debe ocurrir en un medio adecuado para dicha síntesis.

Al estudiar más detalladamente las propiedades de esta reacción de disociación, nuestro criterio de partida ha sido que las observaciones fueran realizadas en esas condiciones, ya discutidas anteriormente. Se utilizó para ello un medio con componentes típicos de un sistema celular para la síntesis de proteínas, con Mg^{++} 2 a 3mM, K^+ 70mM, solución buffer pH 7,5, mercaptoetanol como protector de tioles, y energía (ATP + GTP).

En presencia de todos estos componentes pudo observarse que la reacción de disociación tiene las siguientes características:

1.- Participan en ella los ribosomas 80S libres y no las unidades ribosómicas en polisomas (Figura 11; extracto ribosómico crudo; Figura 19; ER-G25).

Ello señala que las subpartículas se originan en ribosomas inactivos, carentes de mRNA ni cadenas nacientes.

2.- La reacción depende de la temperatura: la pequeña disociación observada a 0° aumenta marcadamente, hasta un óptimo de 37°; a 45° decrece notablemente. 25° es una temperatura adecuada para la medida de la actividad disociante.

3.- La reacción requiere tiempo. La escala de tiempo en que, a 25°, se observa el desarrollo de la reacción es 5 a 20 minutos; es decir que es una reacción aparentemente lenta (Figura 15).

4.- La reacción llega a un punto final en que se detiene. El límite de disociación que se alcanza depende de la cantidad de factor agregado (Figura 17), expresado como relación ER:Ab. Por re-agregado de extracto ribosómico fresco y reincubación se observa un aumento de la disociación. Estos hechos sugieren una acción estequiométrica más bien que catalítica del factor de disociación. Las características hasta aquí señaladas son coincidentes con las de otras reacciones de disociación descritas en distintos sistemas de eucariotes (187; 222; 223; 224; 250; 251; 252; 259).

5.- El factor de disociación es extraíble de ribosomas, termolábil (se inactiva por calentamiento a 55° durante 10 minutos) y no dializable, lo cual sugiere que tiene una naturaleza proteica. Ignoramos el número de componentes involucrados en ese factor o factores. La asociación de algunos de los componentes del factor global a los ribosomas no es muy firme, dado que el extracto ribosómico extraído de ribosomas totales previamente lavados aún a muy baja fuerza iónica (Mg^{++} 2mM, K^+ 70mM), ha perdido el 70% de su actividad disociante (Tabla 15). No hemos establecido si la actividad disociante está preferencialmente asociada a alguno de los tipos de partícu-

las en los ribosomas totales. Otros factores de disociación preparados de diversos orígenes han sido extraídos de las subpartículas nativas: 40S, y separadamente 60S (con características diferenciadas) en reticulocitos (Lubsen y Davis (223-b)); 40S, en hígado (Lawford y col. (251)); subpartículas crudas en levadura (Pêtre (250)). El factor disociante de bacterias (IF₃) está asociado a subpartículas 30S (120-b), pero también se ha encontrado en polisomas, monómeros y en sobrenadante.

En tanto que los tratamientos de diálisis o de desalado inactivan el efecto de estimulación de la iniciación de cadenas peptídicas, no afectan la actividad disociante; por el contrario hay un aparente aumento de la misma. Este aumento podría reflejar la verdadera capacidad disociante del factor de disociación, que en el extracto crudo, estaría enmascarada. Ello podría ser debido al efecto de reutilización de las subpartículas liberadas, que, en presencia de los componentes del extracto, dializables o no (posiblemente GTP, ATP, aminoácidos, aminocil-tRNAs, etc), desaparecerían parcialmente en procesos de iniciación que darían agregados más pesados (monosomas o polisomas). Una segunda posibilidad a considerar es la existencia en el extracto ribosómico de un factor(as) de asociación del tipo descrito por Algranati y col. en sistemas bacterianos (330-331). Según lo observado por estos autores, este factor involucra un componente macromolecular insoluble en baja fuerza iónica, y otro de bajo peso molecular, dializable; ambos promueven la reasociación de subpartículas ribosómicas "derivadas" (obtenidas a baja concentración de Mg⁺⁺ o por lavado en soluciones concentradas de KCl. El material insoluble en KCl 0,1M que hemos observado en forma repetida en las preparaciones de extracto ribosómico dializado (EF-d), se asemeja por la forma de extracción y por su solubilidad en KCl concentrado, al factor de asociación descrito en bacterias. La presencia de un factor asociante de esas características en los extractos ribosómicos crudos podría explicar las diferencias observadas en los efectos disociantes de un mismo extracto cuando se lo ensaya crudo, o dializado (o desalado). La actividad disociante siempre es mayor en el segundo caso.

La mayor eficiencia disociante del factor extraído de ribosomas totales con KCl 0,5M con respecto al obtenido con KCl 1M, también hace pensar en la presencia, en éste último, de algún componente que en concentraciones menores de KCl, sería menos extraído, y que inhibiría a, o competiría con el efecto disociante; este componente sería del tipo quizás del factor de asociación descrito por Algranati, o de los factores que agregaron ribosomas, observados en eucariotes por Lawford y col. (251) y por Pêtre (250). Los primeros encontraron un factor de agregación en el extracto de ribosomas livia-

nos de hígado de rata, que eliminaron por tratamiento con calor (15 minutos a 40°). Algo semejante fué observado por Pêtra en levaduras; ese material era extraído principalmente de monómeros y precipitaba por diálisis.

6.- El grado de disociación está determinado por la concentración de Mg^{++} . Este efecto se observó también en bacterias (84) y en otros eucariotes (223; 250-251). La disociación por el factor(es) se observa dentro de un rango fisiológico de concentraciones de Mg^{++} (2-3mM) apto para la síntesis de globina en el sistema acelular de reticulocitos de conejo, a diferencia de los bajos niveles de Mg^{++} (0,15-0,30mM) requeridos para la disociación por el factor de Lubsen y Davis (223). Concentraciones de 5mM y más disminuyeron la disociación; no hemos establecido si el efecto es debido a una inhibición de la reacción de disociación, o a una agregación de las subpartículas resultantes.

7.- Los inhibidores de la síntesis de proteínas: cicloheximida, esparomicina, puromicina, ácido fusídico y NaF, en concentraciones adecuadas para una franca inhibición, y pactamicina en concentraciones en que inhibe la iniciación y la elongación (313, 321-322), no tiene efecto sobre la reacción de disociación. Esto indica que la interacción del factor(es) de disociación con los ribosomas 80S no involucra, por lo menos directamente, las áreas o componentes del ribosoma comprometidos en las reacciones de iniciación y de elongación inhibidas por estas sustancias.

En cambio, el ATA ejerce un efecto inhibitorio, que llega a hacerse total a concentración 1×10^{-4} M (Figura 18). Esta observación requirió proteger a los ribosomas 80S de los controles contra el efecto de ATA que relaja su conformación, y altera sus características de sedimentación; para ello se agregó en los controles igual cantidad de extracto ribosómico, pero inactivado por el calor.

Para obtener la inhibición, se requería la presencia simultánea, en la incubación, de los ribosomas, el extracto ribosómico y el ATA 10^{-4} M y no podía ser reemplazada por una preincubación de los dos últimos sólo; en este caso la incubación disminuía sólo en una medida correspondiente a la concentración de ATA que resulta por dilución al agregar a la mezcla final de incubación, el extracto ribosómico pretratado con ATA.

Mizuno y Rabinovitz (224) observaron un efecto semejante de este inhibidor sobre la disociación de ribosomas 80S en un sistema constituido por un lisado de reticulocitos; en esas condiciones la inhibición se obtenía con $0,25 \times 10^{-4}$ M.

8.- La disociación de los ribosomas 80S promovida por el sólo agregado del extracto ribosómico, aumenta en forma marcada en presencia de ATP.Mg,

Este efecto no es causado por secuestro de Mg^{++} .

Los valores máximos de disociación se alcanzan con concentraciones de ATP.Mg entre 1 y 2 mM, ó a bajas concentraciones de ATP.Mg pero con el agregado de sistema generador de ATP (creatina fosfato + creatina quinasa). Esto sugiere que la concentración efectiva de ATP requerida para el proceso de disociación de los ribosomas monómeros no es alta, pero que el suministro es crítico, ya sea por su desaparición, debida a la presencia de enzimas degradativas como las ATPasas (324) o ⁴⁹²avlos productos de degradación del ATP sean inhibitorios.

La ineffectividad de otros nucleósido-fosfatos ya referida (R.3.6) y en especial del GTP (que en algunos experimentos no presentados aquí pareció incluso comportarse como inhibitorio de la disociación), evidenciaron que el efecto de energía sobre la disociación es exclusivamente atribuible al ATP y sugieren que en el proceso de la disociación no están involucradas ninguna de las reacciones conocidas en la síntesis de proteínas, en que interviene el GTP. Estas conclusiones están sostenidas también por los resultados obtenidos con análogos de ATP (R.3.8).

El requerimiento de ATP no es absoluto. Existe una disociación de magnitud variable, en ausencia del mismo, aún en extractos que han sido dializados largamente. En estos casos es difícil atribuir el efecto a la presencia de pequeñas cantidades de ATP (nucleósido-fosfatos) remanentes en el extracto. Esto podría sugerir la existencia de una heterogeneidad de la reacción en que parte de los ribosomas (o quizás el factor(es) de disociación) pueden reaccionar en la disociación, en ausencia de ATP, mientras que, en presencia de éste, una porción adicional de ribosomas (o de factor de disociación) puede convertirse a una forma reactiva.

Experimentos preliminares de preincubación de los ribosomas 80S ó del extracto ribosómico con ATP, y posterior agregado del otro reactante no preincubado, reincubando en la mezcla de reacción completa (Tabla 17) sugieren que la acción primaria del ATP se ejercería sobre los ribosomas, quizás haciéndolos más susceptibles a la acción del factor(es) de disociación.

El efecto de la preincubación de ribosomas con ATP observado en este experimento indica que esos mismos ribosomas (que habían sido preparados por agotamiento de polisomas en un sistema acelular completo, rico en ATP), al ser aislados y purificados por medio de gradientes y varias sedimentaciones, perderían el estado especial, proclive a la disociación, que les había conferido la interacción con ATP.

Ese estado aparece entonces como relativamente lábil. Ignoramos si para el mantenimiento del mismo se requiere la continuada presencia de

ATP. Esto podría ser puesto a prueba mediante métodos rápidos de aislamiento de los ribosomas, después del pretratamiento con ATP.

Otros investigadores que han estudiado la disociación de ribosomas monómeros tienen resultados que diferirían de los nuestros. Para observar la incorporación de monómeros a polisomas en un lisado de reticulocitos, Ottolenghi y col. (318), encontraron que es necesario omitir el agregado de energía; en este caso las reservas endógenas de energía alcanzarían sin embargo a llenar los requerimientos de la reacción de disociación, ya que también alcanzan a sostener los retardados procesos de elongación que al incrementar en forma relativa la velocidad de iniciación aumentarían la disponibilidad del factor de disociación, facilitando la disociación de los monómeros.

Por otro lado, Mizuno y Rabinovitz (224) encontraron, como nosotros, una necesidad de proveer energía a un lisado de reticulocitos para que el factor de disociación obtenido por ellos llevase a cabo la disociación de los monómeros del lisado (en presencia de cicloheximida, que bloquea en forma indirecta tanto la liberación de monómeros de terminación como la formación de nuevas unidades en polisomas). Estos autores atribuyeron al GTP este efecto, dado que un análogo del GTP, el GMPPCP, (en presencia de ATP, creatina fosfato y creatina quinasa), inhibía la reacción y esta inhibición era contrarrestada por un exceso de GTP. Los autores no mencionaron haber ensayado en forma aislada los efectos del GTP o del ATP o de sus análogos.

La forma en que el ATP ejerce su efecto de estimulación, parece incluir el clivaje de la unión entre los fosfatos alfa y beta, tal como lo sugieren los resultados obtenidos en estudios comparativos del efecto del ATP y de sus análogos AMPCPP y AMPPCP. En efecto, mientras el primero es prácticamente inactivo, el segundo alcanza una marcada eficiencia en la estimulación de la disociación.

Tomando en cuenta este resultado y el de la probable interacción inicial del ATP con los ribosomas, pero no con el factor de disociación, podemos tratar de formular posibles modos de acción del ATP en la disociación.

En primer término, y estableciendo un paralelo entre nuestros resultados - disociación en Mg^{++} 2 a 3mM, en presencia de ATP, y los de Lubsen y Davis - disociación en Mg^{++} 0,15 a 0,3mM, sin requerimiento de energía (187) - podemos señalar que el efecto del ATP podría interpretarse como una "facilitación" de la disociación en presencia de más altas concentraciones del catión. Se sabe que, en bajas concentraciones de éste, los ribosomas monómeros tienen una cierta tendencia a disociarse espontánea y reversiblemente a subunidades (*), como lo mostro en bacterias Spirin (273). En esas condiciones, las proteínas "antiasociantes" del factor disociante (* tomar una conformación más laxa, y aún a)

de Lubsen y Davis (223) (véase más adelante), podrían estabilizar y transformar en subpartículas nativas, a las subunidades que aparecen por disociación espontánea de los monómeros, en una reacción de desplazamiento del equilibrio como la postulada para la disociación en bacterias (126; 128). La "facilitación" a Mg^{++} fisiológico por el ATP, podría pensarse que consiste en desplazar el equilibrio de disociación reversible de los monómeros (sin factor), o labilizarlos de modo que, aún en presencia del Mg^{++} aumentado, se formen subunidades (o quizás estados conformacionales más reactivos) que, con la intervención de las mismas proteínas antisociantes darían las partículas subribosómicas nativas estabilizadas. Para desplazar ese equilibrio sería necesario energía libre, que en este caso se podría obtener por una reacción acoplada en que participe el ATP.

En nuestro caso, al menos parte de esa reacción parece desarrollarse en el mismo ribosoma, sin la intervención del factor disociante.

Entre los procesos con participación de ATP que puedan proporcionar energía libre a nuestro sistema, podemos considerar la simple hidrólisis de ATP a ADP y fosfato inorgánico (ATPasa), y la fosforilación de proteínas. Ambas involucran la ruptura de la unión pirofosfato entre los grupos fosfato beta y gamma.

Con respecto al primer caso, se puede mencionar que una preparación de factor de iniciación de reticulocitos M_{2A} (183) que se mostró impurificada con el factor disociante de Lubsen y Davis (187), poseía, además de actividad de GTPasa, también acción de ATPasa, que requería la presencia de ribosomas; La coincidencia entre la conjunción de factor disociante + ribosomas y acción ATPásica, es sugestiva.

La fosforilación de proteínas ribosómicas catalizada por proteína quinasas, ha sido descrita en muchos sistemas (332; 333; 334; 335; 336; 337; 340), entre ellos el de reticulocitos (263; 324; 332; 338; 339). La fosforilación de proteínas específicas parece ser característica de las distintas partículas ribosómicas, si bien el recambio de grupos fosfato no está vinculado al reciclado rápido de los ribosomas entre polisomas y subpartículas (339). Kabat (263-b; 339) observó que, tanto en reticulocitos de conejo como en sarcoma 180 de ratón, hay una proteína (Su), que aparece fosforilada sólo en las subpartículas 40S nativas y que no está presente ni en polisomas ni tampoco en ribosomas 80S libres. Esta proteína es extraíble por lavado con alta fuerza iónica. Podría ocurrir que la disociación implique la unión de esa proteína a una partícula recién formada, junto con su fosforilación por ATP (Kabat ha especulado sobre la posibilidad de que esa proteína fuera un factor de iniciación).

Es posible que en la disociación el ATP actúe para fosforilar esta proteína (componente probable del factor de disociación) para la formación de 40S reactivas, a partir de 80S.

De las reacciones anteriores, que involucran la unión pirofosfato entre beta y gamma, ninguna podría sin embargo tener lugar si la reacción de disociación se realiza con AMPPCP (que es activo).

Otras dos formas de acción del ATP que lleven a la liberación de un resto pirofosfato serían la activación de aminoácidos y formación de los aminoacil-tRNA, por una parte, y la formación de AMP-3',5'-cíclico (cAMP) (341)

La primera reacción, en presencia de la enzima activante de metionina, $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$, y metionina libre, podría dar lugar a la formación de Met-tRNA_f . Si especulamos que en el sistema y aún en los ribosomas aislados, puede haber trazas de estas sustancias que permitirían la síntesis del iniciador, el mismo podría actuar, en presencia de factores de iniciación (191) y GTP (contaminante) para la constitución de complejos de iniciación 40S-Met-tRNA_f que estabilizarían a las partículas 40S hipotéticamente nacientes e inestables. Sin embargo en sistemas que por agotamiento han perdido la capacidad de formar estos complejos (217) las partículas 40S nativas siguen estables.

Por último, la formación de cAMP podría influir en la fosforilación de proteínas ribosómicas: en el sistema de reticulocitos (338), de corteza adrenal (337) y en el de hígado (335-336), algunas de las fosforilaciones de ribosomas están estimuladas por cAMP. No se han descrito hasta ahora modificaciones importantes de la actividad de síntesis de proteínas, en reticulocitos, por acción del cAMP. (Son dos reacciones posibles con AMPPCP)

De la discusión anterior no surge con claridad cuál podría ser un rol posible del ATP en la reacción de disociación.

Las hipótesis consideradas podrían orientar para la realización de futuros estudios sobre este tema.

D.2 El ciclo ribosómico y la reacción de disociación:

Descartando el modelo original de ciclo ribosómico (328-a) que postulaba que los ribosomas 80S liberados en la terminación reiniciaban la síntesis al unirse nuevamente al mRNA, se considera actualmente que, en eucariotes, los ribosomas monómeros libres son probablemente partículas inactivas que no son intermediarios obligatorios directamente involucrados en el ciclo.

Las unidades activas en polisomas parecen liberarse en el proceso de terminación de la síntesis de proteínas como subpartículas separadas (254; 253; 255; 272). Las subpartículas 40S y 60S de terminación, "nacientes", pueden entonces unirse a proteínas que, actuando como factores "antiasociantes",

impedirían su reasociación y las estabilizarían (254). Para ello se requieren dos juegos de factores, específicos de las partículas 40S, o de las 60S respectivamente (223-b). Ya se mencionó que una de las proteínas características de la subpartícula 40S nativa (Su) estaría fosforilada (263-b) y no se la encuentra en ribosomas ni polisomas. Las partículas nativas así formadas, serían canalizadas de esta manera a un nuevo ciclo de síntesis. Este proceso estaría favorecido por la topología del sistema (262-a). Por el contrario, si no interactuaran con los factores "antiasociantes", las subpartículas de terminación se recombinarían, en una reacción lateral del ciclo polisómico, transformándose en monómeros y quedando entonces temporalmente excluidas del ciclo (254).

Los ribosomas monómeros libres, no entran habitualmente a polisomas, ni intercambian sus componentes con el reservorio de subpartículas ribosómicas. Cuando decrece la iniciación se acumulan, pero se mantiene una cantidad aproximadamente constante de subpartículas. Ese cambio en la distribución de la población ribosómica es reversible. El mecanismo para ello debe involucrar la disociación de los monómeros libres en subpartículas ribosómicas, que funcionarían entonces en la iniciación de cadenas peptídicas. Este mecanismo es señalado por el comportamiento de los ribosomas monómeros en los sistemas acelulares fraccionados; en estos, los monómeros sólo son incorporados a polisomas en presencia del extracto ribosómico, que produce su disociación a subpartículas y promueve también la intervención de las mismas en la formación de unidades que inician la síntesis de globina. De acuerdo a lo dicho más arriba, el factor de disociación debería incluir a las proteínas "antiasociantes" que estabilizan a las subpartículas 40S y 60S nativas.

Se puede intentar una descripción general del estado dinámico de todos estos componentes y de sus interacciones en base a lo ya expresado en la Introducción sobre el funcionamiento del ciclo polisómico y las reacciones de iniciación, tanto en procariontes como en eucariotes.

Tomando como punto de partida la terminación de una cadena peptídica y la liberación de la correspondiente unidad ribosómica, en forma de partículas subribosómicas de terminación, la proporción de estas que fluye ya sea hacia la formación de monómeros libres, o la de subpartículas nativas (estabilizadas), así como la cantidad de éstas últimas que se forman, dependería de la disponibilidad de los factores antiasociantes. Estos últimos provendrían de los procesos de iniciación en que las subunidades nativas (poseedoras de factores), los liberarían durante la formación de la unidad ribosómica activa en el polisoma (171). Una vez liberados los factores antiasociantes podrían participar en una nueva vuelta de reacciones, primero esta-

bilizando a subpartículas nacientes en la terminación, y luego siendo nuevamente liberados cuando las partículas son reutilizadas en la iniciación. Se establece así la posibilidad de un funcionamiento cíclico de los factores que sería paralelo al ciclo de las subunidades ribosómicas. Desde ese punto de vista los factores antiasociantes serían entonces factores de iniciación.

La cantidad total de factores por célula es limitada y sería mucho menor que la de los ribosomas totales; estaría dada por la suma de subpartículas nativas más complejos de iniciación (que las posean); la cantidad de factores libres sería muy pequeña.

Los cambios en la distribución relativa de las distintas partículas ribosómicas en la población celular total estarían determinadas por las frecuencias relativas de los procesos de iniciación y de terminación de cadenas peptídicas. En una situación de flujo estacionario ambas frecuencias son iguales, con lo cual el ritmo con que se hacen disponibles los factores antiasociantes iguala a la frecuencia de aparición de subpartículas de terminación, a las cuales se unen, y la formación de monómeros está impedida. Cuando los procesos de terminación exceden a los de iniciación (el caso de reticulocitos tratados con fluoruro, o en condiciones metabólicas adversas) hay un exceso en la disponibilidad de las subpartículas de terminación sin la correspondiente contrapartida de los factores antiasociantes libres, y entonces, se forman monómeros inactivos, a expensas de la reducción de la población de polisomas. Por último, en situaciones en que la frecuencia de las iniciaciones excede a la de las terminaciones (el caso de células en recuperación, que tienen muy pocas unidades ribosómicas elongando y terminando cadenas) la mayor disponibilidad relativa de factores antiasociantes libres es dirigida hacia el proceso de disociación de los monómeros libres, cuya cantidad total disminuye generando subpartículas nativas, que son utilizadas en la reformación de polisomas, los cuales así aumentan a expensas de los monómeros.

La reacción de disociación que nosotros hemos descrito reconstruye "in vitro" las propiedades del sistema de utilización de monómeros en células enteras. A diferencia de otras reacciones de disociación descritas en la literatura, este proceso requiere la participación de ATP. Nuestros resultados nos llevan a proponer que esta reacción es una vía fisiológica que posibilita la participación de los monómeros 80S libres en el proceso de síntesis de proteínas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Hemos corroborado que, en el sistema acelular de reticulocitos, constituido con polisomas, fracción soluble celular y otros componentes definidos, las subpartículas ribosómicas nativas se asocian a polisomas, en condiciones de síntesis de proteínas, en tanto que los monómeros 80S permanecen inalterados.
- 2.- Constatamos que en células en que la iniciación de la síntesis de proteínas había sido inhibida con NaF, durante el período de su recuperación los monómeros son capaces de formar unidades activas en polisomas.
- 3.- Los monómeros 80S libres son capaces de incorporarse a polisomas en el sistema acelular referido en el punto 1 en presencia de energía, cuando al mismo se ha agregado un extracto de ribosomas totales obtenido con KCl concentrado. En esas condiciones, además de una estimulación en los procesos de iniciación de síntesis de proteínas, tiene lugar la disociación de los monómeros en partículas subribosómicas 40S y 60S. Esas subpartículas se comportan como partículas nativas, estables en el medio con Mg^{++} 2 a 3 mM (fisiológico) y son capaces de reiniciar la síntesis de proteínas a través de la formación de complejos de iniciación 40S-Met-tRNA.
- 4.- En el extracto ribosómico se puede poner de manifiesto un factor (es) con actividad disociante de ribosomas monómeros, que se puede observar aisladamente, inactivando los procesos subsiguientes de iniciación y síntesis de proteínas mediante la diálisis o desalado por gel-filtración del extracto ribosómico. Este factor (es) es termolábil y no dializable y se extrae de los ribosomas totales con relativa facilidad.

La reacción de disociación transcurre en un medio apto para la síntesis de proteínas; se realiza con ribosomas monómeros libres (ya sea partículas nativas o ribosomas de terminación en el sistema acelular), pero no con partículas de polisomas; el desarrollo de la reacción requiere tiempo y temperatura cercanas a las fisiológicas (25° a 37°); el grado de disociación alcanzado depende de la cantidad de factor(es) de disociación agregado, en forma aparentemente estequiométrica y la reacción no tiene las características de un equilibrio, sino que parece ser total. Concentraciones de Mg^{++} mayores que las fisiológicas, inhiben la disociación.

La disociabilidad de los ribosomas es muy considerable: se han al-

canzado disociaciones de más del 50% de la población inicial de ribosomas.

- 5.- La reacción no es sensible a la presencia de los siguientes inhibidores de la síntesis de proteínas: cicloheximida, esparsomicina, ácido fusídico, puromicina, pactemicina y NaF.

El ácido aurintricarboxílico 10^{-4} M inhibe totalmente la reacción en condiciones en que no está alterada la conformación de los ribosomas monómeros.

