

00562

4

14



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS EN LA SINTESIS DE PROTEINAS.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS

QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P r e s e n t a :

REBECA GARCIA MACEDO

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1982



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Página

RESUMEN.	1
Abreviaturas utilizadas.	5

INTRODUCCION.

I. Distribución de las poliaminas en la naturaleza.	7
II. Diversos efectos de las poliaminas a nivel celular.	10
A. Efectos sobre la biosíntesis y estructura de los ácidos nucleicos.	10
B. Efecto sobre la estabilidad de las membranas.	11
C. Efectos sobre la síntesis de proteínas.	11
a. Unión de las poliaminas al ácido ribonucleico de transferencia (ARNt).	13
b. Efecto sobre la estructura de los ribosomas.	15
c. Estimulación en la reacción de aminoacilación.	16
d. Activación de las aminoacil-ARNt sintetasas.	20
e. Estimulación en las reacciones de iniciación y de elongación.	22
III. Hipótesis y Objetivos.	28.

MATERIALES Y METODOS.

I. Materiales.	
A. Material biológico.	31
B. Material de vidrio y equipo.	31
C. Reactivos.	32
II. Métodos.	
A. Aislamiento de las aminoacil-ARNt sintetasas de <u>Escherichia Coli</u> (<u>E. coli</u>).	33
a. Crecimiento de la cepa AT-9 de <u>E. coli</u> deficiente en ribonucleasa I.	33
b. Obtención del paquete celular de <u>E. coli</u> .	34
c. Extracción de las aminoacil-ARNt sintetasas.	34
B. Método para preparar el ARNt de germen de trigo.	36

	Página
C. Determinación de la actividad de las amino- acil-ARNt sintetetasas.	39
D. Preparación en gran escala del ^3H -metionil-ácido ribonucléico de transferencia de iniciación (^3H -met-ARNt ⁱ).	40
E. Preparación del factor de iniciación de germen de trigo que une al met-ARNt ⁱ y al GTP.	42
a. Extracción de un sobrenadante de 100,000 x g (S100) y ribosomas de germen de trigo comercial.	42
b. Preparación de la fracción C de germen de trigo.	44
c. Preparación de la fracción C ₃ .	44
d. Fraccionamiento de C ₃ con sulfato de amonio para separar las fracciones proteínicas α , A, B y δ .	45
F. Relaciones utilizadas para cuantificar la concen- tración del ácido ribonucléico (ARN) y de las proteínas.	46
G. Condiciones para formar el complejo ternario de iniciación [Factor.met-ARNt ⁱ .GTP]	46.

RESULTADOS.

I. Efecto de las poliaminas en la reacción de amino- acilación.	48
A. Purificación de las aminoacil-ARNt sintetetasas y del ácido ribonucléico de transferencia.	48
B. Determinación de las condiciones óptimas para la reacción de aminoacilación.	50
C. Efecto de las poliaminas en la reacción de amino- acilación.	55
II. Influencia de las poliaminas en la formación del com- plejo ternario de iniciación.	63

A. Actividad específica de las fracciones α , A, B y δ aisladas de germen de trigo y efecto de las poliaminas en la formación previa del metionil-ARNt ⁱ .	63
B. Efecto directo de las poliaminas sobre la formación del complejo ternario de iniciación.	71
a. Niveles de saturación de poliamina en la reacción del complejo ternario de iniciación.	71
b. Determinación de los requerimientos de la reacción para formar el complejo ternario de iniciación en presencia y ausencia de poliamina.	75
c. Determinación de la estabilidad de las fracciones A y B a diferentes temperaturas.	82
d. Efecto de las poliaminas en la formación del complejo ternario de iniciación en presencia de una mezcla de las fracciones A y B.	84

DISCUSION Y CONCLUSIONES

I. Reacción de aminoacilación.	88
II. Formación del complejo ternario de iniciación.	92

BIBLIOGRAFIA.

R E S U M E N

Las poliaminas estimulan algunas de las reacciones de la síntesis de proteínas como son: la reacción previa de aminoacilación; la formación del complejo de iniciación compuesto por: el metionil-ARNtⁱ, el GTP, la subunidad ribosomal pequeña y los factores de iniciación; la elongación de la cadena polipeptídica también se estimula.

Hasta la fecha se tiene mayor información a nivel de la reacción de aminoacilación y de la elongación de la cadena polipeptídica. Sin embargo a nivel de las reacciones de iniciación los datos resultan escasos, particularmente en los eucariontes.

En el presente trabajo se estudian las reacciones para formar el metionil-ARNtⁱ (met-ARNtⁱ) y para formar el complejo ternario de iniciación [Factor. met-ARNtⁱ. GTP] en un eucarionte, el germen de trigo.

Para formar el ³H-met-ARNtⁱ se aminoacila el ARNt de germen de trigo con ³H-met en presencia de las aminoacil-ARNt sintetetasas de E.coli, estas enzimas catalizan la unión de la metionina específica para la iniciación de la cadena polipeptídica. En esta reacción se optimizan las concentraciones de: enzima, magnesio y ATP.

Espermina y espermidina en concentraciones óptima, con una concentración de magnesio baja, estimulan la formación del ^3H -met-ARNtⁱ y también estimulan en menor grado la formación del ^3H -leucil-ARNt.

El complejo ternario de iniciación se prepara en presencia de un factor de iniciación capaz de unirse al met-ARNtⁱ y al GTP, este complejo se forma previamente al complejo de iniciación que contiene la subunidad ribosomal pequeña 40S y unicamente se presenta en los eucariontes.

Para preparar el factor que forma el complejo ternario de iniciación se purifica un sobrenadante de 100,000 x g de germen de trigo, pasandolo primero a través de una columna de DEAE-celulosa, después a través de una columna de fosfo-celulosa y finalmente precipitando con sulfato de amonio. Al final del fraccionamiento se obtienen tres fracciones capaces de formar el complejo ternario de iniciación (A, B y δ). Las fracciones A y B presentan la mayor actividad específica y se unen más específicamente al met-ARNtⁱ que al leu-ARNt.

Los met-ARNtⁱ's preparados previamente en presencia o en ausencia de poliamina no muestran ninguna diferencia entre sí cuando se utilizan en la reacción para formar el complejo ternario de iniciación en presencia de la fracción B de germen de trigo.

Las poliaminas muestran efectos contradictorios con las fracciones A y B de germen de trigo: estimulan la formación del complejo ternario de iniciación en presencia de la fracción B y esta misma reacción la inhiben en presencia de la fracción A.

La reacción que se lleva a cabo con las fracciones A y B en presencia o en ausencia de poliamina llena los requisitos de un complejo ternario de iniciación, como son: la dependencia por el GTP, la unión del met-ARNTⁱ y la inhibición provocada por el ácido aurintricarboxílico (ATA).

Las fracciones A y B presentan características diferentes en su comportamiento para llevar a cabo la reacción para formar el complejo ternario de iniciación, por ejemplo, la fracción B muestra menor dependencia por el GTP y se inhibe en menor porcentaje con el ATA que la fracción A. Además la fracción B es más termoestable que la fracción A.

La reacción para formar el complejo ternario de iniciación se inhibe ligeramente en presencia del ARNT de germen de trigo y en presencia del ARNm del virus del mosaico del tabaco (TMV), tanto con la fracción A como con la fracción B.

La espermina estimula ligeramente la formación del complejo ternario de iniciación cuando la reacción se lleva a ca-

bo con una mezcla de las dos fracciones A y B en concentraciones saturantes y solamente se manifiesta una ligera inhibición cuando la concentración de la fracción B se disminuye a un tercio de su saturación. La conclusión de estas observaciones es que el principal efecto es de estimulación.

Los datos de la presente tesis constituyen el primer reporte que muestra la estimulación de la reacción para formar el complejo ternario de iniciación en presencia de las poliaminas y sirven para apoyar que las poliaminas estimulan la síntesis total de proteínas principalmente en la etapa de iniciación.

Es necesario purificar en mayor grado las fracciones A y B para saber específicamente a qué se deben las diferencias que muestran entre sí y también es necesaria la purificación para estudiar con más detalle el mecanismo por el cual las poliaminas estimulan la formación del complejo ternario de iniciación.