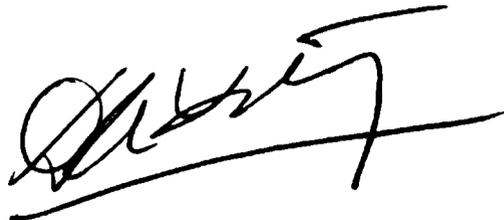
- 6.- La reacción es considerablemente estimulada por la presencia de ATP. Por encima de una capacidad de disociación basal del factor dializado o desalado, en presencia de ATP se han logrado disociaciones adicionales de hasta 40%. En este efecto el ATP no es reemplazable ni por el GTP, ni por UTP, CTP, AMP ni ADP.

El efecto máximo de disociación se obtiene con ATP 1 a 2 mM o bien 0,2 mM en presencia de creatina fosfato + creatina quinasa.

- 7.- Experimentos de preincubación de los ribosomas con ATP indicaron que al menos parte del efecto puede lograrse por una interacción inicial con los ribosomas. Por otra parte la acción parece requerir el clivaje de la unión pirofosfato entre los restos de fosfato alfa y beta, como lo indica la inactividad del análogo de ATP, AMPCPP, y la eficiencia del AMPPCP.

- 8.- Estos hallazgos se discuten en relación con las propiedades de otras reacciones de disociación descritas en reticulocitos y en otros sistemas de eucariotes. Se especula sobre el rol del ATP en la reacción, que podría servir para hacerla posible aún en un medio con concentraciones de Mg^{++} como la fisiológica (2 a 3 mM).

Se discute también el papel que puede jugar esta reacción de disociación y formación de partículas subribosómicas nativas, en relación con el funcionamiento cíclico del aparato de síntesis de proteínas en las células y se propone a la misma como una vía de movilización de los ribosomas monómeros libres, metabólicamente pasivos, para su utilización en esa síntesis y la formación de polisomas.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tissières, A. y Watson, J.D., Nature 182, 778 (1958)
- 2.- Attardi, G. y Ojala, D., Nature New Biol. 229, 133 (1971)
- 3.- Bishop, J., Biochim. Biophys. Acta 119, 130 (1966)
- 4.- Ts'ao, P.O.P., y Vinograd, J., Biochim. Biophys. Acta 49, 113 (1961)
- 5.- Lemfren, H. y Glezacki, E., J.Mol.Biol. 5, 97 (1962)
- 6.- Lawford, G.R., Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 143 (1969)
- 7.- a) Falvey, A.F. y Stachelin, T., J.Mol.Biol. 53, 1 (1970)
b) Ibid, J.Mol.Biol. 53, 21 (1970)
- 8.- Martin, T.E. y Wool, I.G., J.Mol.Biol. 43 151 (1969)
- 9.- Blebel, G. y Sabatini, D., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68, 390 (1971)
- 10.- Reboud, A.M., Arpin, M. y Reboud, J.P., Eur.J.Biochem. 26, 347 (1972)
- 11.- van der Zijt, B.A.; Koel, A.J. y Bleemers H.P., Eur J.Biochem. 30, 15 (1972).
- 12.- van der Decken, A.; Ashby, P.; McIlreavy, D. y Campbell, P., Biochem.J. 120, 815 (1970)
- 13.- Peterman, M.L. y Pavlovac, A. Biochemistry 10, 2770 (1971)
- 14.- Lengyel, P. y Söll, D. Bact.Rev. 33, 264 (1969)
- 15.- Lucas-Lenard, J. y Lipmann, F., Ann.Rev.Biochem. 40, 409 (1971)
- 16.- Haselkorn, R. y Rothman-Denes, L.B., Ann.Rev.Biochem. 42, 397 (1973)
- 17.- Nirenberg, M. y Leder, P., Science 145, 1399 (1964)
- 18.- Clark, B.F.C. y Marcker, K., J.Mol.Biol. 17, 394 (1966).
- 19.- Marcker, K.A; Clark, B.F.C. y Anderson J.S. Cold Spring Harb.Symp.Quant. Biol. 31, 279 (1966)
- 20.- Thach, R.E.; Sundararajan, T.A.; Dawey, K.F.; Browns, J.S. y Doty, P...
Ibid: 31, 85 (1966).
- 21.- Wahba, A.J., Salas, M. y Stanley, W., Ibid. 31, 103 (1966)
- 22.- Ghosh, H.P., Söll, D. y Khorana, D., J.Mol.Biol. 25, 275 (1967)
- 23.- Stewart, J.W.; Sherman, F.; Shipman, N.; Thomas, F.L. y Cravens, M.,
Fed.Prec. 28, 597 (1969)
- 24.- Brown, J.C. y Smith, A.E., Nature 226, 610 (1970)
- 25.- Smith, A.E., Marcker, K.A. y Mathews, S. Nature 225, 184 (1970)
- 26.- Wilson, D.B. y Dintzis, H.M., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 66, 1282 (1970)
- 27.- Yehida, A., Watanabe, S. y Morris, J., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA 67, 1600 (1970)
- 28.- Jackson, R. y Hunter, T., Nature 227, 672 (1970)
- 29.- Housman, D., Jacobs-Lorena, M., Rajbhandary, U.L., y Lodish, H.F.,
Nature 227, 913 (1970)

- 30.- Keffer-Gutmann, A. y Arnstein, H.R.V., Biochem.J. 134, 969 (1973)
- 31.- Suzuki, H. y Itano, H.A., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 70, 2059 (1973)
- 32.- Wigle, D.T. y Dixon, G.H., Nature, 227, 677 (1970)
- 33.- a) Rahaminoff, H. y Arnstein, H.R.V., Biochem.J. 115, 113 (1969)
b) Arnstein, H.R.V. y Rahaminoff, H., Nature 219, 942 (1969)
- 34.- a) Marcus, A., Lugenbill, B y Feeley, J., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 59
1243 (1968)
b) Marcus, A., J.Biol.Chem. 245, 955 (1970)
c) Marcus, A., Weeks, D., Leis, J.P. y Keller, E.B., Proc.Nat.Acad.Sci.,
USA 67, 1681 (1970)
- 35.- Yarwood, A., Boulter, D. y Yarwood, J.N., Biochem.Biophys. Res.Comm. 44, 353 (1971)
- 36.- Caffier, H., Raskas, H.J., Parson, J. y Green, M., Nature New Biol. 229, 239 (1971)
- 37.- Rakosh, D.M., Ladish, H. y Baltimore, A., J.Mol.Biol. 54, 327 (1970)
- 38.- Lundquist, R.E., Lazar, J.M., Klein, W.H. y Clark, J.M., Biochemistry 11, 2014 (1972)
- 39.- Levin, D., Kyner, D. y Acs, G., Proc.Nat.Acad.Sci, USA 69, 1234 (1972)
- 40.- Chatterjee, N.K., Kerwar, S.S. y Weissbach, H., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 69, 1375 (1972)
- 41.- Chatterjee, N.K., Koch, G y Weissbach, H., Arch,Biochem.Biophys. 154, 431 (1973)
- 42.- Rhe, H.M. y Debusk, A.G., J.Biol.Chem. 246, 6566 (1971)
- 43.- Straus, G.J.A.M., Berns, T.J.M., van Westreenen, H y Bloemendal, H., Eur.J.Biochem. 30, 48 (1972)
- 44.- Marcker, K. y Sanger, F., J.Mol.Biol. 8, 835 (1964)
- 45.- Marcker, K., J.Mol.Biol. 14, 63 (1965)
- 46.- Adams, J.M. y Capeochi, M.R., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 55, 147 (1966)
_{y1512}
- 47.- Ono, Y., Skultchi, A., Klein, A y Lengyel, P., Nature 220, 1304 (1968)
- 48.- a) Cory, S. y Marcker, K.A. Eur.J.Biochem.12, 177 (1970)
b) Dube, S.K., Marcker, K.A., Clark, B.F.G. y Cory, S., Nature 218, 232 (1968)
- 49.- Webster, R.E., Engelhardt, D.L. y Zinder, N.D., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 55, 155 (1966)
- 50.- Adams, J.M., J.Mol.Biol. 33, 571 (1968)
- 51.- Takeda, M. y Webster, R.E., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 60, 1487 (1968)
- 52.- Eisenstadt, J. y Lengyel, P., Science 154, 524 (1966)
- 53.- Salas, M., Smith, M.A., Stanley, W.M., Wahba, A.J. y Ochoa, S., J.Biol. Chem. 240, 3988 (1965)

- 54.- Stanley, W.M., Salas, M., Wahba, A.J. y Ochoa S., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 56, 290 (1966)
- 55.- Revel, M. y Gros, F., Biochem.Biophys.Res.Comm.25, 124 (1966)
- 56.- Eisenstadt, J. y Brawerman, G., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA: 58, 1560 (1967)
- 57.- a) Revel, M., Herzberg, M.;Beceveric, A. y Gros, F., J.Mol.Biol 33, 231 (1968)
- b) Herzberg, M., Lelong, J.C. y Revel, M., J.Biol. 44, 297 (1969)
- 58.- Iwasaki, K., Sabel, S.L., Wahba, A.J. y Ochoa, S., Arch.Biochem.Biophys. 125, 542 (1968)
- 59.- Dubneff, J.S. y Maitre, U., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34, 301 (1969)
- 60.- Parenti-Rosina, R., Eisenstadt, A. y Eisenstadt, J.M., Nature 221, 363 (1969)
- 61.- Miller, M.J., Zaslavoff, M. y Ochoa, S., FEBS Lett. 3, 50 (1964)
- 62.- Brawerman, G., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34, 307 (1969)
- 63.- Revel, M., Herzberg, M. y Greenspan, H., Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol., 34, 261 (1969)
- 64.- Adams, J.M., Jeppesen, P.G.N., Sanger, F. y Barrel, B.G., Ibid 34, 611 (1969)
- 65.- Steitz, J.A., Ibid 34, 621 (1969)
- 66.- a) Billeter, M.A., Dahlberg, J.E., Goodman, H.M., Hindley, J. y Weissman, C., Nature 224, 1063 (1969)
- b) Billeter, M.A., Dahlberg, J.E., Goodman, H.M., Hindley, J. y Weissman, C. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34, 635 (1969)
- 67.- Brawerman, G., Revel, M., Salser, W. y Gros, F., Nature 223, 957 (1969)
- 68.- Lodish, H.F. y Roberts, H.D., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34 655 (1969)
- 69.- Lodish, H.F., J.Mol.Biol., 50, 689 (1970)
- 70.- Berissi, H., Groner, Y y Revel, M., Nature New Biol. 234, 44 (1971)
- 71.- Noll, M y Noll, H., Nature New Biol.238, 225 (1972)
- 72.- Steitz, J.A., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA 70, 2605 (1973)
- 73.- Wahba, A.J., Iwasaki, K., Miller, M.J., Sabel, S., Sillero, M.A.G. y Vazquez, D., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34, 291 (1969)
- 74.- Vermeer, C., Telens, J., Blaasma-Jonkman, F., Bosch, L y Davies, J., FEBS lett. 19, 201 (1971)
- 75.- Revel, M., Aviv, M., Groner, Y. y Pellaack, Y., FEBS Lett. 9, 213 (1970)
- 76.- Lee-Huang, S. y Ochoa, S. Nature New Biol. 234, 236 (1971)
- b) Lee-Huang, S. y Ochoa, S., Arch.Biochem.Biophys. 136, 84 (1973)
- c) Klam, E.B.; Hsu, W.T. y Weiss, S.B., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA, 67, 696 (1970)

- 77.- Yoshida, M. y Rudland, P.S., *J.Mol.Biol.* 68, 465 (1972)
- 78.- Stallcup, M.R. y Rabinovitz, J.C., *J.Biol.Chem.* 248, 3216 (1973)
- 79.- a) Ledish, H.F., *Nature* 226, 705 (1970)
b) Ledish, H.F., *Nature* 224, 867 (1969)
- 80.- Leffler, S. y Szer, W., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 2364 (1973)
- 81.- Szer, W y Brenowitz, J., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 38, 1154 (1970)
- 82.- Vaynew, P. y Kurland, C.G., *Biochemistry* 10, 517 (1971)
- 83.- Sabel, S., Sillere, M.A.G., Iwasaki, K. y Ochoa, S., *Nature* 228, 1269 (1970)
- 84.- Subramanian, A.R. y Davis, B.O., *Nature* 228, 1273 (1970)
- 85.- Maitra, U. y Dubneff, J., *Fed.Proc.* 27, 398 (1968)
- 86.- a) Revel, M., Pollack, Y., Groner, Y., Scheps, R., Incuye, H., Berissi, H. y Zeller, H., *Biochimie* 55, 41 (1973)
b) Groner, Y., Pollack, Y., Berissi, H. y Revel, M., *Nature New Biol.* 239, 16 (1972)
c) Groner, Y., Scheps, R., Kamen, R., Kelakofsky, D. y Revel, M., *Nature New Biol.* 239, 19 (1972)
- 87.- Meier, D., Lee-Huang, S. y Ochoa, S., *J.Biol.Chem.* 248, 8613 (1973)
- 88.- Lee-Huang, S., Sillere, M.A.G. y Ochoa, S., *Eur.J.Biochem.* 18, 536 (1971)
- 89.- Chae, Y.B., Mazunder, R. y Ochoa, S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 62, 1181 (1969)
- 90.- Miller, M.J. y Wahba, A.J. *Fed.Proc.* 31, 409 (1972) y *J.Biol.Chem.* 248, 1084 (1973)
- 91.- Kelakofsky, D., Dewey, K.F., y Thach, R.E., *Nature* 223, 694 (1969)
- 92.- Lockwood, A.M., Chakraborty, P.R. y Maitra, U., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 3122 (1971)
- 93.- Mazunder, R., Chae, Y.B., y Ochoa, S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 63, 98 (1969)
- 94.- Wahba, A.J., Chae, Y.B., Iwasaki, K., Mazunder, R., Miller, M.J., Sabel S. y Sillere, M.A.G., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 285 (1969)
- 95.- Chae, Y.B., Mazunder, R. y Ochoa, S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 63, 828 (1969)
- 96.- Thach, R.E., Hershey, J.W., Kelakofsky, D., Dewey, K.F. y Renold-O'Donnell, E., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 277 (1969)
- 97.- Benne, R. Naaktgeboren, N., Gubbens, J. y Voorma, W.O., *Eur.J.Biochem.* 32, 372 (1973)
- 98.- Hille, M.B., Miller, M.J., Iwasaki, K. y Wahba, A.J., *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 58, 1652 (1967)

- 99.- Kalakofsky, D., Dewey, K.F., Hershey, J.W.B. y Thach, R.E., Proc.Nat. Acad.Sci., USA 61, 1066 (1968)
- 100.- Lalong, J.C., Grunberg-Manago, M., Donden, J., Gros, D. y Gros, F., Nature 226, 505 (1970)
- 101.- Greenshpan, H. y Revel, M., Nature 224, 331 (1969)
- 102.- Rudland, P.S., Whybrow, W.A., Marcker, K.A. y Clark, B.F.C. Nature 222, 750 (1969)
- 103.- Guthrie, C. y Nemura, M., Nature 219, 232 (1963)
- 104.- Grellman, A.P. y Stewart, M., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 61, 719 (1968)
- 105.- Sabel, S. y Ochoa, S., Nature New Biol. 234, 233 (1971)
- 106.- Thibault, J. Chestier, A., Vidal, D. y Gros, F., Biochimie 54, 829 (1972)
- 107.- Pon, C.L., Friedman, S.M., Gualerzi, I., Mol.Gen.Genet. 116, 192 (1973)
- 108.- Sabel, S., Meier, D. y Ochoa, S., Eur.J.Biochem. 33, 332 (1973)
- 109.- a) Rudland, P.S., Whybrow, W.A., y Clark, B.F.C., Nature New Biol. 231, 76 (1971)
b) Grøner, Y. y Revel, M., J.Mol.Biol. 74, 407 (1973)
- 110.- Thach, S.S. y Thach, R.E., Nature New Biol. 229, 219 (1971)
- 111.- Skultchi, A., Ono, Y., Waterson, J., y Lengyel, P., Biochemistry 9 508 (1970)
- 112.- Benne, R., Arentzen, R. y Voorma, S., Biochim.Biophys.Acta 269, 304 (1972)
- 113.- Fakunding, J.L. y Hershey, J.W.B., J.Biol.Chem. 248, 4206 (1973)
- 114.- Mazunder, R., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 70, 1939 (1973) y 69, 2770 (1972)
- 115.- Benne, R., Ebes, F y Voorma, H.D., Eur.J.Biochem.38, 265 (1973)
- 116.- Yarmolansky, M. y de la Haba, G.I., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 45, 1721 (1959)
- 117.- Gilbert, W., J.Mol.Biol. 6, 374 y 389 (1963)
- 118.- Morris, A. y Schweet, R., Biochim.Biophys.Acta 47, 415 (1961)
- 118.- Sarkar, S. y Thach, R.E., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 60, 1479 (1968)
- 119.- Kohler, R.E., Ren, E.Z. y Davis, B.D., J.Mol.Biol. 36, 71 (1968)
- 120.- Subramanian, A.R., Ren, E.Z. y Davis, B.D., Proc.Nat.Acad.Sci, USA 61, 761 (1968)
b) Davis, B.D., Nature 231, 153 (1971)
- 121.- Albrecht, J., Voorma, H.D., van Knippenberg, P.M. y Besh, L., FEBS Lett 6, 297 (1970)
- 122.- Subramanian, A.R., Davis, B.D. y Beller, R.J., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 34, 223 (1969)

- 123.- Miall, S.H., Kato, T. y Tamaki, T., *Nature* 226, 1050 (1970)
- 124.- González, N., Bade, E., y Algranati, I., *FEBS Lett.* 4, 331 (1969)
- 125.- Dubnoff, J.S. y Maitra, U., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 318 (1971)
- 126.- Subramanian, A.R. y Davis, B.D., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 69, 2453 (1971)
- 127.- Spirin, A.D., *FEBS Lett.* 14, 349 (1971)
- 128.- Kaempfer, R., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 2458 (1971)
- 129.- Beller, R.J., Davis, B.D. y Gottlieb, M., *Biochemistry* 13, 939 (1974)
- 130.- Herzog, A., Ghysen, A. y Bollen, A., *Molec.Gen.Genetics* 110, 211 (1971)
- 131.- Agsteribbe, E. y Kroon, A.M., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 51, 8 (1973)
- 132.- Benne, R. y Voorma, H.O., *FEBS Lett.* 20, 447 (1972)
- 133.- Thach, S.S. y Thach, R.E., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 1791 (1971)
- 134.- Lelong, J.C., Cousin, M., Grønberg-Manago, M. y Gros, F., *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 42, 530 (1971)
- 135.- Coutsogeorgopoulos, C., Fico, R. y Miller, J., *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 47, 1056 (1972)
- 136.- Kaempfer, R., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 61, 106 (1968)
- 137.- Nomura, M. y Lowry, C.V., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 58, 946 (1967)
- 138.- Gosh, H. y Khorana, H., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 58, 2455 (1967)
- 139.- Dresden, M.H. y Hoagland, M.B., *J.Biol.Chem.* 242, 1065 (1967)
- 140.- Algranati, I.D., *FEBS Lett* 10 153 (1970)
- 141.- Algranati, I.D., González, N.S., y Bade, E.G., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 62, 574 (1969)
- 142.- Kaempfer, R., *Nature* 228, 534 (1970)
- 143.- Beller, R.J. y Davis, B.D., *J.Mol.Biol.* 55, 477 (1971)
- 144.- Steitz, J.A., *Nature* 224, 957 (1969)
- 145.- Uchida, T., Abe, M., Matsuo, K. y Yoneda, M., *Biochim.Biophys.Acta* 224, 628 (1970)
- 146.- Infante, A.A. y Baierlein, R., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 1780 (1971)
- 147.- Van Dyk-Salkinaja, M.S. y Planta, R.J., *Arch.Biochem.Biophys.* 141, 477 (1970)
- 148.- Kaempfer, R. y Meselson, M., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 209 (1969)
- 149.- Algranati, I.D., González, N.S., García-Patrone, M., Perazzolo, C.A. y Azzam, M.E., *Gene Expression and its Regulation*, Kenney, F.T., Hamkaile, B.A., Favelukes, G. y August, J.T., ed., p.327 (1973). Plenum Press.
- 150.- Perazzolo, C.A., Azzam, M.E. y Algranati, I.D., *Eur.J.Biochem.* 34, 467 (1973)
- 151.- Subramanian, A.R. y Davis, B.D., *J.Mol.Biol.* 74, 45 (1973)

- 152.- Azzam, M.E., Perazzolo, C.A. y Algranati, I.D., *FEBS Lett.* 21, 165 (1972)
- 153.- Azzam, M.E. y Algranati, I.D., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 3866 (1973)
- 154.- Pestka, J., *J.Biol.Chem.* 246, 7723 (1971)
- 155.- Pestka, J., *J.Biol.Chem.* 247, 4669 (1972)
- 156.- a) Smith, A.E. y Marcker, K.A., *J.Mol.Biol.* 38, 241 (1968)
b) Marcker, K.A. y Smith, A.E., *Bull.Soc.Chem.Biol.* 51, 1453 (1969)
- 157.- Galper, J.P. y Darnell, J.E., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 34, 205 (1969)
- 158.- Schwartz, J.H., Meyer, R., Eisenstadt, J.M. y Brawerman, G., *J.Mol. Biol.* 25, 571 (1967)
- 159.- McIlvaine, I., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 316 (1969)
- 160.- Wilson, D.B. y Dintzis, H., *Ibid.* 34, 313 (1969)
- 161.- Masteller, R.D., Culp, W.J. y Hardasty, B., *J.Biol.Chem.* 243, 6343 (1968)
- 162.- Gonnano, F. y Baglioni, C., *Eur.J.Biochem.* 11, 7 (1969)
- 163.- Caskey, C.T., Redfield, B. y Weissbach, M., *Arch.Biochem.Biophys.* 120 119 (1967)
- 164.- RajBhandary, U.L. y Ghosh, H.P., *J.Biol.Chem.* 244, 1104 (1969)
- 165.- Gupta, N.K., *J.Biol.Chem.* 243, 4959 (1968)
- 166.- Kerwar, S.S., Spears, C. y Weissbach, H., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 41, 78 (1970)
- 167.- Smith, A.E. y Marcker, K.A., *Nature* 226, 607 (1970)
- 168.- Takeishi, K., Sikiya, T. y Ukita, T., *Biochim.Biophys.Acta* 199, 559 (1970)
- 169.- a) Bhaduri, S., Chatterjee, N.K., Bose, K.K. y Gupta, N.K., *Biochem. Biophys, Res. Comm.* 40, 402 (1970)
b) Gupta, N.K., Chatterjee, N.K., Bose, K.K., Bhaduri, S. y Chung, A., *J.Mol.Biol.* 54, 145 (1970)
- 170.- Hunter, T. y Jackson, R., *Eur.J.Biochem.* 19, 316 (1971)
- 171.- Leis, J.P. y Keller, E.B., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 40, 416 (1970)
- 172.- Leis, J.P. y Keller, E.B., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 67, 1593 (1970)
- 173.- a) Miller, R.L., Hamada, K., Yang, P.C., Cohen, B. y Schweest, R., *Fed. Proc.* 26, 1125 (1967)
b) Miller, R.L. y Schweest, R., *Arch.Biochem.Biophys.* 125, 632 (1968)
- 174.- Bananau, S., Cox, R.A., Higginsen, B. y Kanagalingham, K., *Biochem.J.* 110, 87 (1968)
- 175.- a) Cohen, B.B., *Biochem.J.* 110, 231 (1968)
b) Cohen, B.B., *Biochem.J.* 115, 523 (1969)
- 176.- Shafritz, D.A., Prichard, P.M., Gilbert, J.M. y Anderson, W.F., *Biochem.*

- Biophys.Res.Comm. 38, 721 (1970).
- 177.- Prichard, P.M., Gilbert, J.M., Shafritz, D.A. y Anderson, W.F., *Nature* 226, 511 (1970)
- 178.- Shafritz, D.A. y Anderson, W.F., *J.Biol.Chem.* 245, 5553 (1970).
- 179.- Shafritz, D.A. y Anderson, W.F., *Nature* 227, 918 (1970).
- 180.- Shafritz, D.A., Laycock, D.G. y Anderson, W.F., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 496 (1971).
- 181.- Crystal, R.G., Shafritz, D.A., Prichard, P.M. y Anderson, W.F., *Proc. Nat.Acad.Sci., USA* 68, 1810 (1971).
- 182.- Shafritz, D.A., Laycock, D.G., Crystal, R.G. y Anderson, W.F., *Proc. Nat.Acad.Sci., USA* 68, 2246 (1971).
- 183.- Shafritz, D.A., Prichard, P.M., Gilbert, J.M., Merrick, W.C. y Anderson, W.F., *Proc.Nat.Acad.Sci, USA* 69, 983 (1972).
- 184.- Prichard, P.M., Picciano, D.J., Laycock, D.G. y Anderson, W.F., *Proc. Nat.Acad.Sci., USA* 68, 2752 (1971).
- 185.- Crystal, R.G. y Anderson, W.F., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 69, 706 (1972).
- 186.- Picciano, D.J., Prichard, P.M., Merrick, W.C., Shafritz, D.A., Graf, H., Crystal, R.G. y Anderson, W.F., *J.Biol.Chem.* 248, 204 (1973).
- 187.- Merrick, W.C., Lubsen, N.H. y Anderson, W.F., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 2220 (1973).
- 188.- Marcus, A., *J.Biol.Chem.* 245, 962 (1970)
- 189.- a) Bewlwy, J.D. y Marcus, A., *Fed.Proc.* 29, 537 (1970).
b) Seal, S.N., Bewley, J.D. y Marcus, A., *J.Biol.Chem.* 247, 2592 (1972).
- 190.- Raeburn, S., Collins, J.F., Moon, H.M. y Maxwell, E.S., *J.Biol.Chem.* 246, 1041 (1971).
- 191.- Schreier, M.H. y Staehelin, T., *Nature New Biol.* 242, 35 (1973).
- 192.- Gupta, N.K., Chatterjee, N.K., Woodley, C.L. y Bose, K.K., *J.Biol. Chem.* 246, 7460 (1971).
- 193.- Woodley, C.L., Chen, Y.C., Bose, K.K. y Gupta, N.K., *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 46, 839 (1972).
- 194.- Gupta, N.K., Woodley, C.L., Chen, Y.C. y Bose, K.K., *J.Biol.Chem.* 248, 452 (1973).
- 195.- Chen, Y.C., Woodley, C.L., Bose, K.K. y Gupta, N.K., *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 48, 1 (1972).
- 196.- Heywood, S.M., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 799 (1969).
- 197.- Heywood, S.M., *Nature* 225, 696 (1970)
- 198.- Heywood, S.M., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 67, 1782 (1970)
- 199.- Heywood, S.M. y Thompson, W.C., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 43, 470 (1971).
- 200.- Bourke, A. y Heywood, S.M., *Biochemistry* 11, 2061 (1972).