Abreviaturas utilizadas.

E. coli - Escherichia coli.

ARN - ácido ribonucléico.

ARNt - ácido ribonucléico de transferencia.

ARNr 16S - ácido ribonucléico ribosomal de la subunidad ribosomal pequeña.

ARNm - ácido ribonucléico mensajero.

ADN - ácido desoxiribonucléico.

80S - ribosoma de eucariontes.

70S - ribosoma de procariontes.

40S - subunidad ribosomal pequeña de eucariontes.

60S - subunidad ribosomal grande de eucariontes.

30S - subunidad ribosomal pequeña de procariontes.

50S - subunidad ribosomal grande de procariontes.

B. thur. - Bacillus thurigiensis.

ATP - adenosin-5'-trifosfato.

AMP - adenosin-5'-monofosfato.

PPi - pirofosfato.

³²PP - pirofosfato marcado con fósforo 32.

[aa.AMP.E] - complejo formado por un aminoácido, AMP y la enzima aminoacil-ARNt sintetasa correspondiente.

ARNt^{met} - ácido ribonucléico de transferencia que se esterifica con la metionina para posiciones internas de la cadena polipeptídica.

ARNt^{fen} - ácido ribonucléico de transferencia que se esterifica exclusivamente con la fenilalanina.

ARNt^{f met} - ácido ribonucléico de transferencia que se esterifica con la metionina para iniciar la cadena polipeptídica de procariontes.

met-ARNtⁱ - metionil-ácido ribonucléico de transferencia que se une a la metionina específica para la iniciación de la cadena polipeptídica en eucariontes.

ARNm-TMV - ácido ribonucléico mensajero del virus del mosaico del tabaco.

- fmet-ARNt - formil-metionil-ARNt, fuente de metionina para la iniciación de la cadena polipeptídica en procariontes.
- GTP - guanosin -5' - trifosfato.
- [factor.met-ARNtⁱ.GTP] - complejo ternario de iniciación que se forma unicamente en los eucariontes.
- [40SI] - complejo de iniciación de eucariontes formado con la subunidad ribosomal pequeña 40S, el met-ARNtⁱ, el GTP y los factores de iniciación.
- [80SI] - complejo de iniciación de eucariontes formado por las subunidades ribosomales 40S y 60S, el ARNm, el met-ARNtⁱ y los factores de iniciación.
- eIF - factor de iniciación de eucariontes, se numeran del 1 al 5 por ejemplo: eIF-2
- eIF-2 - factor de iniciación que forma el complejo ternario.
- [30SI] - complejo de iniciación de procariontes formado con la subunidad pequeña de procariontes 30S, el fmet-ARNt, el GTP, los factores de iniciación y el ARNm.
- [70SI] - complejo de iniciación de procariontes, en el cual se encuentran las dos subunidades ribosomales 30S y 50S.
- [fmet-ARNt . ribosoma . AUG] - complejo de iniciación de procariontes similar al [70SI] , aquí se tiene el codon de iniciación AUG en lugar del ARNm.
- NaOAc - acetato de sodio.
- Mg (OAc₂) - acetato de magnesio.
- KOAc - acetato de potasio.
- TCA - ácido tricloro acético.
- EDTA - ácido etilendiamino tetraacético.
- KEDTA - etilendiamino tetracetato de potasio
- Tris - tris(hidroxi metil) - amino metano.
- ATA - ácido aurintricarboxílico.
- nd - no determinado.
- In - inhibición.
- Es - estimulación.

INTRODUCCION

I. Distribución de las poliaminas en la naturaleza.

Las poliaminas más estudiadas en los sistemas biológicos son: i) las diaminas; (1,5 diamino pentano o cadaverina y 1,4 diamino butano o putrescina) y ii) las poliaminas; (espermina y espermidina) (Figura 1). Estos compuestos y sus derivados más cercanos se localizan en una gran variedad de especies: animales, bacterias, levaduras y plantas, y es probable que todas las células contengan alguna poliamina. Estas moléculas, así como sus enzimas biosintéticas, se encuentran en concentraciones elevadas cuando la proliferación celular se desarrolla activamente, tanto en procariontes como en eucariontes. Por ejemplo, cuando a las células de eucariontes en reposo se les induce su crecimiento o diferenciación se puede observar un incremento notable en la concentración de las aminas y en algunos casos de una de las enzimas involucradas en su biosíntesis, como es la ornitino descarboxilasa (Tabor & Tabor, 1976).

Existe una gran variabilidad en cuanto a la cantidad de poliamina intracelular y además su concentración depende del pH, de las condiciones de crecimiento y en los procariontes depende también de la composición de los medios de cultivo. En general los procariontes tienen mayor cantidad de putrescina que de espermidina y algunas bacterias como E. coli carecen de espermina.

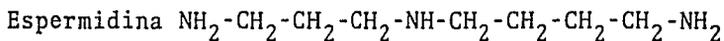
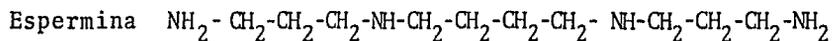
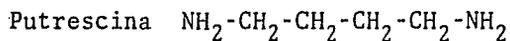
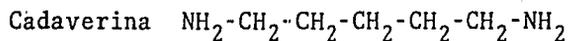


Figura 1. Estructura de las poliaminas que se encuentran con mayor frecuencia en la naturaleza.

Los eucariontes contienen espermina y espermidina en mayor proporción que putrescina y cadaverina.

Por tanto, espermidina como espermina se encuentran en forma predominante en germen, coleoptilo y hojas de trigo, así como en embriones de otras semillas como: cebada, arroz, avena, maíz y sorgo; mientras que putrescina y cadaverina están en menor cantidad (Moruzzi & Caldarera 1964; Bagni, et al, 1967; Smith, 1971; Tabor & Tabor, 1976 y Galston & Kaur-Sawhney, 1980).

Existe escasa información en cuanto a la distribución de las poliaminas dentro de las células. Dichas moléculas, debido al pH celular, se encuentran en forma protonada y se unen no-covalentemente a los polianiones, pero por su alta solubilidad en medio acuoso se redistribuyen fácilmente entre los organelos cuando se preparan homogenados de los diferentes tejidos. A pesar de esta dificultad, espermina aparece principalmente en el núcleo y otras poliaminas aparecen unidas a los ribosomas (Tabor & Tabor, 1976 y Galston & Kaur-Sawhney, 1980).

In vivo, la importancia de las poliaminas se demuestra por ejemplo con las mutantes de E.coli, que no son capaces de sintetizar poliaminas y requieren de la adición exógena de tales componentes para poder sobrevivir (Morris & Jorstad, 1970 y Morris & Hansen, 1973).

II. Diversos efectos de las poliaminas a nivel celular.

Las poliaminas como policationes tienen un papel significativo en la biosíntesis y estructura de los ácidos nucleicos, en la estructura de organelos, en ciertos aspectos del crecimiento, y también durante la senescencia en plantas. A continuación se describen algunos de estos efectos producidos por las poliaminas.

A. Efectos sobre la biosíntesis y estructura de los ácidos nucleicos.

Desde hace varios años se ha sugerido que durante el desarrollo celular, las poliaminas controlan directamente la síntesis de ARN y ADN debido a que la actividad de la ornitino-descarboxilasa antecede a la biosíntesis de los ácidos nucleicos. (Tabor & Tabor, 1976; Galston & Kaur-Sawhney, 1980). Por otro lado putrescina y espermidina estabilizan a los protoplastos de hojas de avena y evita que disminuya la síntesis de ARN y de proteínas (Altman, et al., 1977).

En el bacteriófago T4 y en el virus herpes, las poliaminas están asociadas al ADN. En T4 representan el 40% del total de cationes (Tabor & Tabor, 1976). La gran afinidad que muestran las poliaminas por los ácidos nucleicos (ADN y ARN) ayuda a estabilizar sus

estructuras evitando su desnaturalización y degradación. Estos efectos pueden explicarse porque las poliaminas neutralizan los grupos fosfatos de los ácidos nucléicos, reduciendo de esta manera su acción repulsiva (Bachrack, 1973; Tabor & Tabor, 1976).

B. Efecto sobre la estabilidad de las membranas.

Se tiene información de que las poliaminas tienen la capacidad de estabilizar membranas, por ejemplo: las poliaminas que se adicionan a los medios de cultivo evitan la lisis de los esferoplastos y de los organismos halofílicos (Tabor & Tabor, 1976). También ayudan a mantener intactos a los protoplastos de avena (Galston & Kaur-Sawhney 1980 y Altman et al, 1977), cuando las poliaminas se tienen en soluciones salinas diluídas estabilizan mitocondrias (Tabor, 1960) y en cloroplastos aislados favorecen la estabilidad de las membranas tilacoides (Galston & Kaur-Sawhney, 1980 y Guarino & Cohen, 1979).

C. Efectos sobre la síntesis de proteínas.

En los párrafos siguientes se mencionan algunos de los trabajos realizados hasta la fecha, en relación a la interacción de las poliaminas con los diversos componentes involucrados en la síntesis de proteínas. Existen reportes desde 1961 que relacionan

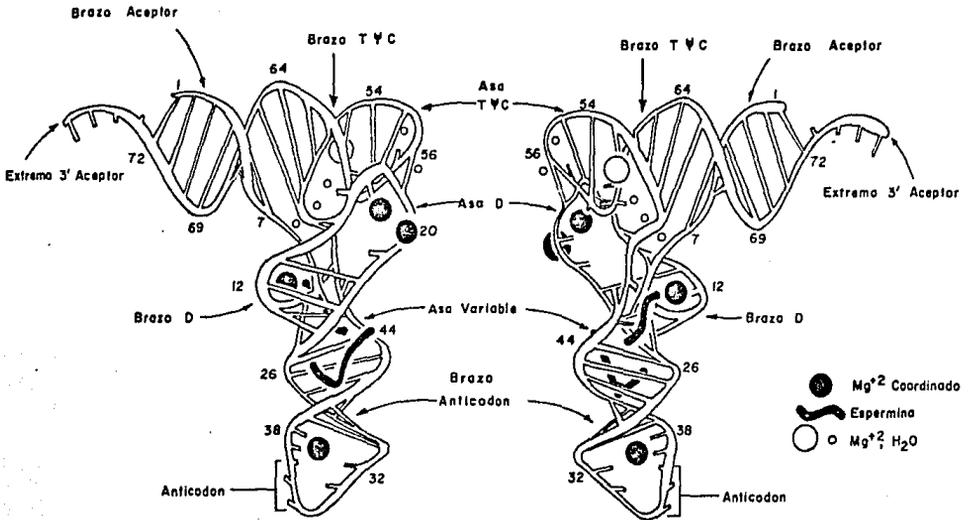


Figura 2. Se muestran dos lados del ARNt^{fen} de levadura, la estructura está representada como un tubo enrollado. Las barras atravesadas representan las bases apareadas y las barras más cortas indican las bases sin aparear. Los círculos negros muestran las posiciones de dos moléculas de espermina, y 4 iones de magnesio. Los círculos vacíos representan posibles sitios de unión para el magnesio o para las moléculas de agua. Todos los iones de magnesio parece que se localizan en las regiones donde la cadena de polinucleótidos se dobla.

a las poliaminas con la biosíntesis de proteínas tanto in vivo como in vitro. Los principales efectos que se han observado son:

a. Unión al ARNt; b. efecto sobre la estructura de los ribosomas; c. estimulación en la reacción de aminoacilación; d. activación de las aminoacil-ARNt sintetasas; e. estimulación en las reacciones de iniciación y elongación.

a. Unión de las poliaminas al ácido ribonucléico de transferencia (ARNt).

Se ha descrito que tanto las poliaminas espermina y espermidina como el magnesio, tienen diferentes sitios de unión en el ARNt. En el caso de la espermina se ha encontrado que el ARNt une dos moléculas de espermina, una de ellas en el brazo del anticodón y otra en el asa variable. También presenta 4 iones de magnesio, de los cuales uno se encuentra en el asa del anticodón, dos en el asa D y otro en coordinación con los fosfatos en las posiciones 8,9,11 y 12 (figura 2). Las moléculas de espermina posiblemente ayudan a estabilizar el ácido ribonucléico de transferencia, especialmente en la región del anticodón (Quingley, et al, 1978).

Para espermidina, el ARNt presenta de 2-3 sitios de unión relativamente fuertes y de 7-8 sitios relativamente débiles. Tanto espermidina, espermina como putrescina, incrementan la fluorescencia de la base 4-tiouridina, que se localiza entre los bra-

zos DHU (dihidrouracilo) y CCA (terminal). Las variaciones en la fluorescencia de esta base, indican cambios en la configuración terciaria del ARNt (Pochon & Cohen, 1972).

El magnesio y la espermidina, producen diferentes variaciones en el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) del ARNt^{fen} de levadura. Sin embargo la cadaverina no produce ningún efecto, lo cual indica que al parecer la unidad de triamina asimétrica es importante para estabilizar la molécula de ARNt (Bolton & Kerns, 1977).

Las poliaminas incrementan la actividad de metilasas específicas, las cuales metilan a los ácidos ribonucleicos ribosomal y de transferencia modificando de esta forma sus estructuras (Leboy & Glick, 1976; Young & Srinivasan, 1971; Isaksson, 1973; Bachrack, 1973).

En resumen, tanto el magnesio como las poliaminas, juegan un papel importante y significativo en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula del ácido ribonucleico de transferencia; dicha modificación posiblemente cambie su actividad biológica durante la síntesis de proteínas (Quingley, 1978 y Cohen & Zalik, 1978).

b. Efectos sobre la estructura de los ribosomas.

La asociación de las subunidades ribosomales para formar el ribosoma 80S de eucariontes o 70S de procariontes in vitro, es un proceso reversible que depende de la concentración del magnesio en el medio de reacción. Los cationes monovalentes, las poliaminas y los factores de iniciación de la síntesis de proteínas también influyen en la formación del ribosoma.

La asociación de las subunidades ribosomales de E. coli y Bacillus thurigiensis (B. thur.) se favorecen cuando el magnesio está presente a una concentración de 20 mM, también se favorece la asociación cuando se tiene una concentración de magnesio de 6mM más espermina 5 mM y putrescina 25 mM o cuando la concentración de magnesio está entre 2.5 - 7.5 mM más espermina 1 mM (Igarashi, et al., 1977; Michalski, et al., 1979; Rosano & Hurwitz, 1979). En germen de trigo la asociación de las subunidades ribosomales se favorece cuando se tiene una concentración de magnesio de 0.15 mM más espermidina 0.09 - 0.2 mM. (Moore, et al., 1980).

En cambio la disociación de las subunidades ribosomales de E. coli se favorece cuando la concentración de magnesio disminuye hasta 6 mM o cuando la concentración de este ion es menor a 4 mM y se tiene además una concentración de putrescina

de 15 mM, también se promueve la disociación de las subunidades cuando se tienen juntas espermidina y putrescina en concentraciones de 1 mM y 15 mM respectivamente. (Rosano & Hurwitz, 1979 y Michalski, et al., 1979).

Igarashi, et al. (1977) demostraron que espermidina estimula el rendimiento de los ribosomas 70S de E. coli y de B. thur., los cuales habían sido reconstituidos a partir de la subunidad ribosomal 50S, del ácido ribonucléico ribosomal 16S (ARNr 16S) y a partir de las proteínas ribosomales de la subunidad 30S, al parecer la interacción de la espermidina con el ARNr 16S fue la causa de la estimulación.

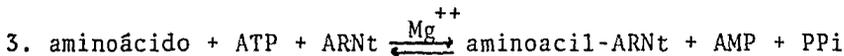
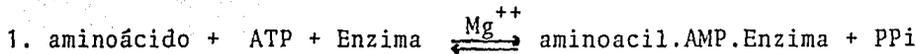
Por otro lado el magnesio y las poliaminas en concentraciones a las cuales promueven la asociación de las subunidades ribosomales, producen ciertos cambios en la topografía de algunas de las proteínas ribosomales, Michalski, et al. (1979) sugieren que estos cambios se llevan a cabo antes de que las subunidades ribosomales se asocian.

c. Estimulación de la reacción de aminoacilación.