- 201.- Levin, D.H. y Kyner, D., *Fed.Proc.* 30, 1289 (1971)
- 202.- Levin, D.H., Kyner, D. y Acs, G., *FEBS Lett.* 25, 258 (1972)
- 203.- Levin, D.H., Kyner, D. y Acs, G., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 41 (1973)
- 204.- Levin, D.H., Kyner, D. y Acs, G., *J.Biol.Chem.* 245, 6416 (1973)
- 205.- a) Comstock, J.P., O'Malley, B.W. y Means, A.R., *Biochemistry* 11, 646 (1972)
- b) Means, A.R., Comstock, J.P. y O'Malley, B.W., *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 45, 759 (1971)
- 206.- Grummt, F. y Bielka, H., *Eur.J.Biochem.* 21, 210 (1971)
- 207.- Ilan, J. e Ilan, J., *Nature New Biol.* 241, 176 (1973)
- 208.- Fuhr, J.E., Lendon, I.M. y Grayzel, A.I., *Proc.Natl.Acad.Sci., USA* 63, 129 (1969)
- 209.- Gasier, E., Rao, P. y Meldave, K., *Biochim.Biophys.Acta* 254, 331 (1971)
- 210.- Leader, D.P., Wool, I.G. y Castles, J.J., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 67 523 (1970)
- 211.- Wottenhall, R., Leader, D. y Wool, I.G., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 43, 994 (1971)
- 212.- Leader, D.P. y Wool, I.G., *Biochim.Biophys.Acta* 262, 360 (1972)
- 213.- a) Mathews, M.B., *Nature* 228, 661 (1970)
- b) Leader, D.P., Klein-Bremhaar, H. y Wool, I.G., *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 46, 215 (1972)
- 214.- Weeks, D.P., Verma, D.P.S., Seal, S.N. y Marcus, A., *Nature* 236, 167 (1972)
- 215.- Marcus, A., Bewley, J.D. y Weeks, D.P., *Science* 167, 1735 (1970)
- 216.- Gae-Claugh, J.P. y Arnstein, H.R.V., *Eur.J.Biochem.* 19, 539 (1971)
- 217.- Bard, E., Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata (1972)
- 218.- Zaslouff, M y Ochoa, S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 3059 (1971)
- 219.- Zaslouff, M. y Ochoa, S., *Ibid* 69, 1796 (1972)
- 220.- McCreskey, R.P., Zaslouff, M. y Ochoa, S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 69, 2451 (1972)
- 221.- Zaslouff, M. y Ochoa, S., *J.Mol.Biol.* 73, 65 (1973)
- 222.- Lubsen, N.H. y Davis, B.D., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 69, 353 (1972)
- 223.- Lubsen, N.H. y Davis, B.D., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 71, 68 (1974) y *Biochim.Biophys.Acta* 335, 196 (1974)
- 224.- Mizuno, S. y Rabinovitz, M., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 787 (1973)
- 225.- Jaklik, W.K. y Becker, Y., *J.Mol.Biol.* 13, 496 (1965)

- 226.- Hagan, B.L.M. y Kerner, A., *Biochim.Biophys.Acta* 169, 139 (1968)
- 227.- Kämpfer, R., *Nature* 222, 951 (1969)
- 228.- Heerz, W. y McCarty, K.S., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 63, 1206 (1969)
- 229.- Heerz, W. y McCarty, K.S., *Biochim.Biophys.Acta* 228, 526 (1971)
- 230.- a) Grollman, A.P. y Huang, M., *Fed.Proc.* 29, 537 (1970)
b) Stewart, M., Grollman, A.P. y Huang, M., *Proc.Nat.Acad.Sci, USA* 68, 97 (1971)
- 231.- Zehavi-Willner, T. y Danon, D., *Eur.J.Biochem.* 33, 258 (1973)
- 232.- Lebleu, B., Marbaix, G., Wérenne, J., Burny, A. y Huez, G., *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 40, 731 (1970)
- 233.- Bonanou-Tzedaki, S. y Arnstein, H.R.V., *Eur.J.Biochem.* 24, 156 (1972)
- 234.- Burgess, A.B. y Mach, B., *Nature New Biol.* 233, 209 (1971)
- 235.- Dettman, G. y Stanley, W.M., *Biochim.Biophys.Acta* 287, 124 (1972)
- 236.- Darnbraugh, C., Hunt, T. y Jackson, R.J., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 48, 1556 (1972)
- 237.- Darnbraugh, C., Legon, S., Hunt, T. y Jackson, R., *J.Mol.Biol.* 76, 379 (1973)
- 238.- Legon, S., Jackson, R.J. y Hunt, T., *Nature New Biol.* 241, 152 (1973)
- 239.- Hunt, T. y Ehrenfeld, E., *Nature New Biol.*, 230, 91 (1971)
- 240.- Ehrenfeld, E. y Hunt, T., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 1075 (1971)
- 241.- Kesover, N.S., Vanderhoff, G.A., Benerefe, B, Hunt, T y Kesover, E.M., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 45, 816 (1971)
- 242.-a) Adamson, S.D., Herbert, E. y Gedschaux, W., *Arch.Biochem.Biophys.* 125, 671 (1968)
b) Adamson, S.D., Herbert, E. y Kemp, S.F., *J.Mol.Biol.* 42, 247 (1968)
c) Adamson, S.D., Howard, G.A. y Herbert, E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.*, 34, 547 (1969)
- 243.- Baglieni, C., Jacobs-Lorena, M. y Meade, H., *Biochim.Biophys.Acta* 277, 188 (1972)
- 244.- Zaslouff, M., *J.Mol.Biol.* 76, 445 (1973)
- 245.- Schreer, R.A., y Moldave, K., *Arch.Biochem.Biophys.*, 154, 422 (1973)
- 246.- Culp, W., Morrissey, J. y Hardesty, B., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 40, 777 (1970)
- 247.- Kyner, D., Zebes, P. y Levin, D., *Biochim.Biophys.Acta* 324, 386 (1973)
- 248.- Schreer, R.A. y Moldave, K., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 48, 1572 (1972)
- 249.- Monasterio, O., Tarragé, A. y Allende, J.E., *J.Biol.Chem.* 246, 1539 (1971)
- 250.- Pêtre, J., *Eur.J.Biochem.*, 14, 399 (1970)

- 251.- Lawford, G.R., Kaiser, J. y Hey, W.C., *Can.J.Biochem.* 49, 130 (1971)
- 252.- Nakaya, K., Singhranu, R. y Wool, I.G., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 54, 246 (1973)
- 253.- Rabinovitz, M., Freedman, M.L., Fisher, J.M. y Maxwell, C.R., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 34, 567 (1969)
- 254.- Henshaw, E.C., Guiney, D.G. y Hirsch, C.M., *J.Biol.Chem.* 248, 4367 (1973)
- 255.- Hirsch, C.A., Cox, M.A., van Venrooij, W.J. y Henshaw, E.C., *J.Biol.Chem.* 248, 4377 (1973)
- 256.- Ayuso-Parrilla, M., Hirsch, C.A. y Henshaw, E.C., *J.Biol.Chem.* 248, 4394 (1973)
- 257.- Zucker, W.V. y Schulman, H.M., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 59, 582 (1968)
- 258.- Freedman, M.L., Heri, M y Rabinovitz, M., *Science* 157, 327 (1967)
- 259.- Williams, G.R., y Maser, J.A., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 53, 52 (1973)
- 260.- Girard, J.A., Latham, H., Penman, S. y Darnell, J.E., *J.Mol.Biol.* 11, 187 (1965)
- 261.- Perry, R.P. y Kelley, D.E., *J.Mol.Biol.* 16, 255 (1966)
- 262.- a) Baglieni, C., Vasco, G. y Jacobs-Lorena, M., *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 34, 555 (1969)
b) Jacobs-Lorena, M. y Baglieni, C., *Biochem.Biophys.Acta* 224, 165 (1970)
- 263.- a) Kabat, D. y Rich, A., *Biochemistry* 8, 3742 (1969)
b) Kabat, D., *Biochemistry* 9, 4160 (1970)
- 264.- Howard, G.A., Adamson, S.D. y Herbert, E., *J.Biol.Chem.* 245, 6237 (1970)
- 265.- Warner, J., Knopff, P y Rich, A., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 49, 122 (1963)
b) Warner, J., Rich, A. y Hall, C., *Science* 138, 1399 (1962)
- 266.- Norman, M., Gamulin, S. y Clark, K., *Biochem.J.*, 134, 387 (1973)
- 267.- Gadchaux, W., Adamson, S.D. y Herbert, E., *J.Mol.Biol.* 27, 57 (1967)
- 268.- a) van Venrooij, W.J.W., Henshaw, E.C. y Hirsch, C.A., *Biochim. Biophys.Acta* 259, 127 (1972)
b) van Venrooij, W.J.W., Henshaw, E.C. y Hirsch, C.A., *J.Biol.Chem.* 245, 5947 (1970)
- 269.- Marks, P.A., Burka, E.R., Conconi, F.M., Perl, W. y Rifkind, R.A., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 53, 1437 (1965)
- 270.- McCormick, W. y Penman, S., *J.Mol.Biol.* 39, 315 (1969)
- 271.- Kaempfer, R. y Kaufman, J., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 69, 3317 (1972)
- 272.- Henshaw, E.C. y Loebenstein, J., *Biochim.Biophys.Acta*, 199, 405 (1970)

- 273.- Spaeren, U., Olsnes, S. y Pihl, A., *Biochim.Biophys.Acta* 272, 663 (1972)
- 274.- a) Laycock, D.G. y Hunt, J.A., *Nature* 221, 1118 (1969)
b) Leckard, R.E., y Lingrel, J.B., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 37, 204 (1969)
c) Leckard, R.E. y Lingrel, J.B., *Nature New Biol.* 233, 204 (1971)
- 275.- Nienhuis, A.W. y Andersen, W.F., *J.Clinical Investigation* 50, 2458 (1971)
- 276.- Rosenfeld, G.C., Comstock, J.P., Means, A.R., y O'Malley, B.W., *Biochem Biophys.Res.Comm.* 46, 1695(1972)
- 277.- Shafritz, D.A., Drysdale, J.W. y Isselbacher, K.J., *J.Biol.Chem.* 248 3220 (1973)
- 278.- a) Stavnezer, J y Huang, R.Ch.C., *Nature New Biol* 230, 172 (1971)
278.- b) Swan, D. Aviv, H. y Leder, P., *Proc.Nat.Acad.Sci.,USA* 69 1967 (1972)
- 279.- a) Berns, A.J.M., Straus, G.J.A.M. y Bloemendal, H., *Nature New Biol.* 236, 7 (1972)
b) Berns, A., Schreurs, V., van Kraaikamp, M. y Bloemendal, H., *Eur.J. Biochem.* 33, 551 (1973)
- 280.- Partington, G.^A, Kemp, D.J. y Rogers, G.E., *Nature New Biol.* 246, 33 (1973)
- 281.- Vaquero, C., Reibel, L, Delauney, J y Schapira, G., *BiochemBiophys. Res,Comm.* 54, 1171 (1973)
- 282.- Williamson, R., Clayton, R. y Truman, D.E.S., *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 46, 1936 (1972)
- 283.- Chantrenne, H. y Marbaix, G., *Biochimie* 54, 1 (1972)
- 284.- a) Mathews, M.B., *Biochim.Biophys.Acta* 272, 108 (1972)
284.- b) Smith, A.E., *Eur.J.Biochem* 33, 301 (1973)
- 285.- Hosman, D., Pemberton, R. y Taber, R., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 68, 2716 (1971)
- 286.- Mathews, M.B., Osborn, M. y Lingrel, J.B., *Nature New Biol.* 233, 206 (1971)
- 287.- Tarada, M., Metafara, S., Banks, J., Dew, L.W., Bank, A. y Marks, P. A., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 47,766 (1972)
- 288.- Metafara, S. Tarada, M., Dew, L.W., Marks, P.A. y Bank, A., *Proc.Nat. Acad.Sci., USA* 69, 1229 (1972)
- 289.- Mathews, M.B., Osborn, M., Berns, A.J. y Bloemendal, H., *Nature* 236, 5 (1972)
- 290.- Ruiz-Carrillo, A., Beato, M, Schutz, G., Feigelson, P y Allfrey, V.C. *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 3641 (1973)
- 291.- a) Sampson, J. y Berghetti, A.F., *Nature, New Biol.* 238, 200 (1972)

Try 11, 3636 (1972)

- 292.- Schreier, M.H. y Stachelin, T., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 70, 462 (1973)
- 293.- a) Efrom, D. y Marcus, A., *FEBS Lett.* 33, 23 (1973)
b) Roberts, B.E. y Paterson, B.M., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70, 2330 (1973)
- 294.- Graziadei, W.D. y Lengyel, P., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46, 1816 (1972)
- 295.- Jenkins, N., Taylor, M.W. y Raff, A., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 70, 3287 (1973)
- 296.- a) Berns, A.J.M., van Kraaikamp, M., Bloemendal, H. y Lane, C.D., *Proc. Nat.Acad.Sci., USA*, 69, 1606 (1972)
b) Lane, C.D., Marbaix, G. y Gurdon, J.B., *J.Mol.Biol.*, 61, 73 (1971)
c) Gurdon, J.B., Lane, C.^U, Woodland, H.R. y Marbaix, G. *Nature* 233 177 (1971)
- 297.- Lane, Ch.D., Gregory, C. y Warel, C., *Eur.J.Biochem.* 34, 319 (1973)
- 298.- Cashion, L.M. y Stanley, W.M., *Biochim.Biophys.Acta*, 324, 410 (1973)
- 299.- Cohen, B.B., *Biochim.Biophys.Acta* 247, 133 (1971)
- 300.- Hall, N.D. y Arnstein, H.R.V., *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 54, 1489 (1973)
- 301.- a) Lebleu, B., Nudel, U., Falceff, E., Prives, C. y Revel, M., *FEBS Lett.* 25, 97 (1972)
b) Nudel, U., Lebleu, B. y Revel, M., *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 70 2139 (1973)
- 302.- Wigle, D.T. y Smith, A.E., *Nature New Biol.* 242, 136 (1973)
- 303.- Clemens, M.J. y Tata, J., *Biochim.Biophys.Acta*, 269, 130 (1972)
- 304.- Fuhr, J.E. y Natta, C., *Nature New Biol.* 240, 274 (1973)
- 305.- Schreier, M.H., Stachelin, T., Stewart, A., Gander, E. y Scherrer, K., *Eur.J.Biochem.* 34, 213 (1973)
- 306.- Bersock, H., Fischer, E.H. y Keggley, G., *J.Biol.Chem.* 229, 1059 (1957)
- 307.- Lamfrem, H. y Knopf, P.M., *J.Mol.Biol.* 9, 558 (1964)
- 308.- Allen, E.H. y Schweet, R., *J.Biol.Chem.* 237, 760 (1962)
- 309.- Masteller, R. Culp, W. y Hardesty, B., *Proc.Nat.Acad.Sci.*, 57, 1817 (1967)
- 310.- Warburg, O. y Christian, W., *Biochem.Z.*, 310, 384 (1941)
- 311.- Schweet, R. y Heintz, R., *Ann.Rev.Biochem.* 35, 629 (1966)
- 312.- Waxman, H.S. y Rabinovitz, M., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 19, 538 (1965)
y *Biochim.Biophys.Acta*, 129, 369 (1966)
- 313.- Colembé, B., Felicetti, L. y Baglioni, C., *Biochim.Biophys.Acta* 119, 109 (1966)
- 314.- Bishop, J., *Arch.Biochem.Biophys.* 125, 449 (1968)

- 315.- Colombo, B, Vesco, C. y Baglioni, C., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 61, 651 (1968).
- 316.- Zylber, E.A., Tesis Doctoral. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Nacional de La Plata,(1967).
- 317.- Hardesty, B., Hutton, J.J., Arlinghaus, R. y Schweest, R., Proc.Nat. Acad.Sci.,USA 50, 1078 (1963).
- 318.- Ottolenghi, S., Comi, P., Giglioni, B., Gianmi, A.M. y Guidotti, G. G., Eur.J.Biochem. 33, 227 (1973).
- 319.- Atlas of Protein Sequence and Structure, O.Dayhoff, Ed. (1969).
- 320.- Talens, J., Kalousek, F. y Bosch, L., FEBS Lett. 12, 4 (1970).
- 321.- MacDonald, J.S. y Golberg, I.H., Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 1 (1970).
- 322.- Sadnik, I., Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. (1972).
- 323.- Heiberg, R., Olsnes, S. y Pihl, A., FEBS Lett. 18, 169 (1971).
- 324.- Kabat, D., Biochemistry 10, 197 (1971).
- 325.- Bruns, G.P. y London, I.M., Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 236 (1965)
- 326.- a) Waxman, H.S. y Rabinovitz, M., Biochem.Biophys.Res.Comm. 19, 538 (1965)
- b) Rabinovitz, M. y Waxman, H.S., Nature 206, 897 (1965).
- 327.- Hunt, T., Vanderhoff, G. y London, I.M., J.Mol.Biol. 66, 471 (1972)
- 328.- a) Rich, A., Warner, J.R. y Goodman, H.M., Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 28, 269 (1963).
- b) Hardesty, B., Miller, R. y Schweest, R., Proc.Nat.Acad.Sci., USA 50, 924 (1963).
- 329.- a) Favelukes, G., Sorgentini, D., Bard, E. y Martone, C. Comunicación libre. 8º Congreso Internacional de Bioquímica. Suiza. (1970).
- b) Favelukes, G., Sorgentini, D., Bard, E. y Martone de Borrajo, C. 11º Simposio Internacional Latinoamericano "Síntesis de proteínas y ácidos nucleicos". La Plata, noviembre 1971. Publicado en "Gene Expression and its regulation" (Kenney, F.T., Hamkalo, B.A., Favelukes, G. y August, J.T., Eds.) Plenum Press, New York, p.393 (1973)
- 330.- García Patrone, M., González, N.S. y Algranati, I.D., Proc.Nat.Acad. Sci., USA 68, 2822 (1971).
- 331.- García Patrone, M., González, N.S. y Algranati, I.D., FEBS Lett. 24, 126 (1972).

- 332.- Delaunay, J., Loeb, J.E., Pierre, M. y Schapira, G., *Biochim. Biophys.Acta*, 312, 147 (1973).
- 333.- a) Loeb, J.B. y Blat, C., *FEBS Lett.* 10, 101 (1970) .
b) Blat, C. y Loeb, J.B., *FEBS Lett.* 18, 124 (1971).
- 334.- Barela, T.D. y Kiser, D.E., *Biochim. Biophys. Acta* 335, 218 (1974)
- 335.- Eil, C. y Wool, I.G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43, 1001 (1971).
- 336.- Eil, C. y Wool, I.G., *J. Biol. Chem.* 248, 5130 (1973).
- 337.- Vesco, C. y Colombo, B., *J. Mol. Biol.*, 47, 335 (1970).
- 338.- Cawthon, M.L., Bitte, L.F., Krystosek, A. y Kabat, D., *J. Biol. Chem.* 249, 275 (1974).
- 339.- Kabat, D., *J. Biol. Chem.*, 247, 5338 (1972).
- 340.- Bitte, L. y Kabat, D., *J. Biol. Chem.* 247, 5345 (1972).
- 341.- Robinson, G.A., Butcher, R.W., y Sutherland, E.W., *Ann. Rev. Biochem.* 37, 149 (1968).
- 342.- Walsas, E., *Acta. Chem. Scan.* 12, 528 (1958)
- 343.- Ayuso-Parrilla, M., Henshaw, E.C. y Hirsch, C.A., *J. Biol. Chem.* 248, 4386 (1973).

TABLAS

TABLA 1

Unión de las partículas subribosómicas nativas-³²P a polisomas, durante la síntesis de proteínas en sistemas acelulares

Partículas subribosómicas- ³² P	Incremento de ³² P (% del total) en la fracción 80S - polisomas
1- 40S- ³² P	17 %
2- 60S- ³² P	19 %

Las fracciones ribosómicas-³²P indicadas: línea 1-, 40S-³²P (0,0308 mg, 1819 cpm) línea 2-, 60S-³²P (0,0307 mg, 1860 cpm) fueron incubadas durante 15 minutos a 25° en un sistema acelular con polisomas y sobrenadante (M.18) suplementado con hemina 0,025 mM, conteniendo en un volumen final de 0,0625 ml, 0,040 ml de lisado 1:1 enriquecido en polisomas (M.6.3). Como control en cada experimento se hicieron incubaciones con la sola presencia de las subpartículas-³²P correspondientes, en el medio salino J. Terminadas las incubaciones, se enfriaron las muestras y se depositaron, luego del agregado de igual volumen de solución E₁, sobre gradientes lineales de sacarosa 15-50% en solución E₁, que se centrifugaron durante 135 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-Ti) a 2°. Cada gradiente fué analizado a 254 nm y se recogieron fracciones de tamaños programados, que se recibieron sobre sendos 3 ml de solución E₁. Las muestras se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa, en frío, lavando con solución E₁, y se determinó su radioactividad de ³²P en un contador de flujo gaseoso.

La radioactividad de ³²P transferida a las regiones de 80S o más pesadas, expresada como % de la radioactividad total en el gradiente, se calculó por diferencia de las distintas fracciones homólogas, en los respectivos pares de gradientes (experimental - control), como se muestra en la Figura 4.

TABLA 2

Incorporación de material ^{32}P de partículas 80S- ^{32}P a polisomas por efecto del extracto ribosómico. Influencia de la energía.

Incubación 80S- ^{32}P en presencia de	Variación de radioactividad ^{32}P (% del total, con respecto al control)		
	subpartículas	80S	Polisomas
1. ER + energía	0,6	-15,4	14,8
2. ER	-1,5	0,1	1,4
3. energía	-5,2	1,1	4,1

Se incubaron durante 10 minutos a 30° , 0,048 mg (2700 opm) de partículas 80S- ^{32}P en un volumen final de 0,125ml, en presencia de 0,265 mg de polisomas purificados (M.8), $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 2,5mM, KCl 70mM, Tris.HCl (pH 7,5) 26mM, 2-mercaptoetanol 16mM, sRNA 0,072 mg/ml, fracción enzimática (SA40-70) 3 mg/ml, mezcla de 20 aminoácidos 0,04mM o/u y, donde se indica, con el agregado de extracto ribosómico ER-1 (en relación ER:Rb 80S- ^{32}P = 5) y/o energía (ATP.Mg 1mM, CTP.Mg 0,2mM, creatina fosfato 7,2mM y creatina quinasa 0,04 mg/ml). En la incubación control se omitió el agregado de ER y de energía. Se terminó la incubación por enfriamiento y se depositaron las muestras sobre gradientes de sacarosa 15-50% en solución E_1 . Luego de centrifugar (rotor SW41-Ti) durante 135 minutos a 40.000 rpm, a 2° , se analizó cada gradiente espectrofotométricamente a 254nm y se recogieron 25 fracciones que se recibieron sobre 3 ml de solución E_1 . Luego de filtrar a través de membranas de nitrocelulosa, en frío, y lavar con solución E_1 , se determinó la radioactividad retenida en las membranas en un contador de flujo gaseoso (M.22.3 y M.24).

Las recuperaciones totales de radioactividad respecto de las colocadas en cada gradiente fueron: control, 76%; gradiente 1, 74%; gradiente 2, 56%; gradiente 3, 66%.