La reacción de aminoacilación del ARNt se representa convencionalmente por las reacciones: 1. de activación, también conocida como reacción de intercambio de pirofosfato y 2. de

de transferencia. La reacción 3 resulta de la suma de 1 y 2.

Reacciones 1, 2 y 3:



El ión magnesio se requiere tanto para catalizar la reacción de activación (1) como para catalizar la reacción total (3). La espermina puede sustituir al magnesio en la reacción 3, pero no en la reacción 1 (Tabor & Tabor, 1976).

Para ensayar la reacción de aminoacilación catalizada por las aminoacil-ARnt sintetasas, se han desarrollado los siguientes métodos: i) la formación del aminoacil-ARnt en presencia de aminoácido radiactivo; ii) el intercambio de PPi y ATP dependiente de aminoácido, esto es la incorporación de ^{32}PPi al ATP, iii) el aislamiento del complejo [aminoacil.AMP. Enzima] ó [aa. AMP. E] y iv) la determinación del complejo anterior a través de la formación de los hidroxamatos, que son los productos de la reacción del [aa.AMP.E] con hidroxilamina. La contribución de los métodos anteriores han hecho posible entender el papel de las poliaminas en la reacción de aminoacilación, como se indica a continuación (Stulberg & Novelli, 1962).

Reacción de aminoacilación en presencia de poliaminas.-

En la reacción de aminoacilación en presencia de poliaminas no hay intercambio de pirofosfato. Las poliaminas, en presencia de cierta cantidad de magnesio, estimulan esta reacción con cualquiera de los 20 aminoácidos. Estos estudios se han realizado principalmente en E. coli (Igarashi et al., 1971); en levadura (Robinson & Zimmerman, 1971) y en hígado de rata (Igarashi et al., 1978). Sin embargo, aún cuando se tienen las condiciones necesarias para formar cada uno de los aminoacil-ARNt's, en presencia de poliaminas no se ha observado la reacción de intercambio P_{Pi}-ATP. La ausencia de este intercambio es independiente del grado de purificación de las aminoacil-ARNt sintetetasas, ya que, utilizando aminoacil-ARNt sintetetasas de E.coli sin purificar (Igarashi et al., 1971 y Matsuzaki & Takeda, 1973), o enzimas purificadas (Kayne & Cohn, 1972; Pastuszyn & Loftfield, 1972), en ambos casos no se detectó el intercambio P_{Pi}-ATP.

En la reacción de aminoacilación con poliaminas no se forma hidroxamato. Usando el método de formación de hidroxamatos, la reacción en presencia de espermina (2mM), espermidina (5mM) o putrescina (15 mM), no forma los hidroxamatos pero sí se obtienen los aminoacil-ARNt's correspondientes. Esto fue estudiado para isoleucina, valina y leucina (Igarashi et al., 1972; Pastuszyn & Loftfield, 1972).

De los trabajos mencionados en los dos párrafos anteriores, se puede concluir que cuando las poliaminas están presentes en la reacción de aminoacilación, el complejo intermediario (aminoacil.AMP.Enzima) [aa.AMP.E.] no se forma; mientras que sí se detecta cuando la reacción se produce en presencia de magnesio, (Matsuzaki & Takeda, 1973).

Las poliaminas estimulan la transferencia del aminoacil adenilato al ARNt. En levadura, se ha observado que espermina (12 mM) o espermidina (7 mM) estimulan la transferencia de fenilalanina del complejo fenil-adenilato [fen.AMP.Enzima] al ARNt^{fen} y que además existe una relación entre la cinética de esta reacción y el aumento en la fluorescencia del ARNt^{fen}. La reacción de transferencia mediada por poliaminas, al igual que la fluorescencia del ARNt^{fen}, disminuyen al aumentar la distancia intramolecular entre los grupos amino. Esto se ha visto al realizar la reacción en presencia de: etilendiamina; 1,3 propanodiamina; 1,4 butanodiamina y 1.5 pentanodiamina. De estos experimentos se infiere que el papel de los policationes es el de promover un cambio conformacional en el ARNt, hacia una estructura más estable y con mayor actividad biológica, lo cual se vería reflejado en la estimulación de la reacción de transferencia (Robison & Zimmerman, 1971).

Con base en los datos anteriores, varios autores como Igarashi et al. (1971); Loftfield & Pastuszyn (1972) y Matsuzaki & Takeda (1973), piensan que el mecanismo de la reacción de aminoacilación en presencia de poliaminas y magnesio es diferente al mecanismo de la reacción en presencia únicamente de magnesio. Esto se apoya en el hecho de que en la reacción de aminoacilación con poliaminas no se observa el intercambio P_{Pi}-ATP, ni la formación del complejo [aa.AMP. E]. Ellos proponen que dicha reacción en presencia de poliaminas se lleva a cabo por medio de un mecanismo concertado, en el cual los 3 sustratos unidos a la enzima, reaccionan sin formar los intermediarios para dar los tres productos.

d. Activación de las aminoacil-ARnt sintetetasas.

Las poliaminas también pueden afectar la reacción de aminoacilación activando directamente a las aminoacil-ARnt sintetetasas.

Jakubowski (1979 y 1980) demostró que espermidina y espermina mantienen la estructura activa de las aminoacil-ARnt sintetetasas purificadas del tulipán amarillo, este efecto lo ejercen las poliaminas solas o en cooperación sinérgica con algunas proteínas como hemoglobina y albúmina de suero bovino. En particular la valil-ARnt sintetetasa y la fenil-ARnt sintetetasa resultaron inactivas cuando se purificaron, pero recuperaron su actividad cuando se adicionó al medio de reacción espermina o espermidina. Jakuboski sugiere que in vivo las poliaminas po--

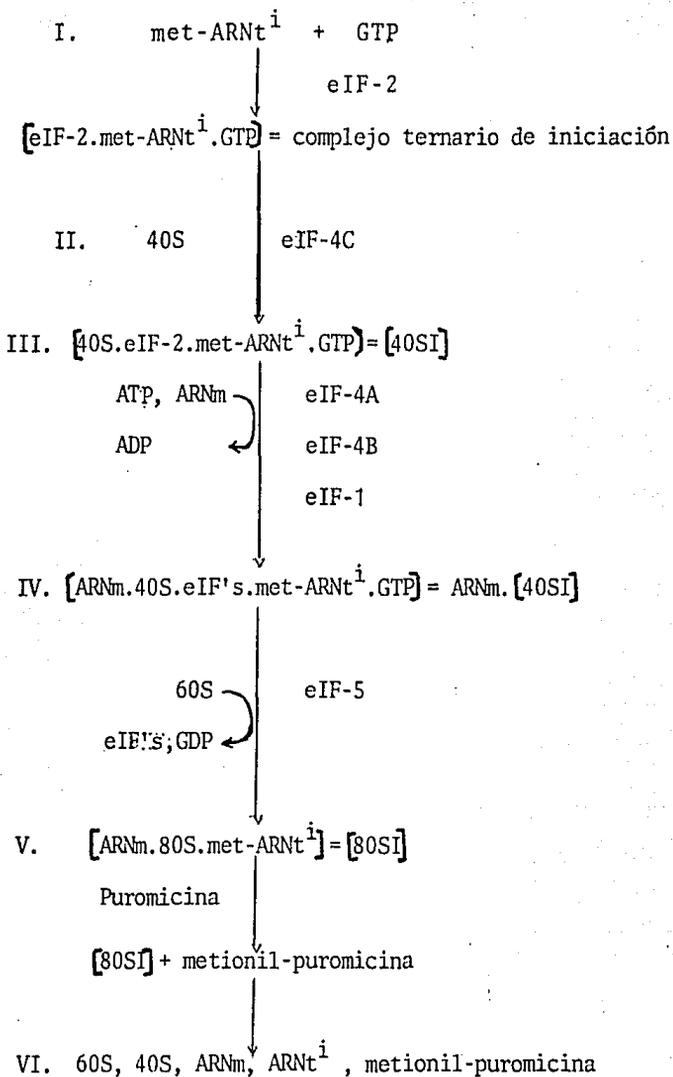
Reacciones:

Figura 3. Secuencia de eventos que se llevan a cabo durante la iniciaci3n de la sntesis de las protefnas en eucariontes.

drían estabilizar los complejos proteínicos formados por las aminoacil-ARNt sintetetasas.

e. Estimulación en las reacciones de iniciación y de elongación.

La síntesis de las proteínas se puede dividir en tres etapas: la iniciación, la elongación y la terminación de la cadena polipeptídica. A continuación se describen cada uno de los eventos que constituyen las etapas antes mencionadas, prestando especial atención a la iniciación.

Iniciación de la síntesis de proteínas.- Esta serie de eventos requieren de una reacción previa: la aminoacilación, en la cual la enzima metionil-ARNt sintetetasa cataliza la unión de metionina al ARNt^i (específico para la metionina que inicia la cadena polipeptídica), el producto final de la reacción es el metionil- ARNt^i [met- ARNt^i].

Una vez formado el met- ARNt^i , la iniciación de la síntesis de las proteínas se lleva a cabo como lo proponen: Schreirer & Stahelin (1973), Jay & Kaempher (1974) y Benne & Hershey (1978) En la figura 3 se puede observar que en la primera reacción I el factor de iniciación eIF-2 se une al GTP y al met- ARNt^i formando el complejo ternario, que se indica como: [factor.met- ARNt^i . GTP].

En esta etapa el GTP no se hidroliza y no intervienen ninguno de los demás factores de iniciación.

En la reacción II, el complejo ternario formado previamente se une a la subunidad ribosomal 40S, en ausencia de ARNm y esto da como resultado la formación del complejo 40S de iniciación ó [40SI]; el factor eIF-4C estabiliza al complejo.

Al unirse el ARNm se completa la formación del complejo 40SI (reacción IV). Los factores eIF-4A, eIF-4B y el eIF-1 están involucrados en esta etapa, ya que estimulan la unión del ARNm a la subunidad ribosomal 40S, también se requiere de ATP, el cual se hidroliza. Todos los factores que han sido mencionados permanecen unidos al [40SI].

En la reacción V, la unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo [40SI] da como resultado la formación del complejo 80S de iniciación ó [80SI] esta unión requiere del factor eIF-5 y de la hidrólisis del GTP; durante esta etapa los factores de iniciación eIF-2 y eIF-3 se liberan del complejo.

El complejo 80S hasta aquí formado reacciona parcialmente con puromicina, esta reacción es un modelo para medir la formación de la primera unión peptídica, esto es la formación de metionil-puromicina. Para que el [80SI] reaccione eficientemente con puromicina se requiere del factor eIF-4D.

Por último se lleva a cabo la disociación del complejo [80SI] (reacción VI). Existe un factor de iniciación, posiblemente el eIF-3, que disocia al ribosoma 80S en subunidades libres, las cuales pueden reincorporarse a la síntesis de las proteínas.

Elongación de la cadena polipeptídica.- La subunidad ribosomal 60S tiene dos sitios a los cuales se puede fijar el aminoacil ARNt, estos se han denominado: el sitio P (peptidil) y el sitio A (aminoacil). La fase de elongación es un proceso cíclico que consta de tres etapas: a) la unión del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma (la unión está dirigida por el codon correspondiente en el ARNm); b) la formación de la unión peptídica y c) el traslado del ARNm y del peptidil-ARNt recién formado desde el sitio A hasta el sitio P del ribosoma. De esta manera, se libera el sitio A para el nuevo aminoacil-ARNt que entra al ciclo de elongación.

Al formarse el complejo de iniciación [80SI], el met-ARNt se encuentra en el sitio P. En este momento el ribosoma está listo para empezar la elongación de la cadena polipeptídica. Los factores de elongación junto con la hidrólisis del GTP catalizan la unión de los aminoacil-ARNt's al sitio A del ribosoma. Una vez que los aminoacil-ARNt's se encuentran en dos sitios A y P del ribosoma se esterifican formando la unión peptídica, por medio de una reacción catalizada por la peptidil-

transferfasa.

Ya formada la unión peptídica, el ARNt desaminoacilado y que se localiza en sitio P sale del ribosoma, el peptidil-ARNt del sitio A toma su lugar. La etapa requiere de otro factor de elongación llamado translocasa que cataliza también la hidrólisis del GTP. El ribosoma avanza una distancia correspondiente a un codon sobre el ARNm en dirección al extremo 3' y puede continuar con el siguiente ciclo de elongación hasta completar la síntesis de la proteína.

Terminación de la síntesis de las proteínas.- El mecanismo por el cual se liberan las cadenas polipeptídicas del ribosoma no se conoce tanto como la iniciación ó la elongación, pero se sabe que requiere de dos factores de terminación, de la hidrólisis del GTP y de la aparición de los codones de terminación: (UAG, UAA y UGA) sobre el ARNm, de tal manera que el ribosoma libera al ARNm, el peptidil-ARNt se hidroliza y el mismo ribosoma se disocia en subunidades 40S y 60S. En estas condiciones queda listo para reincorporarse al ciclo ribosómico para la síntesis de otra molécula de proteína.

Efecto de las poliaminas en la iniciación de la síntesis de proteínas.- La información relacionada con el papel de las poliaminas, en la iniciación de la síntesis de proteínas, es bastante reducida. Algranati & Goldemberg (1977), demostraron que los

extractos de células de un auxótrofo de putrescina de E.coli, crecidas en un medio sin putrescina eran de 3-4 veces menos activos en la síntesis de proteínas y además la cantidad del complejo de iniciación [fmet-ARNt. ribosoma.AUG] era de 3-5 veces menor que los obtenidos con los extractos de E.coli, crecida en un medio con putrescina. Al parecer la explicación de tal comportamiento se debe a que en las células normales la poliamina, en presencia de magnesio estimula la unión de fmet-ARNt a la subunidad ribosomal 30S. Esto se observó independientemente de que se usara ARNm natural o sintético e independientemente también de la pureza de los factores de iniciación presentes en los ensayos (Ochoa et al., 1967; Igarashi & Hirose, 1978). Más recientemente, Igarashi et al. (1980) han confirmado los datos anteriores y proponen que la estimulación de la unión de fmet-ARNt a la subunidad 30S se refleja en un aumento en la síntesis total de proteínas.

Efecto de las poliaminas en la elongación.- Hay innumerables evidencias que indican que las poliaminas intervienen principalmente en la elongación de los polipéptidos. Por ejemplo, se ha reportado que las poliaminas estimulan la síntesis de polifenil-alanina en sistemas libres de células derivadas de Salmonella Typhimurium (Martin & Ames, 1962); E. coli (Martin & Ames, 1962 e Igarashi et al., 1974); de cebada (Cohen & Zalik, 1978) y de reticulocito de conejo (Konecki et al., 1975).

Atkins et al., (1975) encontraron que las poliaminas estimulaban la síntesis de proteínas de alto peso molecular en un sistema libre de células de ascites Krebs II, programado con ARNm del virus Ad2. Este efecto fue tan marcado que, las proteínas de 71,000 y de 30,000 daltones, que se observan in vivo únicamente fueron detectadas in vitro en presencia de poliaminas. De igual manera, Hunter et al. (1977) observaron que la presencia de espermidina estimula la síntesis de polipéptidos de mayor peso molecular en un sistema libre de células de germen de trigo y propone que algunos de los componentes del sistema de síntesis de proteínas podrían aceptar mejor a las poliaminas que al magnesio, produciendo como consecuencia un incremento en la elongación de los péptidos.

In vivo, la importancia de las poliaminas se ha manifestado a través de los trabajos realizados con mutantes de E.coli que no son capaces de sintetizar poliaminas y que requieren de la adición exógena de estas poliaminas para llevar a cabo sus funciones vitales (Morris & Hansen, 1973). En eucariontes, las poliaminas también tienen un papel importante Villanueva et al. (1977) encontraron que durante la germinación de algunas semillas como chícharo, haba, trigo, maíz y otras, la síntesis de proteínas y de ácido ribonucléico se incrementaba de manera paralela a la síntesis de poliaminas. Este efecto también se observó en otros tejidos y células de eucariontes en

desarrollo (Galston & Kaur-Sawhney, 1980).