La transferencia de radioactividad de ^{32}P , expresada como % de la radioactividad total recuperada en el gradiente, se calculó por diferencia de las distintas fracciones de los gradientes con respecto al control. Los valores negativos indican el origen del material transferido.

TABLA 3

Efecto del extracto ribosómico crudo sobre la incorporación, por ribosomas 80S nativos, de fenilalanina-¹⁴C en uniones peptídicas, con mensajero endógeno o con poli-U, en un sistema acelular con componentes solubles definidos

Incubación, 60 minutos a 37°	pmoles Phe- ¹⁴ C / mg de ribosomas	
	sin ER	con ER
1. Ribosomas 80S nativos.	28	69
2. Ribosomas 80S nativos + poli-U	309	464

Las incubaciones (0,250 ml) se hicieron en el sistema acelular con ribosomas 80S nativos (1 mg/ml) y componentes solubles definidos (M.19), con fenilalanina-¹⁴C, 10 Ci/mol, durante 60 minutos a 37°. En las incubaciones en que se agregó el ER-1 crudo (M.15), se hizo en relación ER:Rb = 1,7.

Cuando se midió la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli-U (100 µgr/ml) (línea 2), la concentración de Mg⁺⁺ libre se modificó de 2,5mM a 4,4mM.

Las mezclas de incubación se procesaron según la técnica para determinar la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas, en el contador proporcional.

Los ribosomas 80S nativos fueron obtenidos por fraccionamiento de la población ribosómica total de un lisado 1:4 (M.8), en gradiente de densidad preparativo.

TABLA 4

Inactivación del extracto ribosómico por efecto de la temperatura. Pérdida de la actividad disociante

Inocubación	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)
80S + ER-1 fresco	18,6
80S + ER-1 calentado	1,8

Una alícuota de ER-1 crudo fué calentada a 60° durante 8 minutos, y enfriada rápidamente. Se midió el efecto disociante del ER-1 fresco y del ER-1 calentado, por inocubación con 0,100mg de ribosomas 80Sag-A (N.10. 2), en 0,0625ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, durante 10 minutos a 25° (Relación ER:Rb = 1,7).

Se agregó igual volumen de solución E₁ y se analizaron las muestras por ultracentrifugación en gradientes analíticos de sacarosa 15-50%, durante 165 minutos a 40.000 rpm. (rotor SW41-Ti).

De la integración gráfica de los registros de λ 254nm, obtenidos por análisis de los gradientes, se calculó el porcentaje del pico de 80S en cada muestra.

Se tabularon las disminuciones de ese porcentaje con respecto al control (80S incubados en iguales condiciones, pero en ausencia del extracto ribosómico).

TABLA 5

Influencia de la temperatura de preincubación del extracto ribosómico sobre su efecto disociante de ribosomas 80S a 25°

Temperatura de preincubación del extracto ribosómico	Variación de 80S, % del total. (respecto a 80S solos)
-	-16,4
25°	-17,5
37°	-12,2
45°	- 6,8

Alícuotas de un extracto desalado ER-1-025, (M.15.2), fueron preincubadas durante 10 minutos a las temperaturas indicadas, e inmediatamente enfriadas. Se incubó durante 10 minutos a 25°, 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en 0,0937 ml de medio salino acelular (Solución J), con ATP.Mg mM (que suple las necesidades de energía; Tabla 12), en presencia de los distintos ER-025 (en relación ER:Eb = 6,9).

Se agregó en frío 0,070 ml de solución E₁ y se depositaron 0,100 ml de cada mezcla sobre gradientes de sacarosa 15-50%, en solución E₁. Se analizaron las muestras por centrifugación durante 215 minutos a 36.000 rpm.

Se calculó el porcentaje del pico de 80S por integración gráfica de los registros de A_{254nm} y se tabuló la disminución del mismo con respecto al control (80S incubados en ausencia del extracto ribosómico).

TABLA 6

Separación de las actividades disociante y de estimulación global de la síntesis de proteínas

Extracto ribosómico	I Efecto disociante: Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)	II Incorporación de valina- ¹⁴ C a proteínas. (pmoles / mg de ribosomas)
1. ER-1 crudo	2,0	185
2. ER-d	13,7	3
3. ER-G25	25,6	4

El ER-1 crudo fué ensayado como tal o bien tratado previamente por diálisis (ER-d) contra solución I (durante 2 horas) (M.15.1) o por pasaje a través de una columna de Sephadex G25 (ER-G25), equilibrada con la misma solución (M.15.2)

Columna I: Se incubaron, durante 10 minutos a 25°, 0,100 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en 0,0625 ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, en presencia de los distintos ER, cuya relación ER:Rb fué de: (1) 3,4; (2) 2,8 y (3) 3,4.

Se agregó igual volumen de solución E₁ y se analizaron las muestras por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-50%, durante 165 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-Ti).

Los resultados se expresaron como la disminución del porcentaje del pico de A_{254nm} correspondiente a 80S, respecto del total, medido por planimetría, comparado con el del control (80S ag sin agregado del ER).

Columna II: Se incubaron los ribosomas 80Sag-B (concentración final 1 mg/ml) en presencia de los distintos extractos ribosómicos, en un sistema acelular con componentes solubles definidos, para la síntesis de globina, con valina-¹⁴C, 10 Ci/mol, 0,05mM, en un volumen final de 0,250ml, durante 60 minutos a 37°. Las muestras se procesaron para medir la incorporación de aminoácido radioactivo a proteínas.

Las relaciones ER:Rb fueron de; (1) 4,9; (2) 4,2 y (3) 4,1.

La incorporación basal de valina-¹⁴C (80S en el sistema acelular completo, sin agregado del extracto ribosómico), fué de 3 picomoles/ mg de ribosomas.

TABLA 7

La actividad disociante del extracto ribosómico. Condiciones en que se la extrae de la población ribosómica total

Ribosomas totales lavados con Mg ⁺⁺ K ⁺	ER-G25 Extracción con KCl	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)
a. - -	0,5M	28,3
b. - -	1,0M	23,9
c. 2mM 70mM	1,0M	8,3
d. 2mM 150mM	1,0M	9,2
e. 10mM 250mM	1,0M	0

(a y b) Ribosomas totales (RbT-2): aislados por sedimentación de un lisado de reticulocitos y disueltos en solución E₂.

(c, d y e) Ribosomas totales lavados: Se suspendieron los ribosomas totales (RbT-2) en solución F con sales cuyas concentraciones se indican en la tabla, se sedimentaron 90 minutos a 50.000 rpm (tubos de 2,5ml del rotor 50, Spinco) y se resuspendieron en solución E₂.

Los distintos ER-G25 se obtuvieron por lavado de los distintos ribosomas totales con KCl (a concentración final 0,5M ó 1M, según se indica) y desalado con Sephadex⁶²⁵, y se incubaron (ER:Rb = 4) durante 10 minutos a 25°, con 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM (que suple las necesidades de energía; ver R.3.6.3)

El ión K⁺ se agregó como KCl ó como KCl + ER.

Se agregó, en frío, 0,070 ml de solución E₁ y se sembraron muestras de 0,100ml sobre gradientes lineales de sacarosa 15-50%.

Se analizaron las muestras por ultracentrifugación durante 215 minutos a 36.000 rpm (rotor SW41-Ti).

Se calculó el porcentaje del pico de 80S en cada muestra por integración gráfica de los registros de A_{254nm}, y se tabuló la disminución de ese porcentaje con respecto al control (ribosomas 80S incubados en iguales condiciones, pero en ausencia de extracto ribosómico).

TABLA 8

Efecto inhibitorio sobre la actividad disociante por cantidades altas del extracto ribosómico dializado

Relación ER:Eb	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)
2,86	27,9
5,72	54,2
11,44	30,2

Se incubó 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80S ag-B), en 0,0937 ml de medio salino acelular, con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, en presencia de cantidades crecientes de extracto ribosómico dializado (ER-d), durante 10 minutos a 25°.

El ión K⁺ se agregó como ER + KCl.

Se agregó 0,070ml de solución E₁ y se depositaron muestras de 0,100ml sobre gradientes lineales de sacarosa 15-50%. El análisis se realizó por centrifugación durante 165 minutos a 40.000 rpm.

La mezcla control contenía 0,070 mg de ribosomas 80Sag-B, en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J), sin energía, y se incubó en iguales condiciones.

Se calculó el porcentaje del pico de 80S por integración gráfica de los registros de A_{254nm} y se tabuló la disminución del mismo con respecto al control.

TABLA 9

Efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas sobre
la actividad disociante del extracto ribosómico

Incubación de 80S + ER en presencia de	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)
-	20
Cicloheximida 1mM	20
Esparsomicina 0,1mM	21
Puromicina 1mM	23
Acido fusídico 0,1mM	16
NaF 20mM	20

Se midió el efecto disociante del ER-G25 por incubación con 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) (Relación ER:Rb = 6,2), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM, durante 10 minutos a 25°, sin agregados, o en presencia de los distintos inhibidores, en las concentraciones indicadas en la tabla.

A las mezclas enfriadas se les agregó 0,070ml de solución E₁, y se depositaron muestras de 0,100 ml sobre gradientes de sacarosa 15-50%, que se centrifugaron durante 175 minutos a 40.000 rpm.

Se analizaron las muestras por registro de la A_{254nm} y se calculó el porcentaje del pico de 80S de cada uno, por integración gráfica de los mismos.

Se tabuló la disminución del mismo con respecto al control (80S incubados sólo, en ausencia del extracto ribosómico).

TABLA 10

Efecto disociante del extracto ribosómico sobre ribosomas monómeros obtenidos por distintos procedimientos

Experimento N°	Relación ER:Rb	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)
1) <u>Con ER-d:</u>		
a- Ribosomas 80S: nativos	5,2	26,6
b- Ribosomas 80S- F	5,6	27,2
c- Ribosomas 80Sag-B	5,4	25,0
2) <u>Con ER-G25:</u>		
o- Ribosomas 80Sag-B	4,0	24,8
d- Ribosomas 80S-R	4,3	23,3

Se inubaron durante 10 minutos a 25°, 0,070mg de ribosomas, en 0,0937ml de medio salino acelular (solución J) en presencia de:

Experimento (1) ER-d (5 horas), ATP.Mg.1mM y GTP.Mg 0,2mM

Experimento (2) ER-G25 y ATP.Mg 1mM (este supe las necesidades de energía (ver sección R.3.6.1))

Se agregó 0,070 ml de solución E₁ fría. La siembra de las muestras en los gradientes, análisis de los mismos y la obtención de los porcentajes de los picos de 80S, así como el cálculo de su variación con respecto al control se realizó en forma semejante a la detallada en la Figura 16.

a- Ribosomas 80S nativos: Obtenidos por fraccionamiento de la población ribosómica total de un lisado 1:4, en gradientes preparativos de sacarosa.

b- Ribosomas 80S-F: Obtenidos por lisis de células enteras incubadas en presencia de NaF 10mM durante 90 minutos a 37°, y sedimentación de la población ribosómica.

c- Ribosomas 80S agotados. 80Sag-B: Obtenidos de polisomas purificados, incubados en el sistema acelular con componentes solubles definidos, durante 90 minutos a 37°, y posterior aislamiento en gradientes preparativos de sacarosa.

d- Ribosomas 80S reasociados. 80S-R: Obtenidos de polisomas purificados, incubados exhaustivamente en el sistema acelular con componentes solubles definidos (90 minutos a 37°), disociados por tratamiento con KCl 0,5 M (durante 15 minutos a 0°) y reasociados por dilución a KCl 60 mM (con solución E₂, sin KCl). Se aislaron por sedimentación en el rotor 50. (Modificación del método de Falvey y Stehelin (7)).

TABLA 11

Efecto del agregado de energía sobre la actividad
disociante de distintos extractos ribosómicos

Tipo de ER	Relación ER:Rb	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S solos)	
		(a) sin energía	(b) con energía
1 - ER-1, crudo	3,4	12,0	23,5
2 - ER-d, dializado	5,7	14,5	56,5
3 - ER-G25, desalado	3,4	15,0	36,0

Se incubaron 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), durante 10 minutos a 25°, en presencia de los distintos extractos ribosómicos (en las relaciones ER:Rb indicadas en la tabla), en un volumen de 0,0937 ml de:

a) Medio salino acelular (solución J)

b) Medio salino acelular con energía (ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM)

El ión K^+ se agregó como KCl ó como ER + KCl.

A las mezclas enfriadas se les agregó 0,070ml de solución E₁ y se depositaron muestras de 0,100ml sobre gradientes de sacarosa 15-50%, que se analizaron por centrifugación durante 165 minutos a 40.000 rpm. Se obtuvieron los porcentajes de los picos de 80S por integración gráfica de los registros de A_{254nm} y se tabuló la diferencia de los mismos con respecto al control (ribosomas 80S incubados como en (a), pero en ausencia de extracto ribosómico)

Los ribosomas 80S incubados como en (b), pero en ausencia del extracto ribosómico, mostraron una disminución de 14,2%.

TABLA 12

Influencia de ATP y/o GTP sobre el efecto
disociante del extracto ribosómico

80S + ER	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S + energía)	
	I. ER-d	II. ER-G25
1. ———	15	8
2. + GTP.Mg 0,2mM	15	11
3. + ATP.Mg 1 mM	26	24
4. + GTP.Mg 0,2mM + ATP.Mg 1mM	24	26

Se incubaron 10 minutos a 25°, 0,070mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en presencia de ER-d (columna I) ó ER-G25 (columna II) (en relación ER:Rb de 6,3 y 3,4 respectivamente), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J) solos, o con el agregado de nucleósido-trifosfatos, según se especifica.

Se agregó 0,070ml de solución E₁ a las mezclas de incubación centrifugadas, y se depositaron muestras de 0,100ml sobre gradientes de sacarosa 15-50%. Se centrifugó durante 165 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-Ti) y se analizaron los gradientes por registro de la A_{254nm} .

Se obtuvieron los porcentajes de 80S por planimetría y se tabularon las diferencias respecto al control (ribosomas 80S incubados como en la línea 4, en medio salino acelular, con ATP.Mg y GTP.Mg, pero en ausencia de extracto ribosómico

TABLA 13

Influencia de los nucleosido-trifosfatos sobre
la actividad disociante del extracto ribosómico

80S + ER	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S + ER)
+ ATP.Mg 1mM	8
+ GTP.Mg 1mM	-2
+ CTP.Mg 1mM	-2
+ UTP.Mg 1mM	1

Se incubaron durante 10 minutos a 25°, 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en presencia de ER-G25 (en relación ER:Rb = 6,4), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J) con cada uno de los nucleosido-trifosfatos enumerados en la tabla.

A las mezclas de incubación enfriadas, se les agregó 0,070 ml de solución E₁ y se depositó 0,100 ml de cada mezcla sobre gradientes de sacarosa 15-50%, que se centrifugaron durante 175 minutos a 40.000 rpm y se analizaron por registro de la A_{254nm}.

El porcentaje del pico de 80S se calculó por integración gráfica

Se tabularon las diferencias respecto al control (ribosomas 80S en presencia de extracto ribosómico), cuyo efecto disociante había sido 23%.

TABLA 14

Efecto de los nucleósido-fosfatos de
Adenosina sobre la actividad disociante

80S + ER	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S + ER)
+ ATP 1mM	23
+ ADP 1mM	0
+ AMP 1mM	0

0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), se incubaron durante 10 minutos a 25° en presencia de ER-G25 (en relación ER:Rb = 6,2), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J), con los agregados especificados en la tabla. El ATP fué acompañado por una cantidad equimolar de $Mg(CH_3COO)_2$; las cantidades del catión agregadas con ADP y con AMP fueron calculadas (342) de modo de no modificar la concentración de Mg^{++} libre, 2mM.

El análisis de las muestras y el cálculo de los porcentajes de 80S en cada una de ellas se hizo según lo especificado en la Tabla 13.

TABLA 15

Influencia de la concentración del ión Mg^{++} sobre
el efecto disociante del extracto ribosómico

80S + ER, incubados en un medio con concentración final de Mg^{++}	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S a la cada concentración de Mg^{++})
1 mM	20,9
2 mM	21,0
3 mM	12,5
5 mM	6,2

Se incubó durante 10 minutos a 25°, 0,070mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en presencia de ER-G25 (en relación ER:Rb = 4), en 0,0937 ml de medio salino acelular con concentraciones variables de $Mg(CH_3COO)_2$ (según se indica en la tabla), y ATP.Mg 1mM. El ión K^+ se agregó como KCl ó como KCl + ER.

Terminada la incubación se agregó, luego de enfriar las mezclas, 0,070ml de solución de KCl 70mM, Tris.HCl (pH 7,5) 2mM y $Mg(CH_3COO)_2$ en concentración igual que la de la muestra y se sembraron 0,100ml de cada una de las muestras sobre gradientes de sacarosa 15-50% en solución salina igual a la que se usó para diluir la muestra en cada caso.

Se centrifugó durante 215 minutos a 36.000 rpm y se analizaron las muestras mediante el registro de A_{254nm} . Después de la planimetría de los perfiles, se tabularon las variaciones respecto del control (80S incubados en cada uno de las concentraciones de $Mg(CH_3COO)_2$ indicadas, pero en ausencia del extracto ribosómico.

TABLA 16

Actividad disociante del extracto ribosómico. Efecto comparativo del ATP y sus análogos AMPCPP y AMPPCP

80S + ER	Disminución de 80S, % del total (respecto a 80S + ER)
+ AMPCPP 1mM	1,1
+ AMPPCP 1mM	11,1
+ ATP 1mM	13,5

0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) se incubaron durante 10 minutos a 25°, en presencia de ER-d (en relación ER:Rb = 4,1), en 0,0937 ml de medio salino acelular (solución J), con los agregados especificados en la table (como complejos de Mg⁺⁺).

El análisis de las muestras y el cálculo de los porcentajes de 80S se hizo según lo especificado en la Tabla 13.

El efecto disociante por el extracto ribosómico sólo (ribosomas 80S + ER-d), fué de 5,5%.

El ER-d fué dializado durante 17 horas, contra solución I que contenía Norit A (1 mg/ml).

TABLA 17

Preincubación parcial de los ribosomas 80S o bien del extracto ribosómico con ATP. Su influencia sobre la reacción de disociación

Preincubación	Inocubación	Concentración final ATP	Disminución 80S, % del total (respecto a 80S solos)
1. —	80S + ER	0,00 mM	21,2
2. —	80S + ER	0,33 mM	33,4
3. ER + ATP 1mM	+ 80S	0,33 mM	34,6
4. 80S + ATP 1mM	+ ER	0,33 mM	38,4
5. —	80S + ER	1,00 mM	38,4

Se incubaron durante 10 minutos a 25°, 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en presencia de ER.5-G25 (relación ER:Rb = 6,7), en un volumen final de 0,0937 ml, con medio salino acelular (solución J), sólo o con ATP.Mg, según se especifica. El ATP.Mg se agregó directamente a la mezcla de incubación, o como ATP.Mg ya presente en la mezcla de preincubación. Esta se realizó durante 10 minutos a 25°, en un volumen de 0,031 ml, conteniendo el medio salino acelular, ATP.Mg 1mM y ER u 80S según se indica en la tabla. Una vez terminada, se enfrió y se agregó el componente faltante, completando el volumen a 0,0937 ml.

Terminada la incubación, se agregaron 0,070 ml de solución I y se analizaron 0,100 ml de cada mezcla por centrifugación en gradientes de sacarosa 15-50%, durante 215 minutos a 36.000 rpm y lectura de la A_{254nm} .

El cálculo de la disociación se hizo en la forma especificada en la tabla 13.

FIGURAS

FIGURA 1

Obtención de distintos tipos de ribosomas monómeros 80S

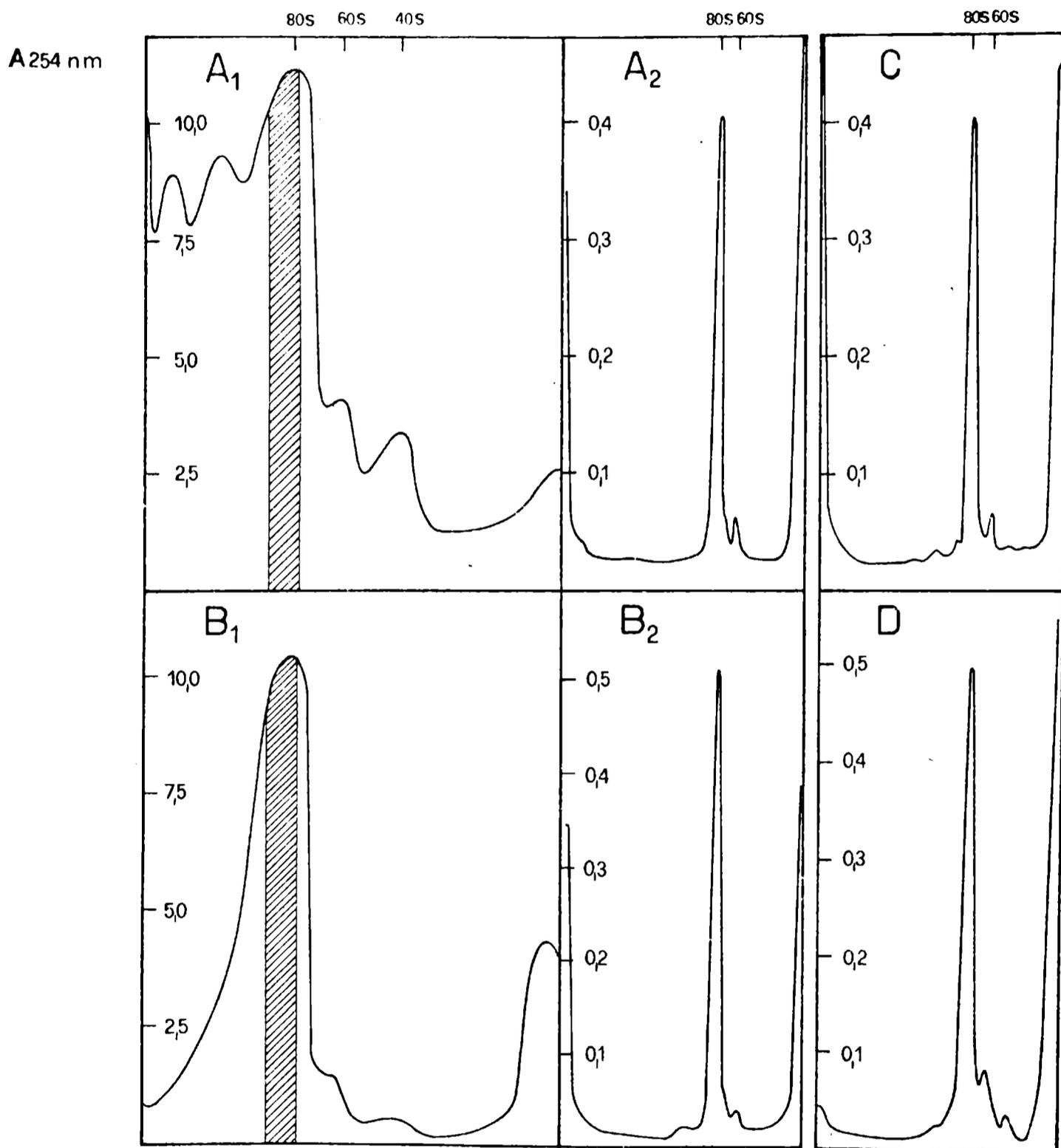


FIGURA 1

OBTENCION DE DISTINTOS TIPOS DE RIBOSOMAS MONOMEROS 80S

Ribosomas 80S nativos. Cuadro A₁: Obtención por fraccionamiento de ribosomas totales. Una muestra de 2,0 ml conteniendo 600 unidades de A_{260nm} de la población ribosómica total, fué fraccionada en un gradiente preparativo (M. 8, M.22.2 y M.22.3). Se aislaron las fracciones correspondientes a 80S (zona sombreada).

Cuadro A₂: Análisis de la fracción ribosómica aislada del gradiente preparativo. Se analizó una muestra de 0,1 ml con 0,5 unidades a A_{260nm}, por centrifugación durante 175 minutos a 40.000 rpm a 2°, en gradiente de sacarosa 15-50% (M.22.1; M.22.3)

Ribosomas 80S agotados. 80Sag-B. Cuadro B₁: Obtención por fraccionamiento de polisomas purificados agotados. Se fraccionó en un gradiente preparativo una muestra de 3,0 ml que contenía 170 unidades de A_{260nm} de ribosomas agotados a partir de polisomas purificados, y se aisló la zona sombreada, que corresponde a la fracción 80S.

Cuadro B₂: Análisis de la fracción ribosómica aislada del gradiente preparativo. Se analizó una muestra de 0,1 ml conteniendo 0,5 unidades de A_{260nm} en iguales condiciones que en A₂.

Ribosomas 80S-F. Cuadro C : Análisis de la fracción ribosómica obtenida por incubación de células enteras con NaF, según se detalla en M.11. La muestra de 0,1 ml contenía 0,5 unidades de A_{260nm}.

Ribosomas 80S-R. Cuadro D : Análisis de los ribosomas 80S reasociados obtenidos según el método detallado en M.12. Se analizó una muestra de 0,1ml, conteniendo 0,5 unidades de A_{260nm} en iguales condiciones que en A₂.

Abcisas: posición relativa en el gradiente (dirección de sedimentación de derecha a izquierda)

Ordenadas: absorbancia a 254nm.