En resumen, las poliaminas muestran los siguientes efectos:

1. Estimulan la aminoacilación con los 20 aminoácidos.
2. Estabilizan la conformación del ARNt, de manera diferente al magnesio, ya sea por medio de una interacción directa poliamina-ARNt o estimulando su metilación.
3. Favorecen la asociación de subunidades ribosomales.
4. Aumentan la unión de fmet-ARNt a la subunidad 30S.
5. Aumentan el tamaño de los polipéptidos, en un sistema libre de células.

III. Hipótesis y objetivos.

Los datos anteriores y la información de Román R. (comunicación personal), quién observó que las poliaminas incrementan la síntesis de proteínas, en un sistema libre de células de germen de trigo, únicamente cuando se adicionan mezclas de aminoácidos y no aminoacil-ARNt's, como fuente radiactiva, indican que el papel principal de las poliaminas es a nivel de la iniciación de la síntesis de proteínas.

La información sobre el efecto de las poliaminas en plantas es muy escasa y también en otros eucariontes la iniciación de síntesis de proteínas está poco estudiada. En procariontes úni

camente se sabe que las poliaminas estimulan la formación del complejo de iniciación con la subunidad pequeña (30SI). Debido a esta escasa información el estudio del efecto de las poliaminas sobre la iniciación de la síntesis de proteínas debe hacerse a varios niveles: 1) en la reacción de aminoacilación del metionil-ARNt iniciador; en la reacción del complejo ternario de iniciación [Factor.met-ARNtⁱ.GTP]; 2) en la reacción del complejo de iniciación [40SI] y 3) en la formación del complejo de iniciación funcional [80SI].

De acuerdo a los antecedentes citados se podría esperar que:

i. Si las poliaminas afectan la reacción de aminoacilación, entonces pueden intervenir en la formación del metionil-ARNtⁱ (de iniciación).

ii. Si las poliaminas interactúan con las proteínas y el ARNt, entonces pueden también intervenir en la formación del complejo ternario de iniciación: [Factor.met-ARNtⁱ.GTP].

Para probar dichas hipótesis se seleccionó al germen de trigo como fuente de material biológico y se plantearon los siguientes objetivos:

A. Optimizar la formación de metionil-ARNtⁱ, para lo cual se usó un sistema heterólogo con aminoacil-ARNt sintetasas de E.coli ARNt de germen de trigo.

- B. Comparar el rendimiento y funcionalidad del ^3H -metionil-ARNt formado en presencia y ausencia de la poliamina.
- C. Aislar el factor de iniciación de germen de trigo, que une met-ARNtⁱ y GTP.
- D. Comparar la formación del complejo ternario de iniciación en presencia y en ausencia de poliamina.

MATERIALES Y METODOS

I. Materiales.

A. Material Biológico

La cepa AT-9 de E.coli deficiente en ribonucleasa I fue donación del Dr. Fernando Bastarrachea del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Germen de trigo comercial sin tostar.

B. Material de vidrio y equipo.

El material utilizado se lavó con detergente Extran (de Merck) se enjuagó con agua destilada y con agua desionizada, se secó en el horno. Los aparatos utilizados fueron los siguientes:

Esterilizador

Cámara de crecimiento a 37°C y con agitación a 220 rpm.

Centrífuga refrigerada a velocidad intermedia modelo J-21 de Beckman.

Ultracentrífuga refrigerada modelo L-50 de Beckman.

Colector de fracciones LKB 7,000 Ultrorac (8,300 Unicord II).

Espectrofotómetro Zeiss .

Baños de incubación a 20°C: Precisión GCA Corporation y J. M. Ortiz.

Espectrómetro de Centelleo líquido Tri-Carb modelo 3255 de Packard.

Filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman.

Filtros de nitrocelulosa con un poro de 0.45 u de Millipore.

C. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El extracto de levadura y la bactotriptona utilizados para el medio de crecimiento de E.coli, fueron de la casa Difco.

Creatina Cinasa de Boehringer Mannheim Biochemicals.

Alúmina Alco A.

Polietilen glicol (Carbowax PEG 6000), Ficher Scientific Co.

Metionina ^3H 15 Ci/m mola de New England Nuclear.

Leucina ^3H 15 Ci/m mola de New England Nuclear.

Líquido de centelleo PPO-POPOP de Amersham Searle Co.

Todos los demás reactivos fueron de las marcas: Sigma y Merck.

PPO - 2,4 Difeniloxazol

POPOP - 1,4-bis 2- (5- feniloxazolil) - benceno;

fenil-oxazolil fenil-oxazolil-fenil.

II. Métodos.

A. Aislamiento de las aminoacil-ARNt sintetasas de Escherichia coli (E. coli).

- a. Crecimiento de la cepa AT-9 de E. coli deficiente en ribonucleasa I. El medio de crecimiento utilizado, tiene la siguiente composición por litro y se ajusta a pH 7.0 con NaOH:

NaCl 5 g.
Bactotripton 8 g.
Extracto de Levadura 5 g.

El medio se transfiere a matraces Erlenmeyer, hasta completar la mitad de la capacidad del matraz, se cubren con tapones de algodón y gasa, se esterilizan en autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos. Primero se inoculan 25 ml de medio estéril tomando una alícuota del inóculo original, se incuba a 37°C, durante 24 hrs. Este inóculo se transfiere a medio fresco haciendo una dilución de 1:100, se incuba durante 15.5 hrs. a 37°C. De este matraz se transfiere el inóculo a medio fresco diluyendo 1:20, se incuba a 37°C con una agitación de 200-250 rpm, aproximadamente durante 3 hrs. La cepa debe cosecharse en la fase logarítmica tardía de su crecimiento.

b. Obtención del paquete celular de E. coli.

El cultivo de la cepa de E. coli, se centrifuga a 14,360xg a 5°C durante 20 minutos en el rotor JA-14 de la centrífuga JA-21 de Beckman. El paquete celular, resultante se centrifuga a 25,300 x g a 5°C, durante 30 minutos en el rotor JA-20 de la misma centrífuga.

Se determina el peso del paquete celular húmedo y se almacena a -20°C.

c. Extracción de las aminoacil-ARNt sintetasas.

Soluciones:

De molienda - Tris-HCl 0.01M pH 8, Mg Cl₂ 0.01M y 10% de glicerol.

Fa - Solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.02 M pH 7.5 MgCl₂ 0.001 M, 10% de glicerol, mercaptoetanol, 0.02 M.

Fb - Solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.25 M pH 6.5 MgCl₂ 0.001 M, 10% de glicerol mercaptoetanol 0.02 M.

Fc - Solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.002 M pH 7, 10% de glicerol, 15% de polietilenglicol, mercaptoetanol 0.04 M.

Primer paso: Obtención de S100 de E.coli.

Las células de E.coli se rompen en presencia de alúmina (1:3) en un mortero frío, las enzimas se extraen adicionando medio de molienda (20 ml/6g de células), hasta obtener una pasta homogénea. Esta se centrifuga para separar los restos celulares, primero a 11,400 xg, durante 20 minutos y después a 25,300 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifuga a 105,536 xg durante 1.5 hrs. En el sedimento se encuentran los ribosomas y en el sobrenadante (S100) las aminoacil-ARNt sintetasas.

Segundo paso: Purificación de las aminoacil-ARNt sintetasas a través de una columna de intercambio iónico.

El sobrenadante S100 que se obtiene en el primer paso, se aplica sobre una columna de DEAE-celulosa (Sigma) de 16.5 x 1.5 cm de diámetro, previamente equilibrada con una solución Fa ; se colectan fracciones de 5 ml usando el colector de fracciones LKB.

Se determina la densidad óptica (D.O.) de las fracciones a 260 y 280 nm y una vez que la absorbancia haya disminuído, se aplica la solución Fb, las fracciones con D.O. a 280 nm mayor que a 260 nm se reúnen y se dializan para concentrar las aminoacil-ARNt sintetasas contra solución Fe, durante 5.5 hrs. a 4°C, el concentrado se mezcla con un volumen igual de glicerol y se almacena a -20°C.