FIGURA 2

Fraccionamiento de los ribosomas livianos-³²P
y análisis de las distintas fracciones.

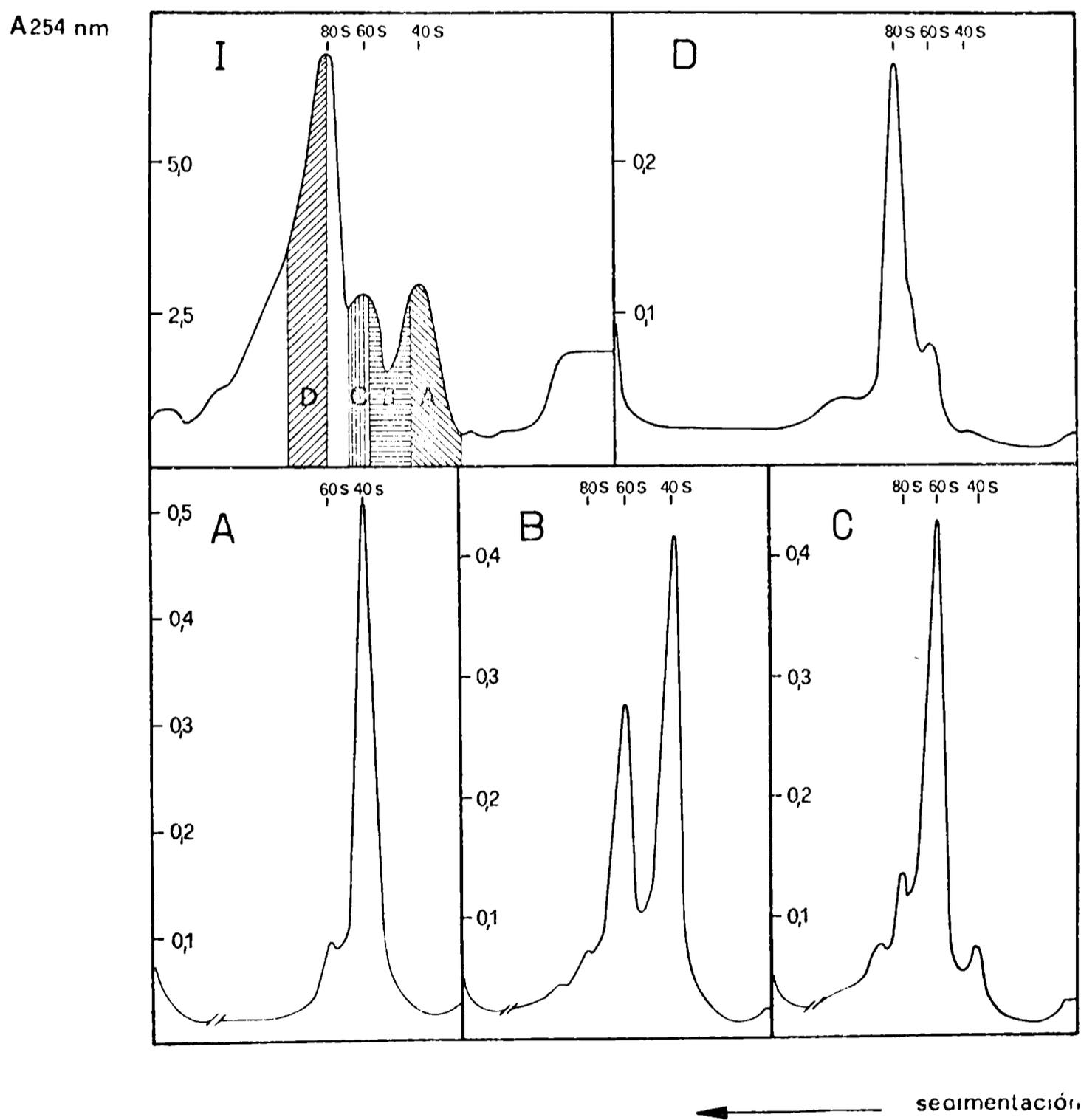


FIGURA 2

Fraccionamiento de los ribosomas livianos-³²P

y análisis de las distintas fracciones

Cuadro I. Fraccionamiento de Pbl-³²P : La preparación de ribosomas livianos-³²P (125 unidades de A_{260nm}), en 1,0 ml de solución E₂ (M.9), se depositó sobre un gradiente preparativo de sacarosa 15-45% y se centrifugó 10 horas a 25.000 rpm. El gradiente se analizó espectrofotométricamente a 254nm y se fraccionó en frío, recibiendo las zonas A, B, C y D, que corresponden respectivamente a las fracciones 40S, 40S+60S, 60S y 80S.

Cuadros A, B, C, D. Análisis de las fracciones ribosómicas-³²P aisladas: Las fracciones-³²P A (40S), B (40S+60S), C (60S) y D (80S) del cuadro I, sedimentadas y redisolueltas (M.9), fueron analizadas (0,3 a 0,5 unidades de A_{260nm} en 0,1 ml de solución E₁) por centrifugación en gradientes de sacarosa 15-50%, durante 150 minutos a 40.000 rpm.

FIGURA 3

Utilización de ribosomas 80S para la reformación de polisomas en reticulocitos enteros que se recuperan de la inhibición de la síntesis proteica por fluoruro de sodio.

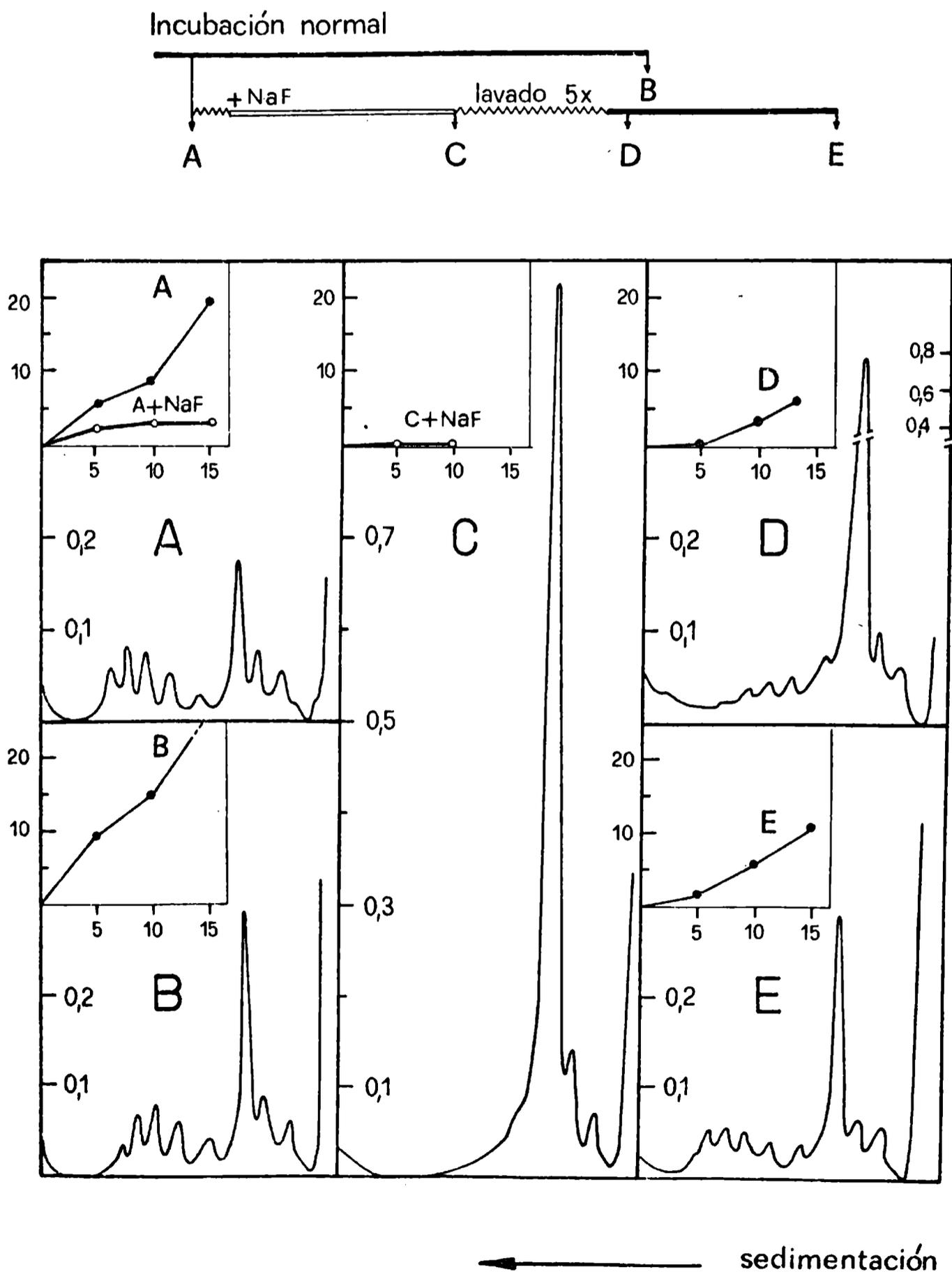


FIGURA 3

Utilización de ribosomas 80S para la reformatión de polisomas en reticulocitos enteros que se recuperan de la inhibición de la síntesis proteica por fluoruro de sodio.

Cuadro A: Control. Los reticulocitos fueron preincubados en el medio para células enteras (M.16), durante 10 minutos a 37°. Cuadro B: Se continuó la incubación A durante 110 minutos más. Cuadro C: los reticulocitos aislados de la preincubación A se lavaron e incubaron en medio para células enteras, fresco, en presencia de NaF 10mM durante 60 minutos. Cuadro D. Reticulocitos aislados de la incubación C, se lavaron 5 veces con solución B₁ para eliminar el ión fluoruro y se reincubaron en medio para células enteras, fresco, sin NaF, durante 5 minutos. Cuadro E: Como D, reincubados sin NaF, pero durante 60 minutos.

I) Actividad de síntesis de proteínas. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada mezcla de incubación, se centrifugaron y lavaron (M.5) las células (0,25ml) y se reincubaron a 37° en medio para células enteras fresco, con valina-¹⁴C 0,1mM, 5 Ci/mol, sin agregados (○—○) o en presencia de NaF 10mM (○—○), según se especifica. Se tomaron a los 5, 10 y 15 minutos, muestras correspondientes a 0,010ml de reticulocitos, que fueron procesadas (M.22.1) para medir (en el contador proporcional) la incorporación de valina-¹⁴C a proteínas. Las incorporaciones obtenidas están representadas en los gráficos arriba a la izquierda de cada cuadro. (Abscisas, tiempo de incubación, en minutos; ordenadas, incorporación de valina¹⁴C en proteínas, nanomoles/ml células).

II) Análisis de las poblaciones ribosómicas: Las células contenidas en 0,5 ml de mezcla de incubación fueron lavadas con solución B₁ y se preparó un lisado 1:4 (M.6.4), en presencia de cicloheximida 0,1mM. Alícuotas de cada lisado, conteniendo 20 unidades de A_{415nm} en 1 ml de solución E₁, fueron analizadas en gradientes de sacarosa 15-50% en solución E₁, por centrifugación a 40.000 rpm. Los perfiles correspondientes se muestran en los cuadros A a E (Abscisas, posición relativa en el gradiente - dirección de sedimentación de derecha a izquierda; ordenadas, absorbancia a 254nm.

(*) durante 150 minutos.

FIGURA 4

Unión de las partículas subribosómicas 40S y 60S-³²P
a polisomas, en el sistema acelular completo con
componentes solubles definidos

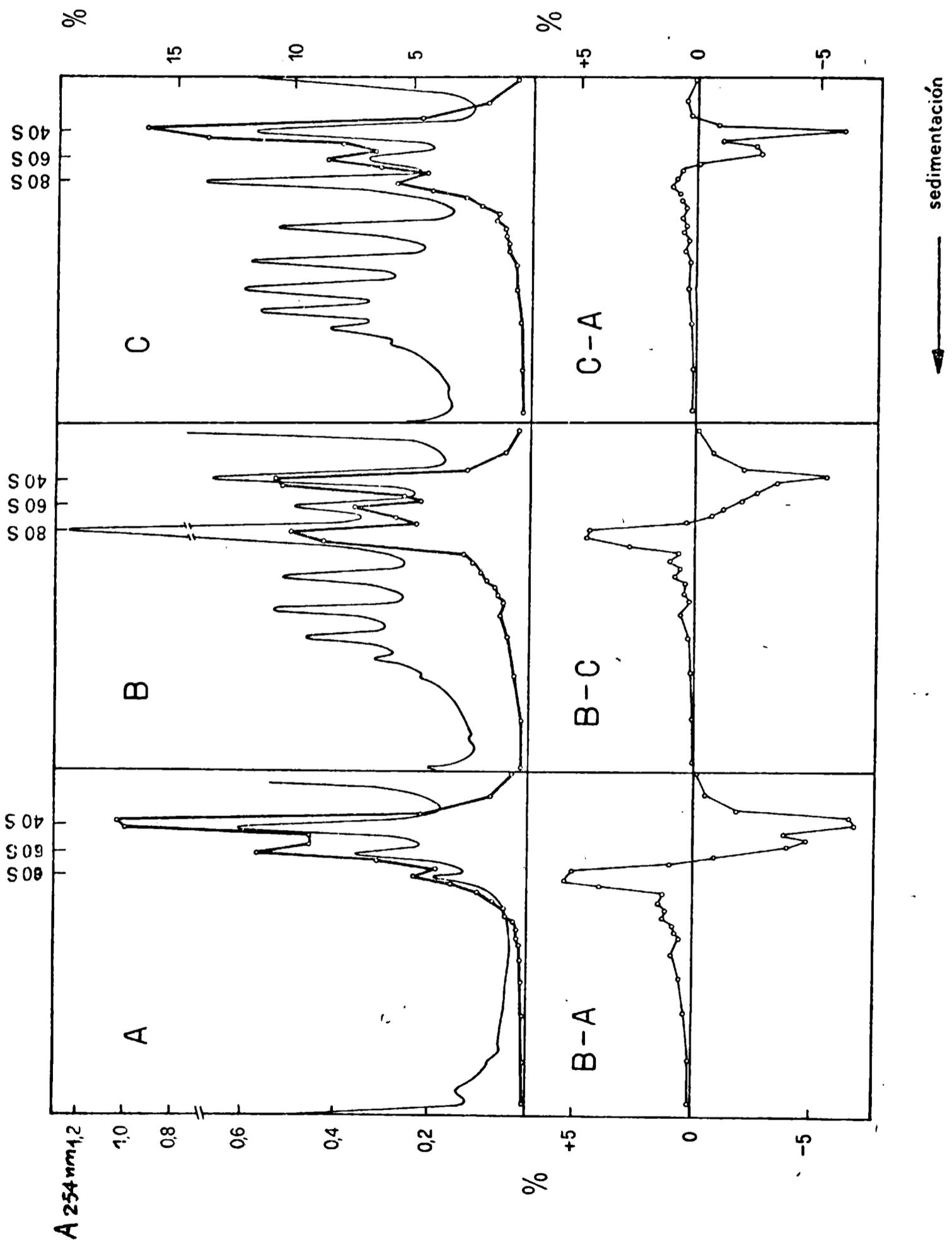


FIGURA 4

Unión de las partículas subribosómicas 40S y 60S-³²P
a polisomas, en el sistema acelular completo con
componentes solubles definidos

0,055 mg (6.000 cpm) de partículas 40S+60S-³²P, purificadas, se incubaron durante 15 minutos a 30° en una mezcla (volumen final 0,125ml) conteniendo: Mg(CH₃COO)₂ 2,5mM, KCl 70mM, Tris.HCl (pH 7,5) 26mM, 2-mercaptoetanol 16mM, tRNA 0,072 mg/ml, fracción enzimática SA40-70, 3 mg/ml y mezcla equimolar de 20 aminoácidos 0,04mM c/u. (A) en presencia de energía (ATP.1mg 1mM, GTP.1mg 0,14mM, creatina fosfato 7,2mM y creatina quinasa 0,04 mg/ml). (E) en presencia de 0,26mg de polisomas purificados no marcados (M.8), y de energía. (C) en presencia de 0,26 mg de polisomas purificados no marcados, pero sin energía. Luego de la incubación se enfriaron las muestras y se depositaron 0,115ml sobre gradientes lineales de sacarosa 15-50% en solución E₁, que se centrifugaron en el rotor SW41-Ti durante 135 minutos a 40.000 rpm, a 2°

Cada gradiente fué analizado espectrofotométricamente a 254nm y se recogieron 25 fracciones de tamaños programados, que se recibieron sobre sendos 3 ml de solución E₁ fría. Las muestras se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa, en frío, lavándolas luego con solución E₁; la radioactividad de ³²P de los ribosomas adsorbidos en las membranas se determinó en un contador de flujo gaseoso.

Recuperación de la radioactividad en el gradiente 1: 65,7%; en el gradiente 2: 83,4%; en el gradiente 3: 82,5%.

(———) A 254nm ; (◯ ——— ◯) Radioactividad de ³²P de las fracciones ribosómicas, expresada como porcentaje del total de cpm en los gradientes.

Gráficos diferenciales: (B-A; C-A y C-B), en base a las diferencias del porcentaje de radioactividad de ³²P de las distintas fracciones homólogas, en los respectivos pares de gradientes (expresada siempre como porcentaje del total de cpm de ³²P)

FIGURA 5

Unión de ribosomas 80S-³²P nativos a polisomas

Efecto del extracto ribosómico

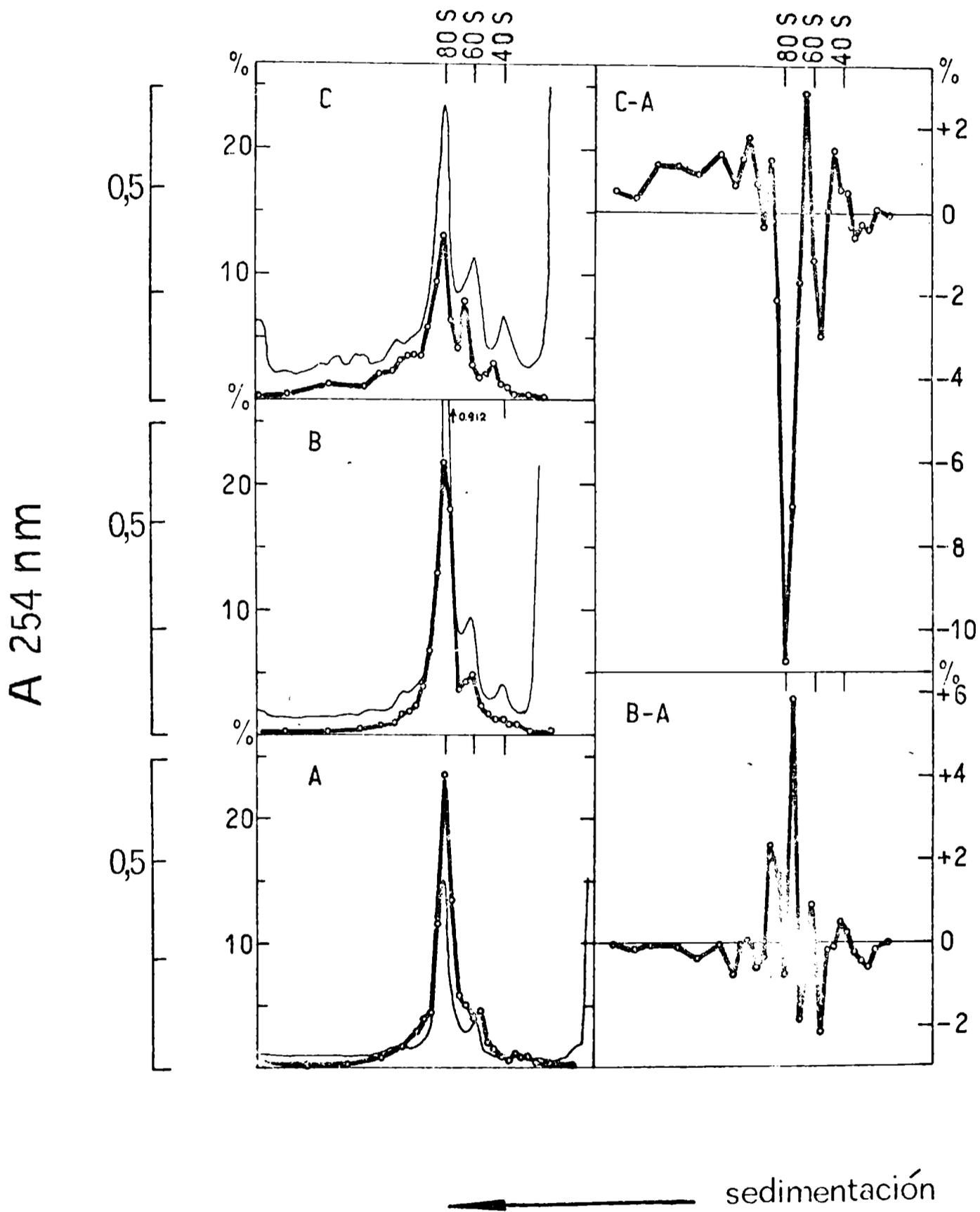


FIGURA 5

Unión de ribosomas 80S-³²P nativos a polisomas

Efecto del extracto ribosómico

0,063 mg de ribosomas 80S-³²P nativos (1296 cpm) purificados (M.9), se incubaron durante 10 minutos a 25°, en un volumen final de 0,0625 ml en : (A) medio salino acelular (Solución J), solos (Control); (B) en medio salino acelular, en presencia de 0,040ml de lisado 1:1 enriquecido en polisomas (M.6.3), energía (ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM) y hcmna 0,025mM; (C) como en (B), con el agregado de 0,004 ml de ER=1 (M.15). Relación ER:Rb 80S-³²P = 3,4 (M.15,3)

Luego de la incubación se enfriaron las mezclas, se agregó igual volumen de solución E₁ y se depositaron sobre gradientes lineales de sacarosa 15-50% en solución E₁. Después de centrifugar durante 135 minutos a 40.000 rpm se leyó A_{254nm} en el registrador ISCO y se fraccionaron 25 muestras de tamaños programados por gradiente. Las fracciones se recibieron sobre 3 ml de solución E₁ fría y se filtraron por membranas de nitrocelulosa, que fueron lavadas con solución E₁; se determinó la radioactividad retenida en las membranas en un contador de flujo gaseoso (M.24).

(———) A_{254nm} ; (———) Radioactividad ³²P de las fracciones, expresada como % del total de cpm en los gradientes.

Gráficos diferenciales (B-A) y (C-A) : muestran los cambios de distribución de la radioactividad de ³²P con respecto al control.

Recuperación de la radioactividad colocada en cada gradiente: (A) 46,6%; (B) 90% y (C) 56,3%.

FIGURA 6

Unión de metionina-³H a partículas subribosómicas 40S, obtenidas por acción del extracto ribosómico sobre ribosomas monómeros 80S

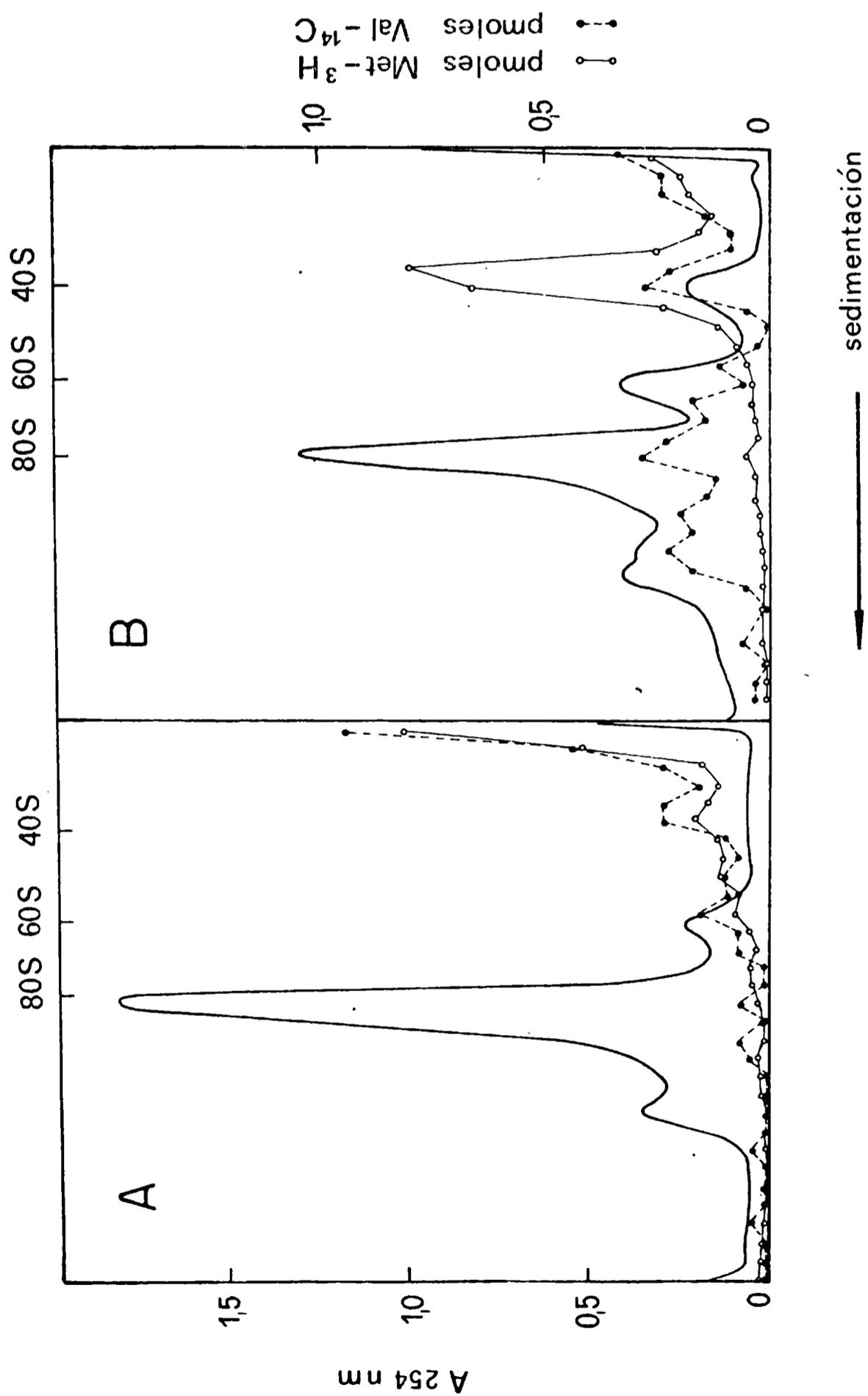


FIGURA 6

Unión de metionina-³H a partículas subribosómicas 40S, obtenidas por acción del extracto ribosómico sobre ribosomas monómeros 80S

Se incubaron durante 10 minutos a 25°, 2,5 unidades de A_{260nm} de ribosomas monómeros agotados (80Sag-B) (M.10.3), en 0,250ml de mezcla de incubación que contenía: $Mg(CH_3COO)_2$ 2mM, KCl 70mM, Tris,HCl (pH 7,5) 36mM, 2-mercaptoetanol 16mM, ATP.Mg 1mM, GTP.Mg 0,2mM, sRNA 12 microgramos/ml, fracción enzimática AS40-70 0,5 mg/ml, mezcla equimolar de L-aminoácidos (sin metionina ni valina) 0,04mM, L-metionina-³H (2000 Ci/mol) 0,025mM y L-valina-¹⁴C (50 Ci/mol) 0,025mM: (A) sin agregados; (B) en presencia de 0,029ml de ER-.5 (M.15) en relación ER:Rb = 6 y de NaF 20mM.