B. Método para preparar el ARNt de germen de trigo.

Solución de extracción - Tris/acetato 0.01 M pH 8

Mg (OAc)₂ 0.01 M

KEDTA 0.005 M pH 7.4

NaCl 0.05 M

Mercaptoetanol 0.008 M

El método está basado en la extracción fenólica de ácidos ribonucleicos, seguida por una precipitación con etanol y la recuperación del ARNt por medio de una precipitación diferencial con isopropanol, como se describe a continuación (modificación al método de Zubay, 1962):

El proceso se lleva a cabo a 4°C. Se licuan 100g de germen de trigo comercial y sin tostar con 500 ml de solución de extracción, se licua 4 veces en una licuadora con una duración de 30 segundos cada vez. El licuado se centrifuga a 14,360xg durante 20 minutos y el sobrenadante que se obtiene se filtra a través de una doble capa de gasa para separar los lípidos.

El filtrado se extrae con un volumen de fenol saturado con agua, agitando vigorosamente durante 15 minutos. Se centrifuga para separar las dos fases a 15,540xg durante 20 minutos, la fase acuosa se recupera por aspersion y se extrae nuevamente con 0.5 volúmenes de fenol saturado con agua, se agita durante 5 minutos y se centrifuga como se indicó anteriormente.

La fase acuosa que se obtiene se extrae por tercera vez con 0.33 volúmenes de fenol-EDTA, agitando durante 5 minutos. Se centrifuga a 19,000 xg durante 20 minutos y se colecta la fase superior. A la última fase acuosa, se le ajusta la concentración de KOAc a 0.5 M y se adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto frío. El ARN precipita durante 24 hrs.

La recuperación del ARN se logra centrifugando a 16,600 xg, durante 25 minutos. El sedimento se disuelve en 340 ml de NaOAc 0.3 M pH 7 y se lleva a cabo una precipitación diferencial adicionando 0.54 volúmenes de isopropanol gota a gota y agitando continuamente a 4°C. Terminada la adición se calienta la mezcla durante 2 minutos a 20°C y el precipitado se separa centrifugando a 310 xg durante 6 minutos. El sobrenadante contiene el ARNt que es más termoestable. Este se precipita cuando se adicionan a la mezcla 0.44 volúmenes de isopropanol, gota a gota y con agitación continua. Al terminar la adición se continua agitando durante una hora más para lograr la mayor precipitación del ARNt.

El ARNt se recupera centrifugando a 15,300 xg durante 12 minutos. El sedimento se disuelve en 4 ml de agua y se dializa durante 4 hrs. contra agua desionizada, se mantiene estable almacenado a -20°C.

T a b l a 1

Condiciones óptimas de la reacción de aminoacilación

Componente	Concentración
^3H L-metionina ó ^3H L-leucina (15 Ci/m mola)	25 ó 75 μ Ci/ml
Mg (OAc) ₂	10 mM
tris/acetato pH 8	15 mM
KCl	70 mM
ATP	1.33 mM
creatina cinasa	53 μ g/ml
fosfocreatina	10.6 mM
ditiotreitól	3 mM
ARNt de germen de trigo	1 mg/ml
aminoacil-ARNt sintetasas de <u>E.coli</u>	200-250 μ g/ml

Los ensayos se realizaron con aminoacil-ARNt sintetasas de E.coli y ARNt de germen de trigo, la mezcla de reacción tenía un volumen final de 0.1 ml.

C. Determinación de la actividad de las aminoacil-ARNt sintetetasas.

Método modificado de Mans R.J. & Novelli G.D. (1961).

La actividad enzimática de las aminoacil-ARNt sintetetasas purificadas (ver inciso c de esta misma sección), se determina por su capacidad para catalizar la formación de los aminoacil-ARNt's. Las condiciones de la reacción son las siguientes: los reactivos se mezclan en frío adicionándolos en el orden indicado en la tabla 1. La reacción se inicia al adicionar las aminoacil-ARNt sintetetasas y se incuba a 20°C durante 25 minutos. La reacción se detiene al adicionar 5 ml TCA al 5% frío.

El aminoacil-ARNt formado se determina por la cantidad de aminoácido radiactivo insoluble en TCA al 5% frío, que es retenido en filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman. Los filtros se lavan con TCA al 5%, se secan durante 30 minutos y se cuentan en 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno-PRO-POPOP). Las cuentas por minutos (cpm) se determinan en una espectrofotómetro de centelleo líquido.

La optimización de las condiciones para la reacción de aminoacilación con ³H - metionina, al igual que las condiciones usadas para estudiar el efecto de las poliaminas en esta reacción, se describen en la sección de resultados.

D. Preparación en gran escala del ^3H -metionil-ácido ribonucleico de transferencia de iniciación (^3H -met-ARNtⁱ).

Las condiciones para la formación de ^3H met-ARNtⁱ, fueron las mismas que se indican en la tabla 1. En este caso el volumen de la mezcla de reacción es de 4 ml. Se incuba a 20°C, durante 25 minutos y a continuación se coloca en hielo y se adicionan 0.5 ml de metionina fría 0.01M. La mezcla se aplica sobre una columna de DEAE-celulosa de 4.7 x 0.7 cm de diámetro, equilibrada previamente con una solución que contiene: KCl 0.5 M y KOAc 0.05 M pH 5. La muestra se eluye con esta misma solución y se descartan los primeros 6 ml. Se aplica KCl 0.25 M y KOAc 0.05 M pH 5 y se descartan 8 ml. finalmente el aminoacil-ARNt se eluye con KCl 1M, KOAc 0.05 M, colectando 8 ml. Para precipitar al ^3H -met-ARNtⁱ se adicionan a esta última fracción 2.5 volúmenes de etanol frío y se mantiene 24 hrs. a -20°C. El precipitado se recupera centrifugando a 25,300 xg, durante 10 minutos a 5°C, se lava con etanol al 80% en KOAc 0.05 M y se recupera nuevamente, centrifugando bajo las mismas condiciones. El ^3H -met-ARNtⁱ se disuelve y se dializa durante 3 hrs. contra agua.

Para calcular la concentración del ^3H -met-ARNtⁱ, se toma una alícuota del dializado y se diluye (1:50) con agua desionizada para determinar la absorbancia a 260 nm. Después se adiciona TCA (5%), se filtra en filtros de fibra de vidrio y se determina la radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido con una eficiencia de conteo para ^3H de 54%. Se calcula

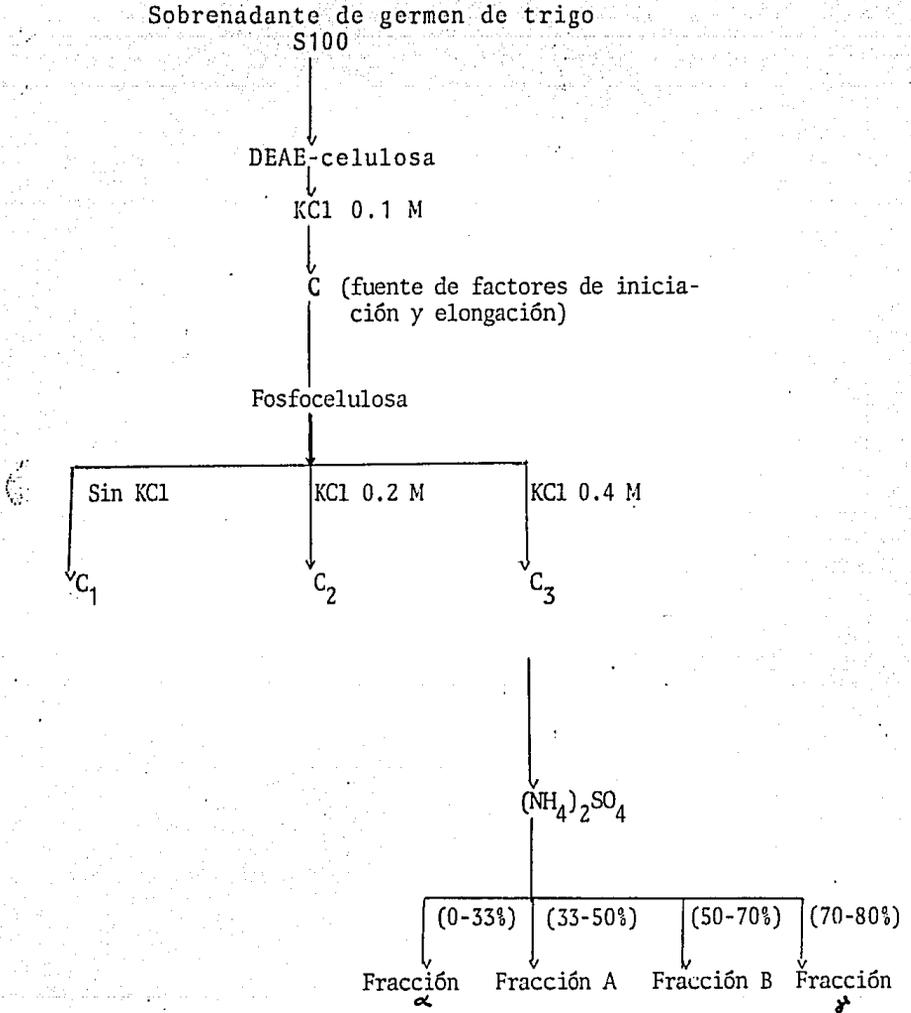


Figura 4. Fraccionamiento de un sobrenadante (S100) de germen de trigo.

lan las cpm/ μg de ARNt, dividiendo las cpm totales entre la cantidad de ARNt, usar la relación del inciso F.