Las mezclas enfriadas se diluyeron con 0,75ml de solución E_3 , se depositaron sobre gradientes de sacarosa 15-50% en solución E_3 , y se analizaron por centrifugación durante 14 horas a 26.500 rpm, en el rotor SW41-Ti. Las muestras (de 12 segundos cada una) se recogieron y procesaron en la forma descrita en Métodos (M.23.2) para la determinación simultánea de la incorporación de aminoácidos radioactivos -³H y -¹⁴C a proteínas más aminoacil-tRNA unido a ribosomas.

La incorporación de metionina-³H y valina-¹⁴C fué de 2,8 y 7,8 pmoles respectivamente en (A) y 4 y 10 picomoles en (B).

(———) A_{254nm} ; (○—○) Radioactividad de metionina-³H, en muestras precipitadas con ácido tricloroacético en frío; (○—○) Radioactividad de valina-¹⁴C en las mismas muestras.

FIGURA 7

Curso de la incorporación de valina-¹⁴C a proteínas en el sistema acelular con componentes solubles definidos y ribosomas totales agotados.
Estimulación por la presencia del extracto ribosómico crudo

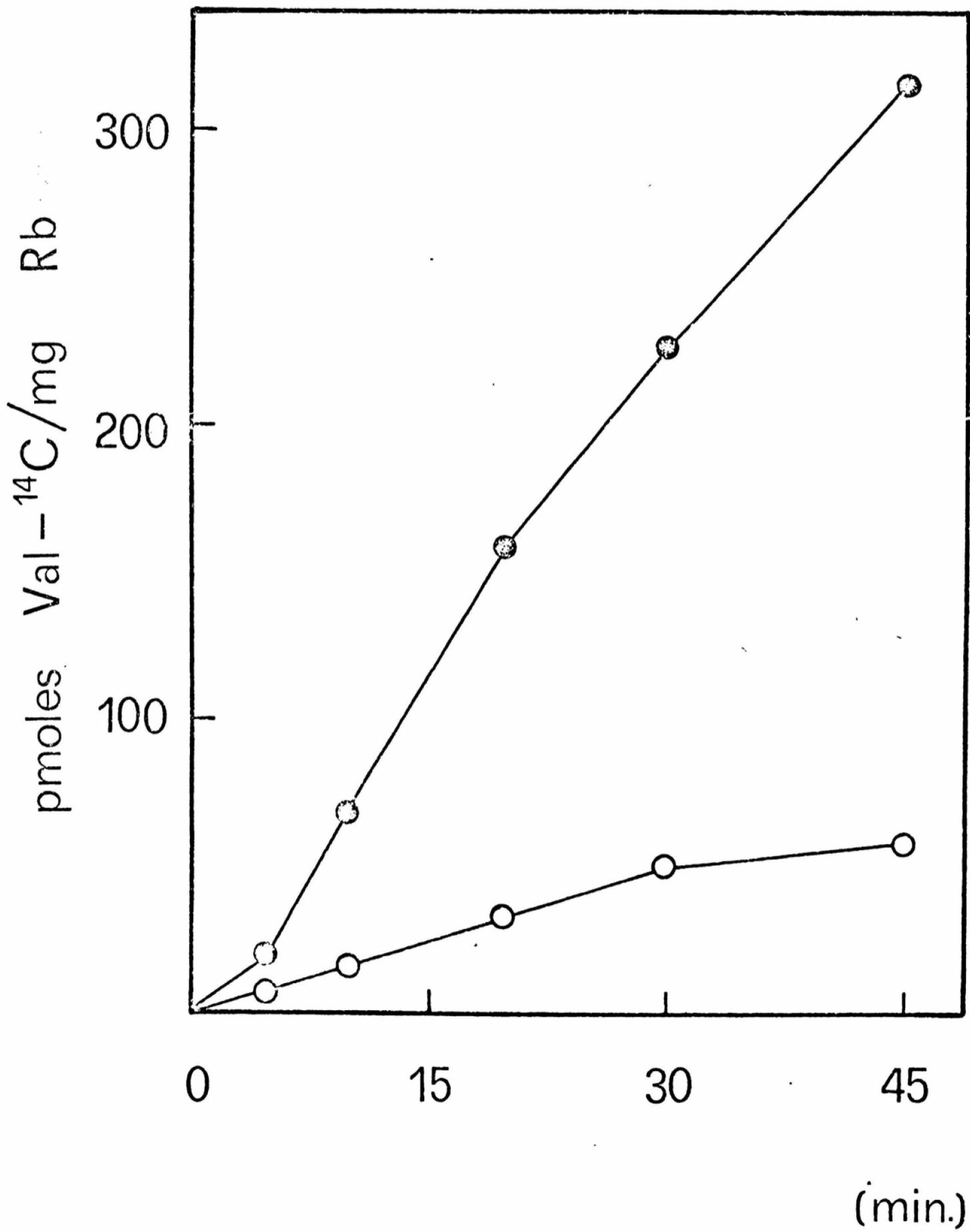


FIGURA 7

Curso de la incorporación de valina-¹⁴C a proteínas en el sistema acelular con componentes solubles definidos y ribosomas totales agotados.
Estimulación por la presencia del extracto ribosómico crudo

1,0 mg de ribosomas totales agotados (RbT-ag) (M.10.1), fueron incubados a 37° en 1 ml de sistema acelular completo con componentes solubles definidos (M.19), con valina-¹⁴C (40 Ci/mol) 0,05mM, (○) sin agregados, o (◐) en presencia del ER-1 crudo (M.15) (en relación ER:Rb = 2,7): en este último caso, se omitía en la mezcla de sales, KCl en cantidad equivalente a la que contribuía el extracto ribosómico.

Se extrajeron a distintos tiempos alícuotas de 0,125ml, que se procesaron para determinar la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas (M.23.1)

Abcisas: tiempos de incubación, en minutos.

Ordenadas: incorporación de valina-¹⁴C en proteínas, picomoles/ mg de ribosomas.

FIGURA 8

Respuesta de diferentes tipos de preparaciones de ribosomas
a la estimulación por el extracto ribosómico crudo de la
incorporación de valina-¹⁴C en proteínas

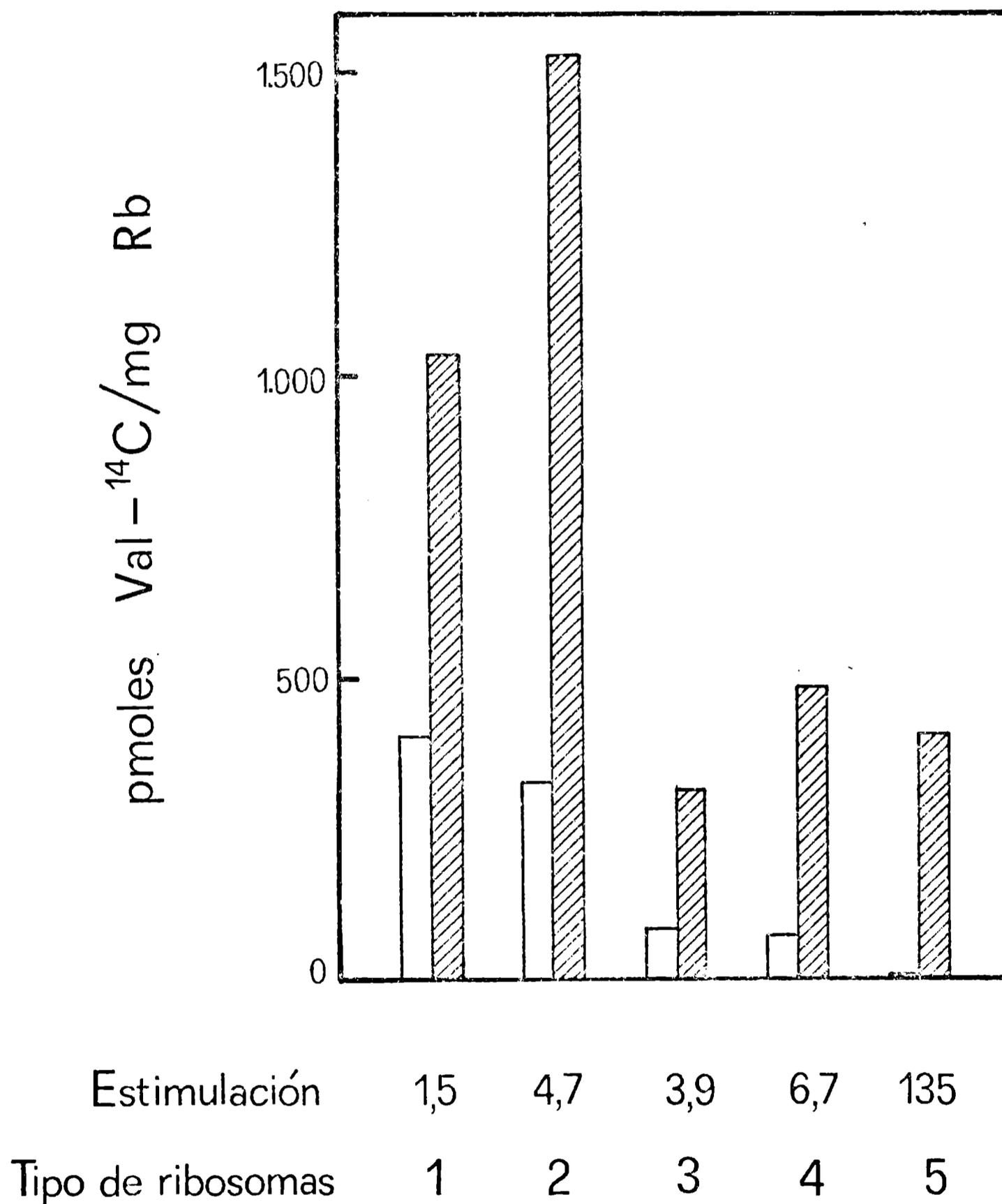


FIGURA 8

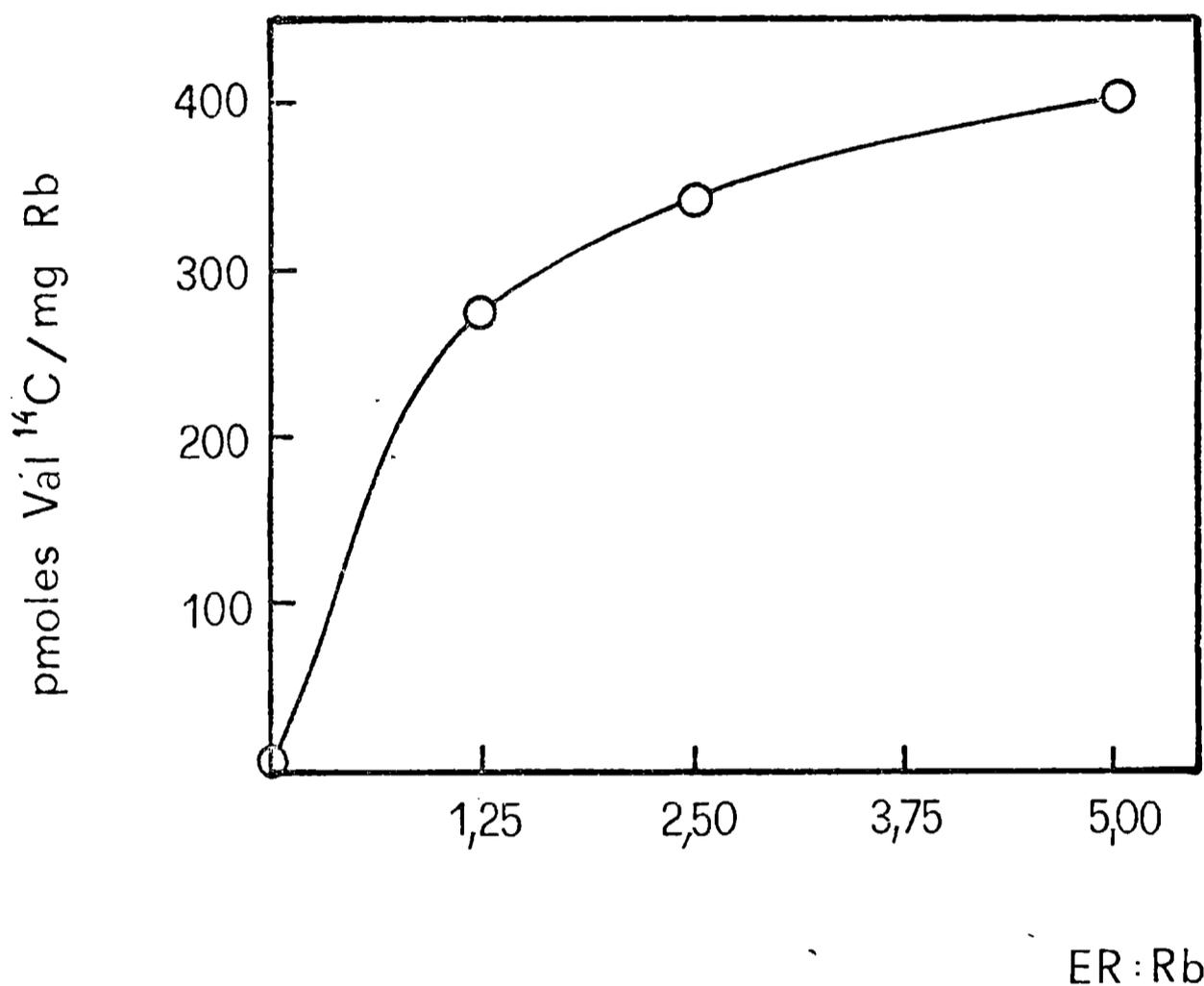
Respuesta de diferentes tipos de preparaciones de ribosomas
a la estimulación por el extracto ribosómico crudo de la
incorporación de valina-¹⁴C en proteínas

Se hicieron incubaciones en un sistema acelular con componentes solubles definidos, en un volumen de 0,250ml, durante 60 minutos a 37°, con valina-¹⁴C, 10 Ci/mol en ausencia (□) o en presencia (▨) de ER-1 crudo (0,0175ml). Las distintas preparaciones ribosómicas se agregaron en concentración final de 1 mg/ml. Las mezclas de incubación se procesaron según la técnica para determinar la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas, en el contador proporcional (M.23.1). La estimulación se computa como la relación entre las incorporaciones con y sin extracto ribosómico.

- 1.- Ribosomas totales-1. RbT-1: Se obtuvieron a partir de un lisado 1:1 en sales, por centrifugación durante 90 minutos a 50.000 rpm (M.7.1)
- 2.- Polisomas purificados: fueron obtenidos por aislamiento en gradientes preparativos de sacarosa 15-45% (M.8); se resedimentaron 10 minutos a 50.000 rpm para disminuir la cantidad de 80S presentes.
- 3.- Ribosomas totales agotados. RbT-ag: Se obtuvieron a partir de los ribosomas totales (RbT-1), que fueron preincubados 90 minutos a 37° en un sistema acelular completo y sedimentados 120 minutos a 50.000 rpm (M.10.1).
- 4.- Ribosomas 80S agotados A. 80Sag-A: Fueron obtenidos a partir de los RbT-ag (3) por fraccionamiento en un gradiente preparativo (M.10.2).
- 5.- Ribosomas 80S agotados B. 80Sag-B: Se obtuvieron a partir de los polisomas purificados (2) por incubación durante 90 minutos a 37° en un sistema acelular con componentes definidos y posterior aislamiento de los ribosomas 80S producidos, en un gradiente preparativo (M.10.3)

FIGURA 9

Efecto de cantidades crecientes del extracto ribosómico crudo sobre la capacidad de incorporar valina-¹⁴C en proteínas, en un sistema acelular con ribosomas 80S agotados y componentes solubles definidos

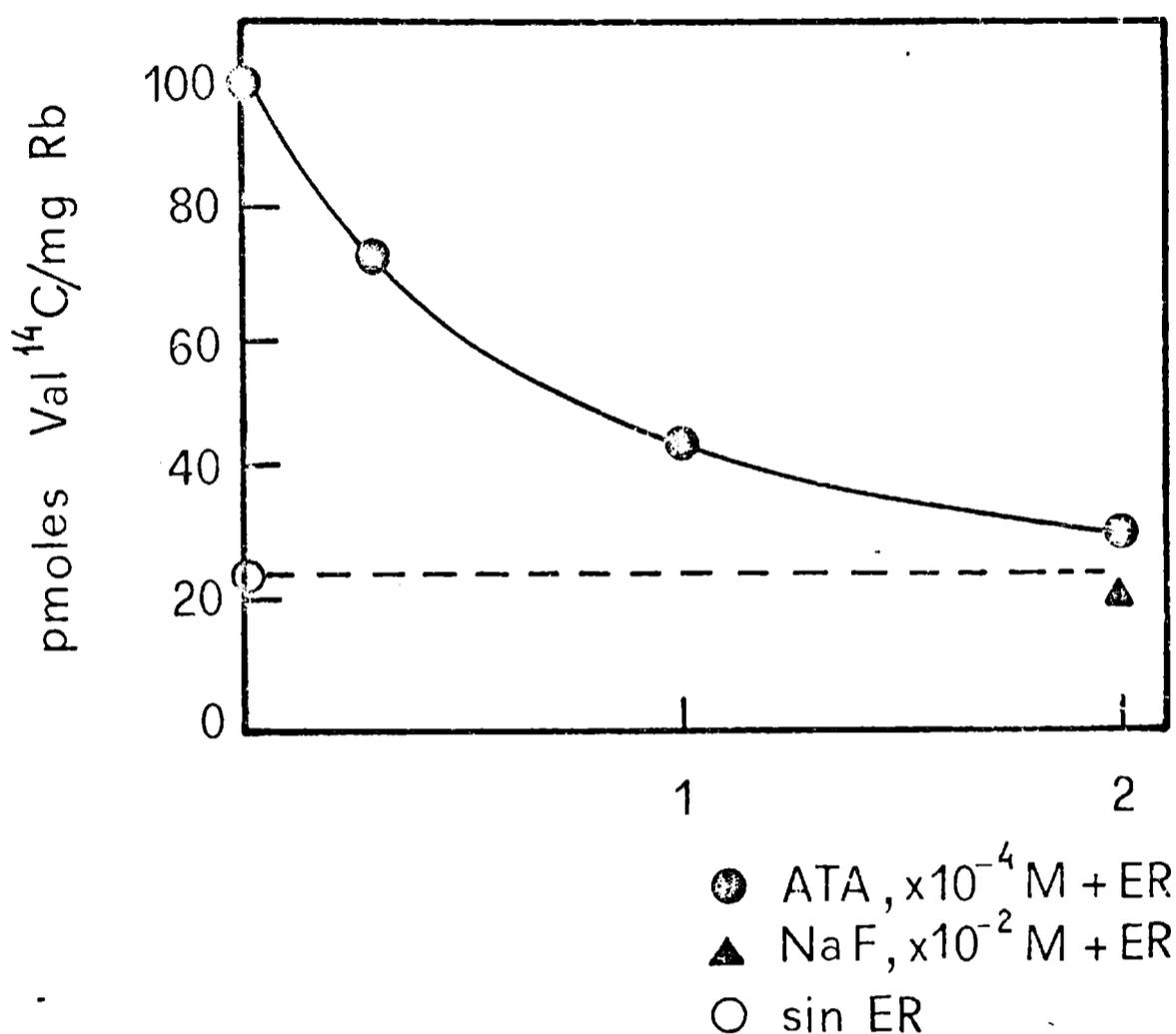


Se incubaron 0,125 ó 0,250 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B, M.10.3), en presencia de distintas cantidades de ER-1 crudo, en el sistema acelular con componentes solubles definidos, con valina-¹⁴C, 10 Ci/mol, en un volumen final de 0,250ml, durante 60 minutos a 37°. Se tomó en cuenta la contribución de KCl en el extracto ribosómico agregado.

Las mezclas de incubación se procesaron según la técnica para determinar la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas, en el contador proporcional. La incorporación de valina-¹⁴C basal (ribosomas 80Sag-B en el sistema completo, sin agregado de ER) fué de 3 pmoles/mg de ribosomas.

FIGURA 10

Efecto de inhibidores específicos de la iniciación sobre la estimulación de la incorporación de valina-¹⁴C en proteínas por ribosomas 80S agotados en presencia del extracto ribosómico crudo

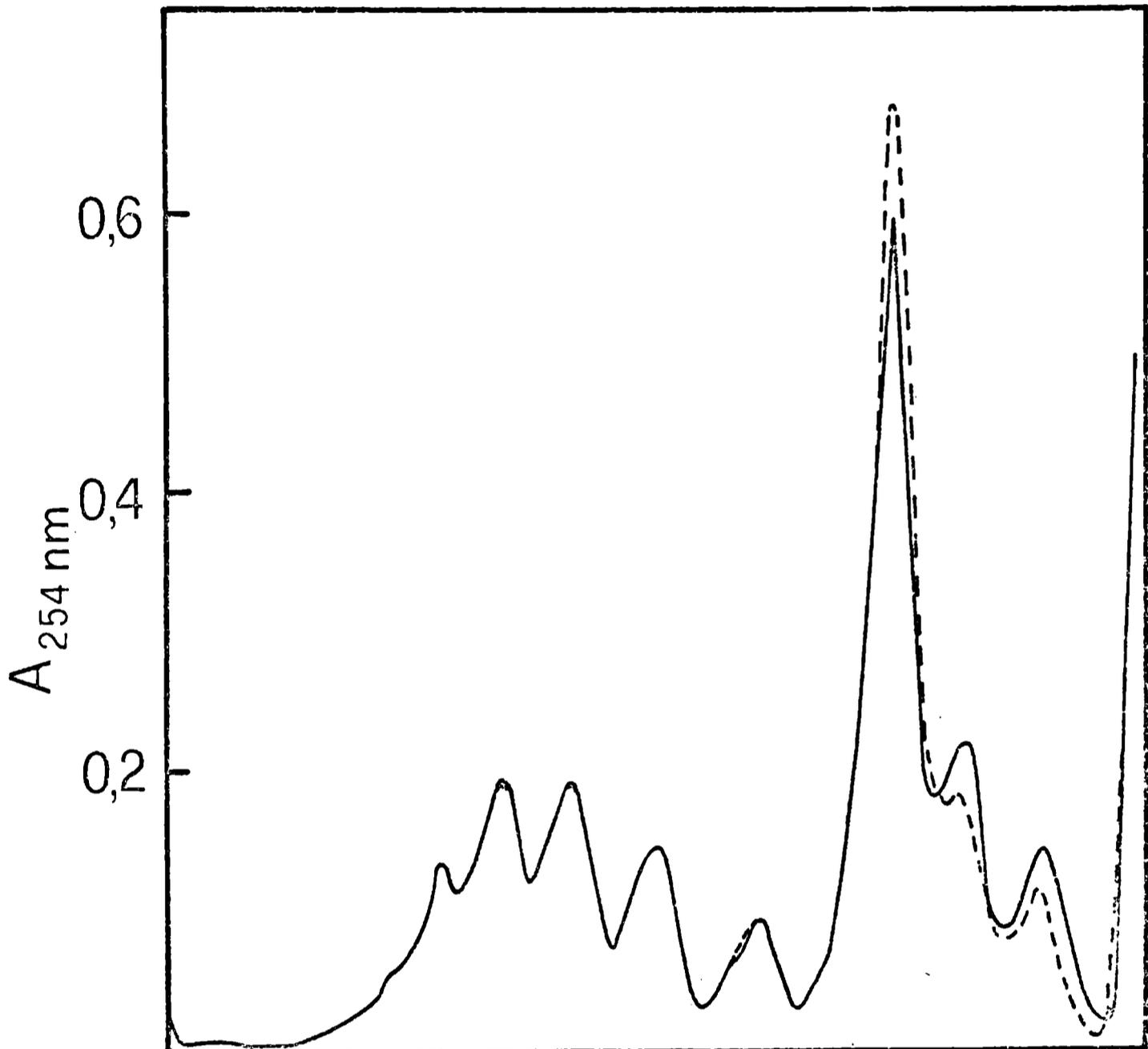


Se incubaron 0,1 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B; M.10.3) en presencia de ER-.5 crudo (extraído de RbT con KCl 0,5M; M.15) y de NaF 20mM (▲), o de las cantidades indicadas de ATA (●), agregados desde tiempo cero, en 0,200ml de un sistema acelular con componentes solubles definidos, con valina-¹⁴C, 50 Ci/mol, durante 60 minutos a 37°. (Relación ER:Rb = 4). Las muestras fueron procesadas para medir la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas (M.23.1).

La incorporación basal (80S sin agregado de extracto ribosómico ni inhibidor) que fué de 24 pmoles valina-¹⁴C/mg de ribosomas, se indica (○).

FIGURA 11

Actividad disociante del extracto ribosómico crudo



————— sedimentación

Se incubó 0,040ml de lisado 1:1 en sales (M.6.2) durante 10 minutos a 25° en un volumen final de 0,0625ml de medio salino acelular (Solución J) con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, en presencia de NaF 10mM y cicloheximida 0,5mM, sólo (---) o con el agregado de extracto ribosómico (—) (0,009ml ER-1).

Se agregó luego (en frío) igual volumen de solución E₁ y se analizaron las muestras en gradientes lineales de sacarosa 15-50% centrifugados durante 150 minutos a 40.000 rpm, por registro de la A_{254nm}.

FIGURA 12

Ensayo de diversas preparaciones de ribosomas 80S
como sustratos para la reacción de disociación

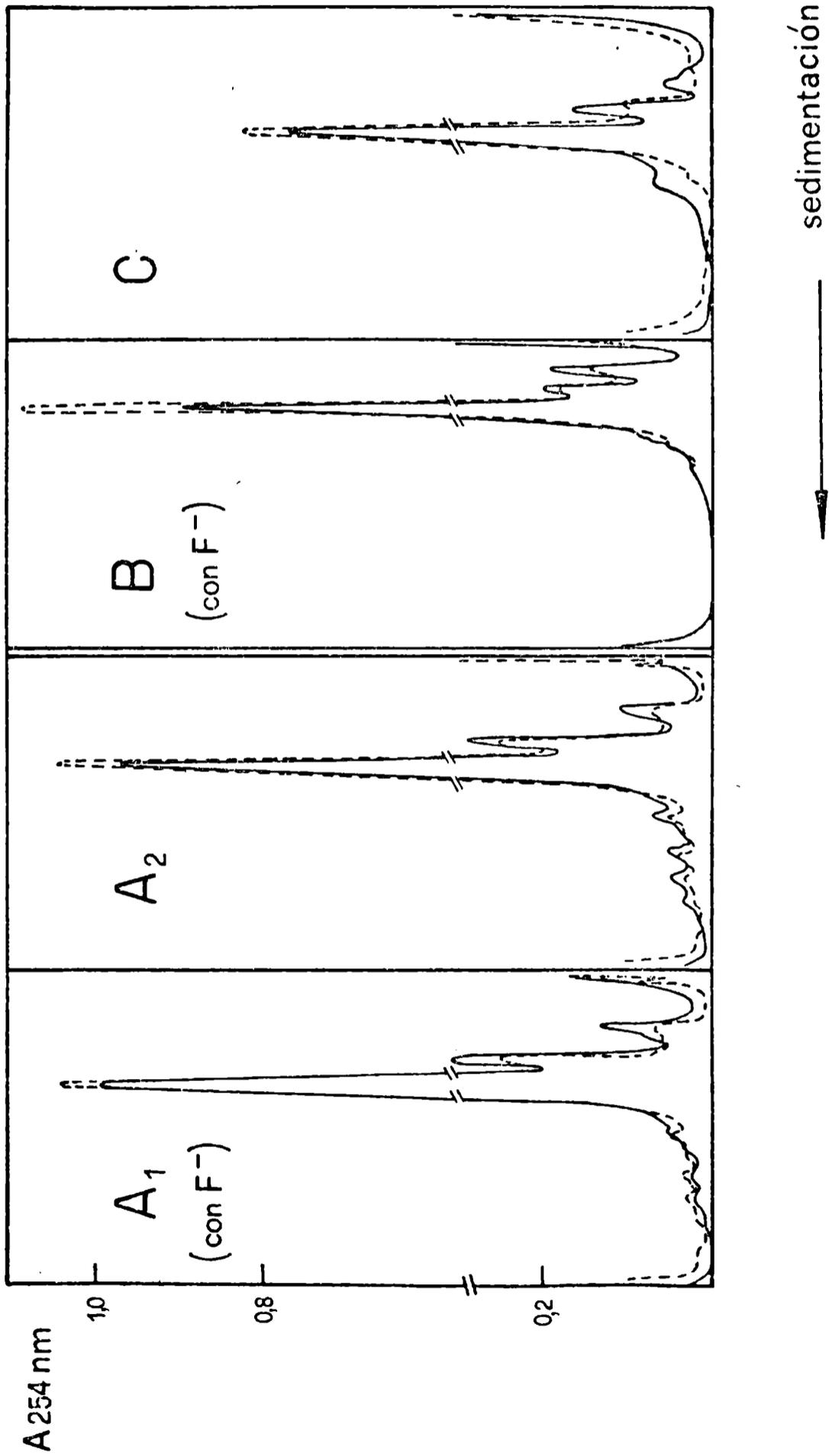


FIGURA 12

Ensayo de diversas preparaciones de ribosomas 80S
como sustratos para la reacción de disociación

Las incubaciones de las preparaciones (en las cantidades indicadas) se realizaron en un volumen final de 0,0625ml de medio salino acelular (Solución J), con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, sin agregados (—) o en presencia de 0,004ml de ER-1 (—) (en este caso se omitía en la mezcla de sales KCl en cantidad equivalente a la que contenía el extracto ribosómico agregado, 1M). Donde se especifica se agregó NaF 10mM.

Las preparaciones utilizadas fueron:

A.- Lisado 1:1, F. (0,040ml) Obtenido por lisis de reticulocitos preincubados con NaF 10 mM en el medio para células enteras (M.16), durante 60 minutos a 37°.

B.- Lisado 1:1 en sales, agotado. (0,040ml) Obtenido por preincubación durante 60 minutos a 37° en el sistema acelular para lisado no fraccionados (M.17).

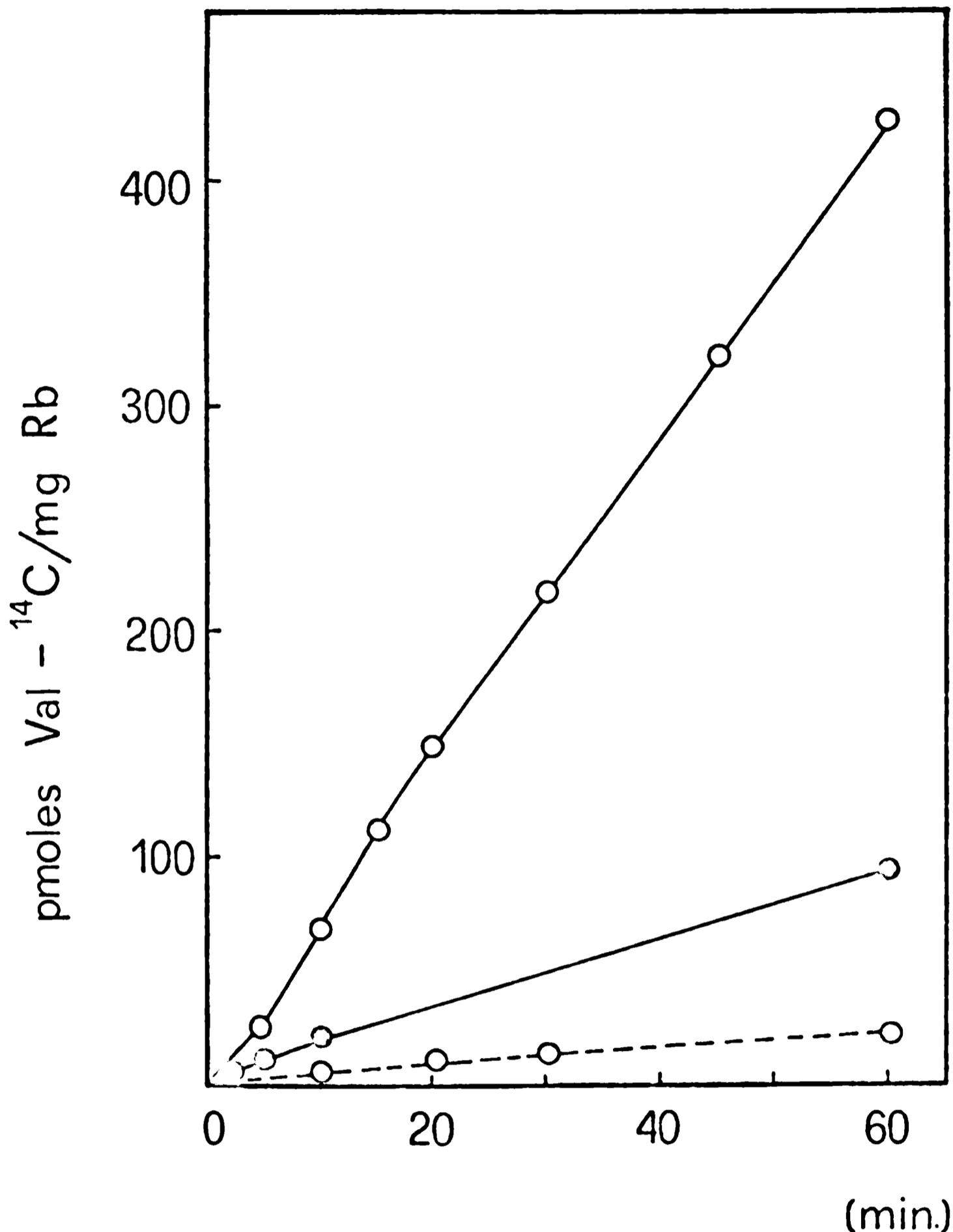
C.- Ribosomas 80S_{ag}-B. (0,010mg) Obtenidos por incubación de polisomas purificados, durante 90 minutos a 37°, en el sistema acelular con componentes solubles definidos y aislamiento en gradiente de densidad preparativo.

Luego de incubar durante 10 minutos a 25°, se agregó, en frío, igual volumen de solución E₁ y se sembró sobre gradientes lineales de sacarosa.

Se centrifugó 165 minutos a 40.000 rpm y se analizó los gradientes de 254nm.

FIGURA 13

Inactivación del extracto ribosómico por efecto de la temperatura. Pérdida de la estimulación de la incorporación de valina-¹⁴C en proteínas



Se incubaron a 37° ribosomas 80S agotados (80Sag-A; concentración final 1,45 mg/ml) en el sistema acelular con componentes solubles definidos, con valina-¹⁴C (5 Ci/mol), 0,05mM, sin agregados (o-o), en presencia de ER-1 fresco (o-o) (ER:Rb=1,8), o en presencia de ER-1 preincubado 8 minutos a 60° (o-o) (ER:Rb=1,7). A distintos tiempos se extrajeron alícuotas de 0,125ml, que se procesaron para determinar la incorporación de aminoácido-¹⁴C a proteínas.

FIGURA 14

Disociación de ribosomas 80S por efecto de los extractos
ribosómicos crudo y desalado en Sephadex-G25

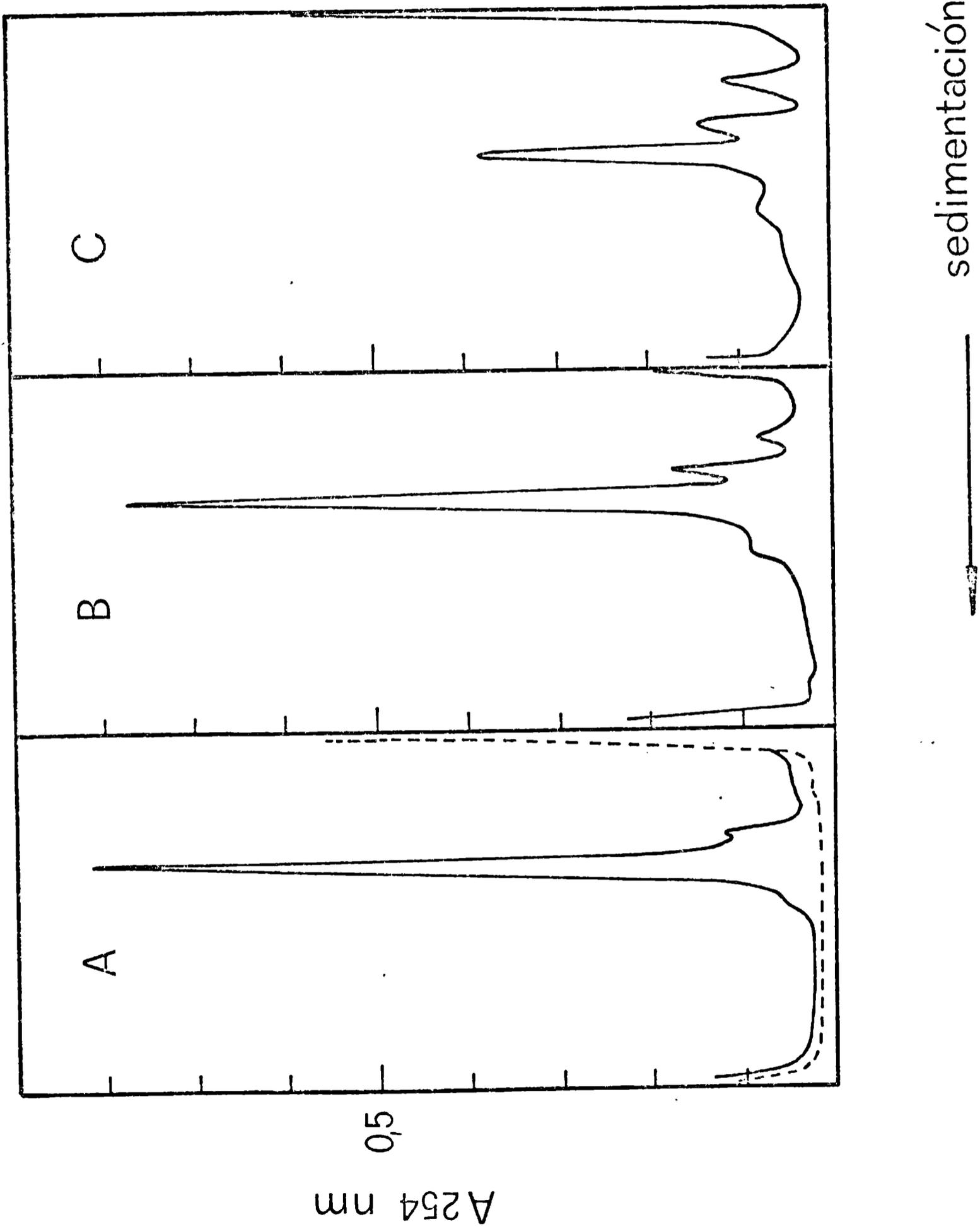


FIGURA 14

Disociación de ribosomas 80S por efecto de los extractos

ribosómicos crudo y desalado en Sephadex-G25

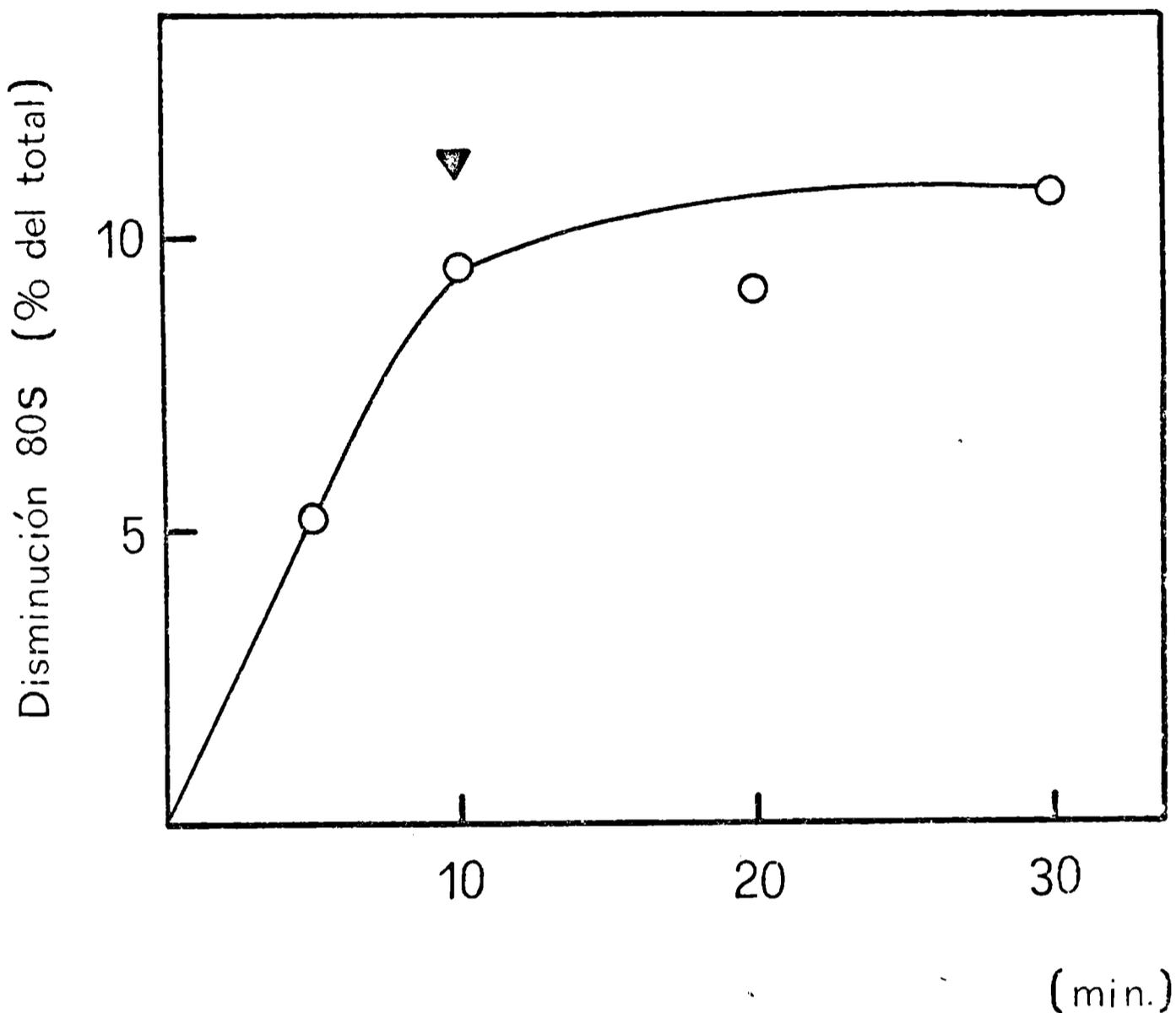
Se incubaron 0,100 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) en 0,0625 ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, durante 10 minutos a 25°, (A) sin agregados; (B) con ER-1 crudo (ER:Rb = 1,7) y (C) con ER-G25 (ER:Rb = 6,5).

Se agregó igual volumen de solución E₁ y se analizaron las muestras por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-50% durante 165 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-T1) y lectura de la A_{254nm}.

En el gráfico A se muestra el perfil del ER-1 crudo, sólo (-----).

FIGURA 15

Curso en el tiempo de la disociación de ribosomas
monómeros por el extracto ribosómico



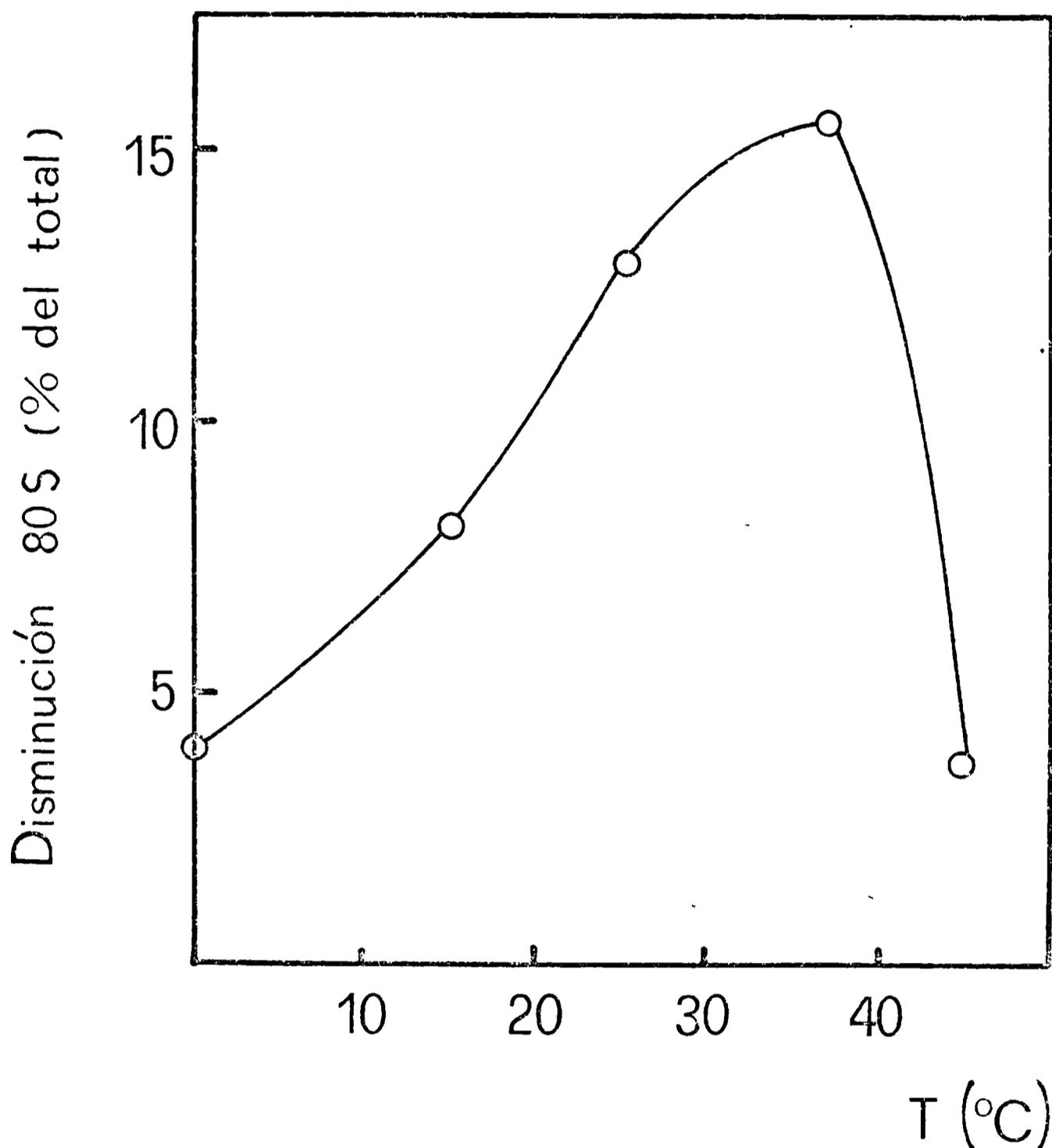
En cada incubación, ya sea a 25° (○), o a 37° (▽), se utilizó 0,100 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en 0,0625ml de medio salino acelular (solución J) con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, en presencia de extracto ribosómico crudo (ER-1; relación ER:Rb = 1,6).

Luego de incubar por los tiempos y temperaturas indicados, se enfrió a 0°, se agregó igual volumen de solución E₁ y se analizaron las mezclas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-50% durante 165 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-Ti).

El porcentaje del pico de 80S en cada análisis se obtuvo por integración gráfica del registro de A_{254nm} . Se representan las disminuciones de cada uno con respecto al control (ribosomas 80S agotados sin agregado del extracto ribosómico, incubado 10 minutos a 25°; no hubo alteración del control por incubación del mismo a 37°).

FIGURA 16

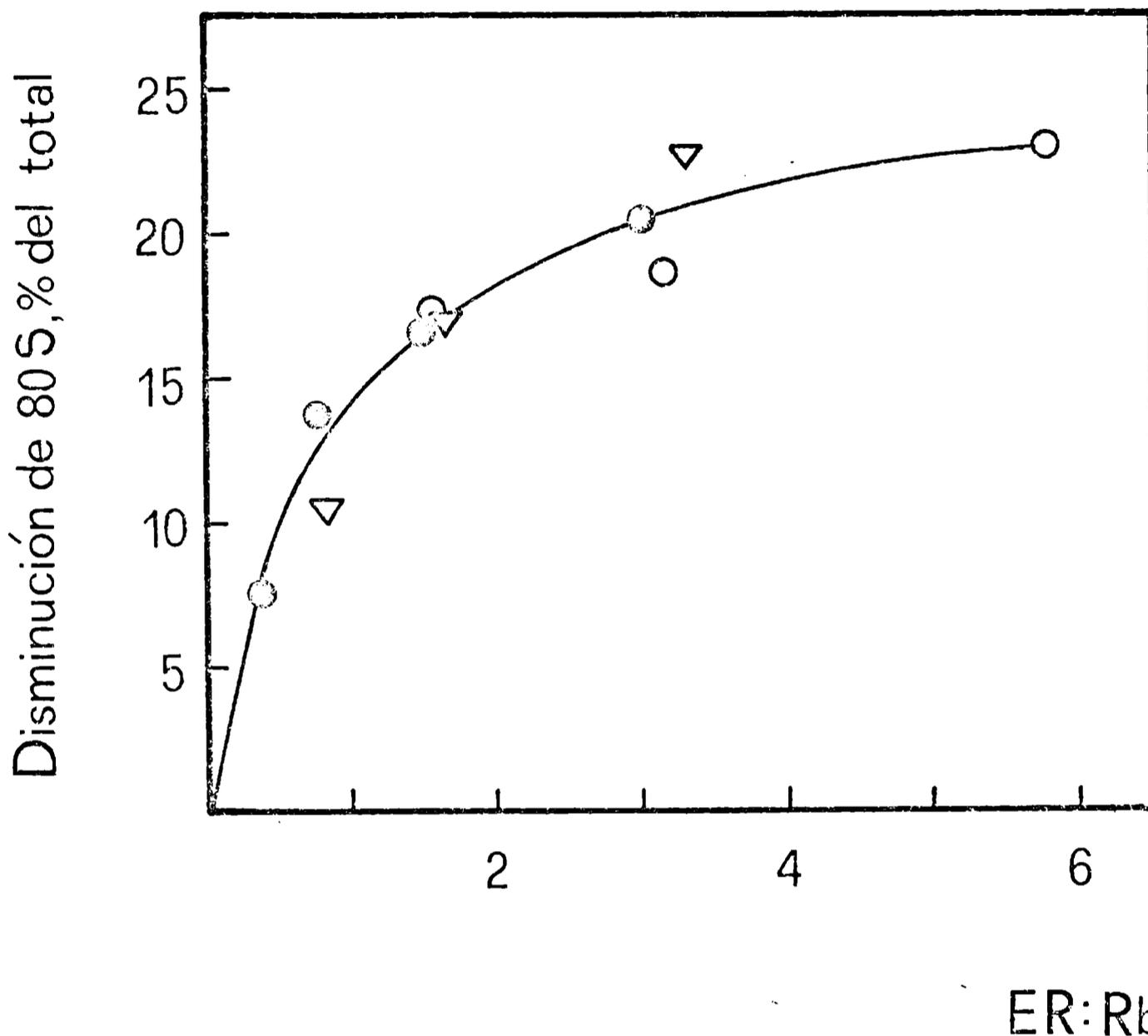
Influencia de la temperatura de incubación en la disociación de ribosomas monómeros por efecto del extracto ribosómico.



Se incubaron 0,150 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) en un volumen total de 0,0937ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM, en presencia de ER-1 crudo, en relación ER:Rb = 1,6. Luego de incubar durante 10 minutos a distintas temperaturas, se agregó 0,065 ml de solución E₁ y se depositaron muestras de 0,110ml de cada mezcla de incubación sobre gradientes de sacarosa 15-50% en solución E₁; se analizaron los mismos por ultracentrifugación durante 165 minutos a 40.000 rpm. Los registros de A_{254nm} fueron evaluados por planimetría. Control: 80Sag sin ER (a 0°).

FIGURA 17

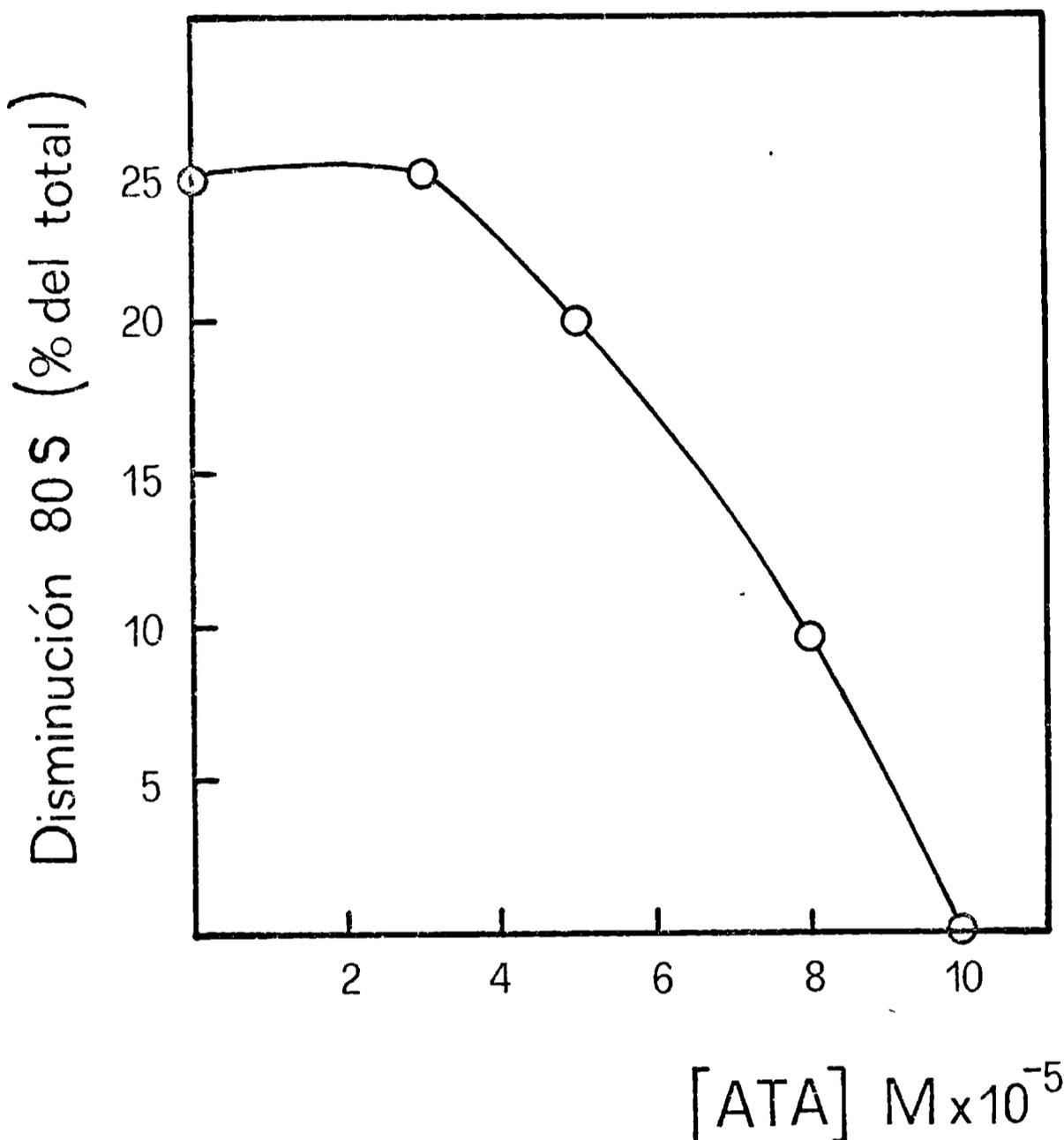
Efecto de cantidades crecientes del extracto ribosómico
en la disociación de ribosomas monómeros



Se incubaron durante 10 minutos a 25°, 0,100mg de ribosomas 80S agotados (80S-ag-B) en 0,0625ml de medio salino acelular (solución J) con ATP.Mg 1mM y GTP.Mg 0,2mM en presencia de cantidades crecientes de ER-1 crudo, fresco (cuyo contenido de KCl se tuvo en cuenta para mantener la concentración final 70mM). Las mezclas se enfriaron, se les agregó igual volumen de solución E₁ y se analizaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-50%, durante 165 minutos a 40.000 rpm (rotor SW41-Ti). De la integración gráfica de los registros de A_{254nm}, se calculó el porcentaje del pico de 80S de cada muestra y la variación del mismo con respecto al control (ribosomas 80S incubados en idénticas condiciones pero sin el agregado de extracto ribosómico). Se graficaron los resultados de tres experimentos, indicados con diferentes símbolos.

FIGURA 18

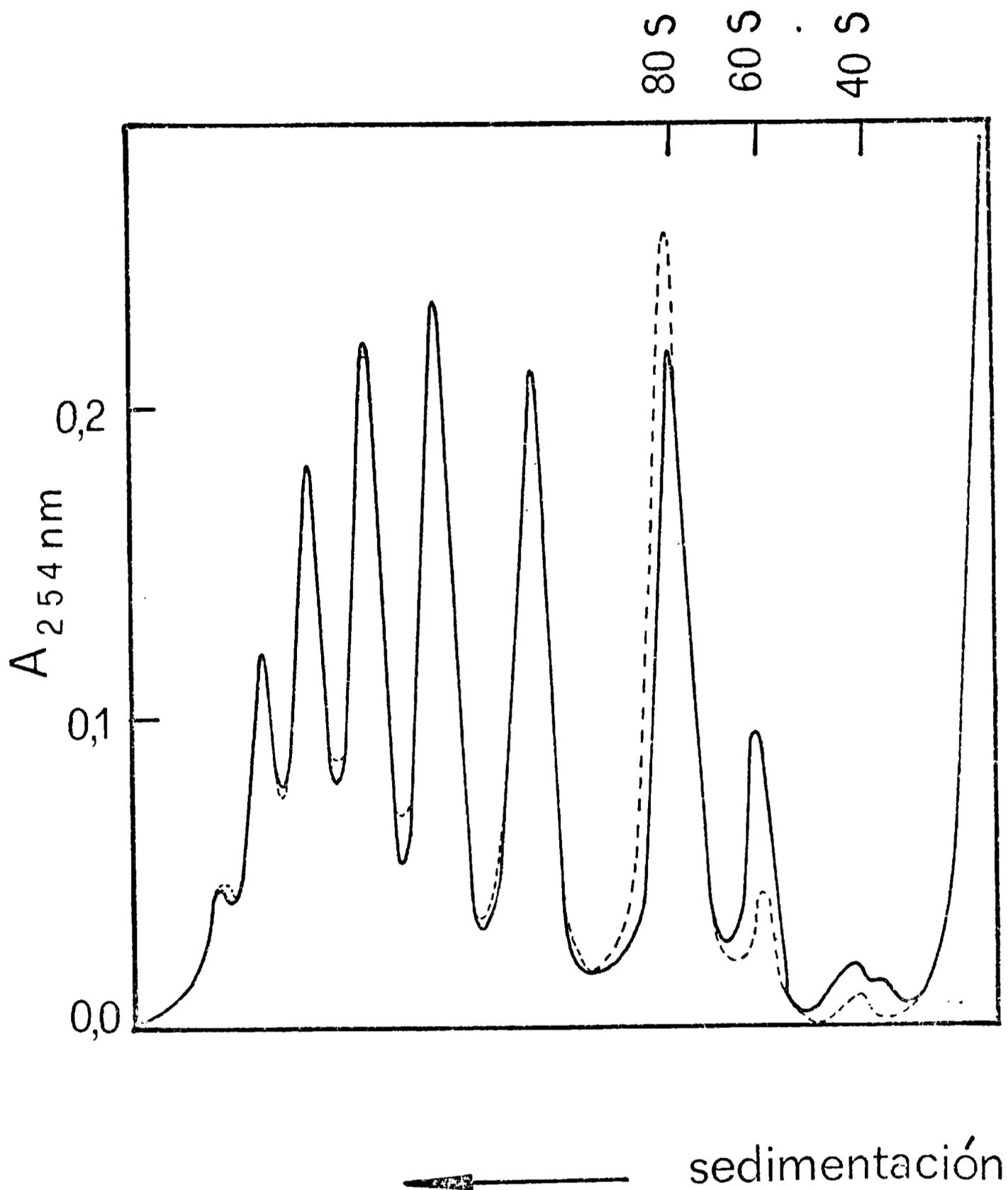
Inhibición del efecto disociante del extracto ribosómico
por el ácido aurintricarboxílico (ATA)



En un volumen total de 0,0937ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM, se incubaron 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B) y ER-.5-G25 (relación ER:Rb=5), durante 10 minutos a 25°, en presencia de cantidades crecientes de ATA. Como controles ^{se realizó}, también en presencia de las cantidades indicadas de ATA, una serie de incubaciones iguales a las anteriores, en las que se utilizó, en igual cantidad (ER:Rb=5), la misma preparación de ER, ahora inactivada previamente por calentamiento a 55° durante 5 minutos. Se agregó 0,070ml de solución E₁ y se depositaron muestras de 0,100ml sobre gradientes de sacarosa 15-50%. Se hizo el análisis por centrifugación durante 215 minutos a 36.000 rpm y por planimetría de los registros gráficos de A_{254nm} se calculó la variación del porcentaje del pico de 80S en o/muestra con respecto al correspondiente control (80Sag + ER calentado a 0/concentración ATA)

FIGURA 19

Ensayo de polisomas como sustratos de la reacción de disociación



Se incubaron 0,130mg de polisomas purificados (resedimentados durante 25 minutos a 50.000 rpm en rotor 50, para disminuir el contenido de monómeros), durante 10 minutos a 25°, en 0.0937ml de medio salino acelular (solución J), con ATP.Mg 1mM (que suple las necesidades de energía), cicloheximida 1mM, esparsomicina 0,1mM, ATA 0,03mM, en presencia de ER-5-G25, preincubado durante 5 minutos a 55° (---) o de ER-5-G25 (—) , ambos en relación ER:Rb = 2. Se agregó 0,070ml de solución E₁ y se depositaron muestras de 0,100ml sobre gradientes de sacarosa 15-50%. Se centrifugó durante 215 minutos a 36.000 rpm y se analizaron las muestras a 254nm.

FIGURA 20

Efecto de la presencia de energía sobre la disociación de ribosomas 80S

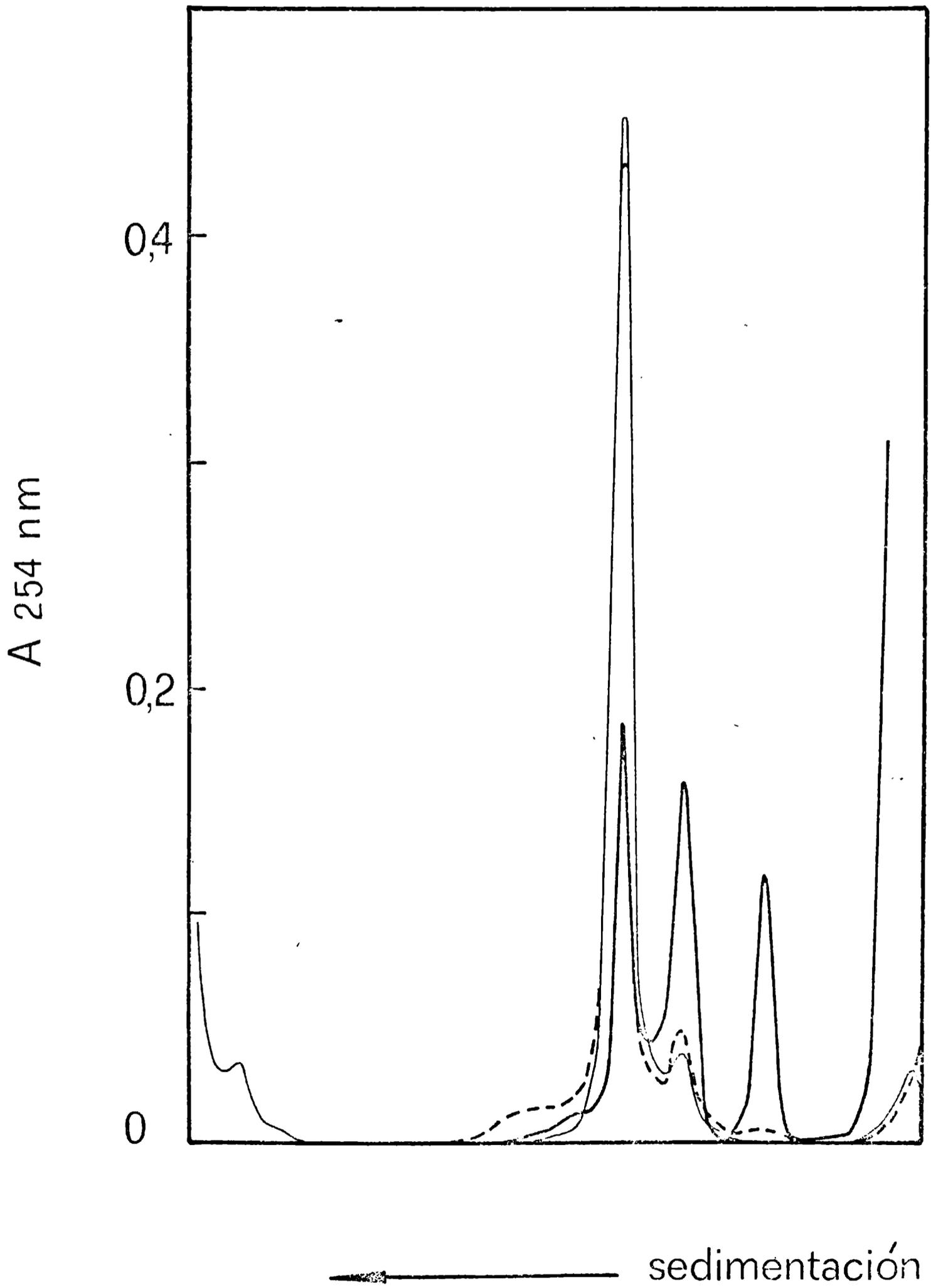


FIGURA 20

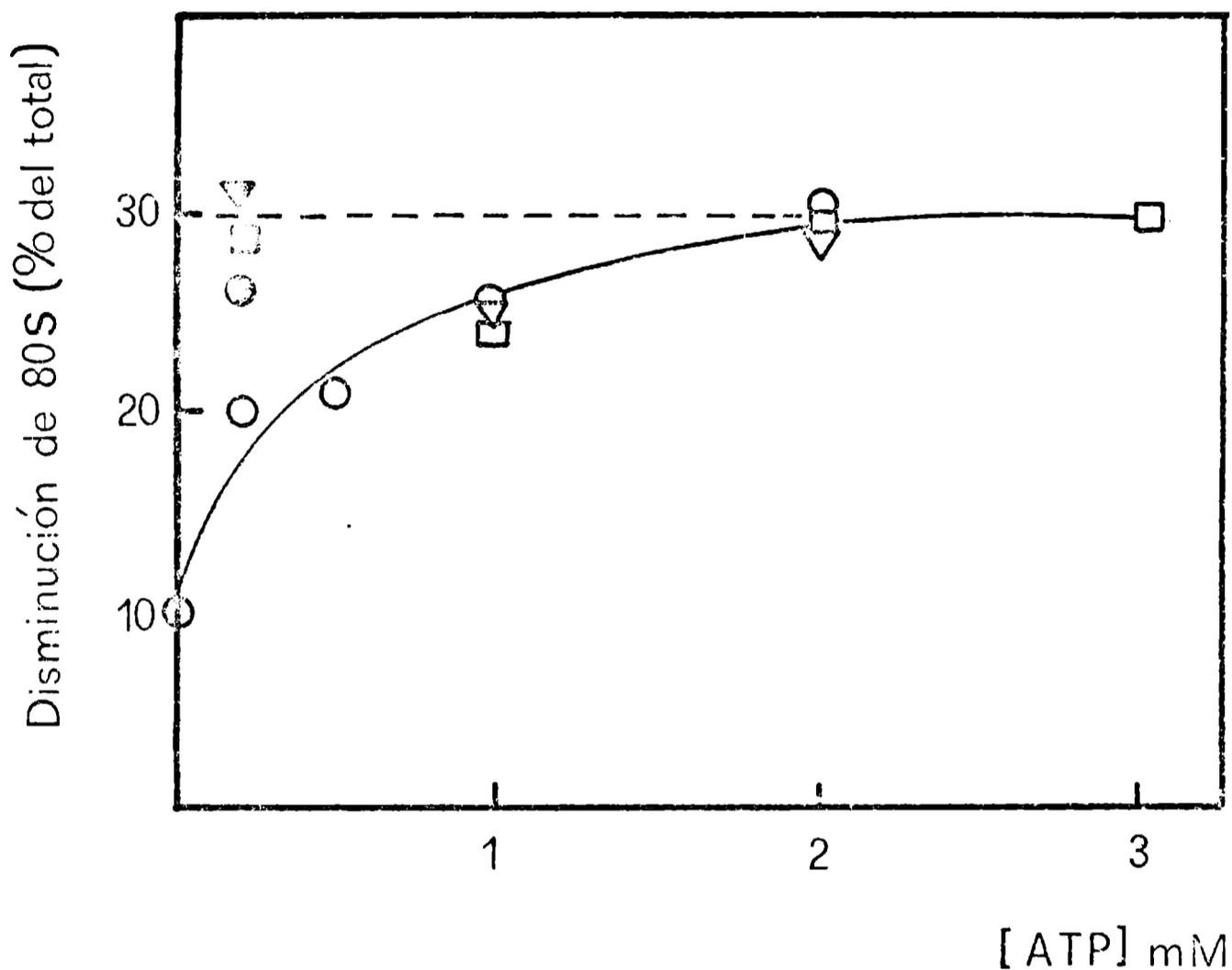
Efecto de la presencia de energía sobre la disociación de ribosomas 80S

Se incubaron 0,070 mg de ribosomas agotados 80S (80Sag-B), durante 10 minutos a 25°, en 0,0937ml de medio salino acelular (solución J), solos (—), o bien en presencia de ER-d (relación ER:Rb = 5,7) (---), o en presencia de ER-d + energía (ATP.Mg 1mM + GTP.Mg 0,2mM) (=====).

Luego de agregar 0,070ml de solución E₁ se depositaron 0,100ml de muestra sobre gradientes de sacarosa 15-50% y se analizaron por ultracentrifugación durante 165 minutos a 40.000 rpm, registrando la absorbancia a 254nm de los efluentes.

FIGURA 21

Influencia de la concentración de ATP sobre el efecto disociante del extracto ribosómico.



Se incubaron durante 10 minutos a 25°, 0,070 mg de ribosomas 80S agotados (80Sag-B), en presencia de ER-G25 (en relación ER:Rb = 6,4), en 0,0937 ml de medio salino acelular (Solución J) al que se agregó distintas concentraciones de ATP.Mg (●, □, ▽) ó ATP.Mg con la adición de un sistema generador de energía (creatina fosfato 3mM + creatina quinasa 20 microgramos/ml) (○, ■, ▾). La siembra de las muestras en los gradientes, su análisis y la obtención de los porcentajes de los picos de 80S se realizó en la forma detallada en la Figura 15.

El gráfico muestra la diferencia respecto al control (ribosomas 80S incubados en ausencia de extracto ribosómico, en medio salino acelular, con ATP.Mg a la concentración especificada en cada caso).

Se graficaron los resultados de tres experimentos, indicados con diferentes símbolos.

ABREVIATURAS

según IUPAC-IUB y J.Biol.Chem. 249, 1 (1974)

AMP, ADP, ATP	adenosina mono, di y trifosfato
GMP, GDP, GTP.	guanosina mono, di y trifosfato
UTP	uridina trifosfato
CTP	citocina trifosfato
AMPCPP	adenosín 5' trifosfato-alfa, beta-metilén difosfonato
AMPPCP	adenosín 5' trifosfato-beta, gamma-metilén difosfonato.
GMPPCP	guanilil 5' trifosfato-beta, gamma-metilén difosfonato.
ATPasa	adenosino trifosfatasa
GTPasa	guanosino trifosfatasa
ATA	ácido aurintricarboxílico
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
Tris	Tris(hidroxiometil)aminometano.
TCA	ácido tricloroacético
tRNA _i	ácido ribonucleico de transferencia iniciador de trigo, no formilable.
tRNA ^{Met} _f	tRNA específico para formilmetionina
tRNA ^{Met} _m	tRNA específico para metionina
f-Met-tRNA	formil-metionil-tRNA
NEM	N-etilmaleimida
poli-U	ácido poliuridílico
PEP	fosfoenolpiruvato
PK	piruvatoquinasa
TMV	virus del mosaico del tabaco
pmoles	picomoles
nmoles	nanomoles
Cl	Curie
A	absorbancia
nm	nanometros
cpm	cuentas por minuto
rpm	revoluciones por minuto
S	unidad Svedberg, coeficiente de sedimentación