E. Preparación del factor de iniciación de germen de trigo que une al met-ARNtⁱ y al GTP.

El método que se siguió fue el reportado por Giesen et al. (1976), el cual se resume en la figura 4.

a. Extracción de un sobrenadante de 100,000 x g (S100) y ribosomas de germen de trigo comercial.

Soluciones:

- 1.- CaCl_2 0.002M, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 0.001M, KCl 0.09M, KHCO_3 0.01M.
- 2.- Tris/acetato 0.002M/ pH 7.4, KCl 0.02 M, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 0.001M, mercaptoetanol 0.003 M.
- 3.- Es la solución 2 con 20% de glicerol.
- 4.- Tris/acetato 0.001M/ pH 7.0, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 0.002M, KCl 0.1 M mercaptoetanol 0.004 M.
- 5.- Tris/acetato de 0.01 M pH 7.6, 30% de glicerol, mercaptoetanol 0.004 M.
- 6.- Tris/acetato 0.01M pH 7.6, KCl 0.2 M, 10% de glicerol mercaptoetanol 0.004 M.

7.- Tris/acetato 0.01 M pH 7.6, KCl 0.4M, 10% de glicerol, mercaptoetanol 0.004 M.

Se suspenden 69.5g de germen de trigo en 230 ml de solución 1 durante 5 minutos en un vaso de licuadora enfriado previamente. Se homogenizan a 4°C, licuando 4 veces durante 15 segundos. El proceso se repite con otros 69.5 g de germen de trigo. Los homogenados se filtran por gasa, se mezclan y centrifugan a 14,300 xg durante 20 minutos. El sobrenadante que se obtiene se filtra a través de una doble capa de gasa, se le adicionan 0.01 volúmenes de $Mg(OAc)_2$ 0.1 M y 0.025 volúmenes de tris/acetato 1M, pH 7.6, y se centrifuga a 15,300 xg durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se filtra a través de gasa y se centrifuga a 78,480 xg durante 3.30 hrs. Se obtienen 3 capas: la inferior o sedimento que contiene los ribosomas, la intermedia que contiene las proteínas solubles del citoplasma y la capa superior donde se encuentran los lípidos. Se colecta la capa intermedia, se le adiciona ditiotreitól, en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0.001M y se almacena a -20°C.

El sedimento que contiene los ribosomas, se resuspende en solución 2, y se centrifuga a 105,000 xg, durante 3.30 hrs. El sedimento se vuelve a resuspender en solución 3 y se centrifuga a 15,300 xg, durante 10 minutos. El sobrenadante con los ribosomas se almacena a -70°C.

b. Preparación de la fracción C de germen de trigo.

Se aplican 80 ml de S100 de germen de trigo en una columna de DEAE-celulosa (Sigma) de 20 cm x 0.9 cm, previamente equilibrada con una solución 4. Se descartan los primeros 8 ml y se colectan los siguientes 81 ml que corresponden a la fracción C. El procedimiento se realiza por duplicado para obtener un volumen final de 162 ml de la fracción C.

c. Preparación de la fracción C₃.

Se dializan 162 ml de la fracción C contra una solución 5 sin glicerol. A una columna de fosfocelulosa (F₁₁ Whatman) de 11 x 2.2 cm previamente equilibrada con solución 5 se le aplica la muestra dializada. Los primeros 22 ml del eluido se descartan y se colectan los siguientes 198 ml como fracción C₁. A continuación se aplica a la columna la solución 6, descartando los primeros 22 ml y se colectan los siguientes 80 ml como fracción C₂. Se aplica solución 7 a la columna y se descartan 18 ml, se colectan 70 ml como fracción C₃. La fracción C₃ sirve como fuente de factores de iniciación. Se almacena a -70°C una vez ajustado el pH a 7.6 con una solución de NH₄ OH 0.01 M.

d. Fraccionamiento de C_3 con sulfato de amonio para separar α , A, B y δ .

El método para separar los factores, está basado en la precipitación por salado con sulfato de amonio (Giesen, et al., 1976) que se lleva a cabo a 4°C de la siguiente manera:

A la fracción C_3 , que se obtiene de la columna de fosfocelulosa, se le adiciona sulfato de amonio en cantidad suficiente para tener una saturación de 33%. La adición es lenta y con agitación. El precipitado resultante (fracción α) se recupera centrifugando a 25,300 xg, durante 15 minutos. El sobrenadante se ajusta a pH 7.6, se adiciona sulfato de amonio para lograr una saturación de 50%, se agita 5 minutos más y se centrifuga 20 minutos, como se indicó anteriormente, para recuperar el precipitado (fracción A). Nuevamente el sobrenadante resultante se ajusta a pH 7.6, se adiciona gota a gota una solución de sulfato de amonio saturada que contiene tris/acetato 0.01 M pH 7.6 y mercaptoetanol 0.004 M, hasta tener una saturación de sulfato de amonio de 70%. Se continua agitando durante 30 minutos más y el precipitado (fracción B) se recupera centrifugando como se indicó. Finalmente el sobrenadante se ajusta a pH 7.6, se lleva a una saturación de 80% con sulfato de amonio y el precipitado (fracción δ), se recupera por centrifugación.

Cada uno de los precipitados se disuelven en KOAc 0.01 con 10% de glicerol y ditiotreitól 0.004 M y se dializan contra KOAc 0.1 M con mercaptoetanol 0.004 M. A continuación se les adicionan 1/3 de volumen de KAc 0.1 M con 50% de glicerol ajust-

tando la concentración de ditioneitol a 0.004 M. Si se forma algún residuo insoluble, se separa centrifugando 11,400 xg, durante 10 minutos. Los sobrenadantes se almacenan a -70°C.

F. Relaciones utilizadas para cuantificar la concentración del ácido ribonucléico (ARN) y de las proteínas.

Para cuantificar el ARNt libre y el aminoacil-ARNt, se usó la siguiente relación, (Giesen, et al., 1976):

$$1 \text{ mg /ml de ARN} = 20 \text{ D.O. } 260 \text{ nm}$$

La relación para cuantificar proteínas, fué la siguiente:

$$\text{mg/ ml de proteína} = 1.48 \times \text{D.O. } 280 \text{ nm} - 0.74 \text{ D.O. } 260 \text{ n,}$$

G. Condiciones para formar el complejo ternario de iniciación.

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, (Giesen, et al., 1976):

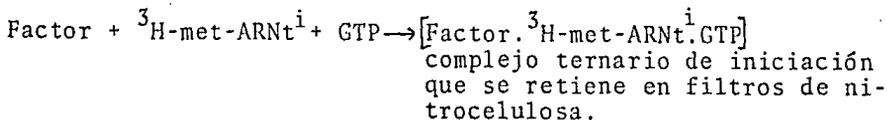
Solución amortiguadora 8 - Tris/acetato 0.03 M pH 7.6,
Mg (OAc)₂ 0.005 M, KAc 0.07 M,
KCl 0.005 M.

Del ³H-met-ARNtⁱ (preparado como se indica en la sección D)
50 µg; L-metionina 0.002 M; tris/acetato 0.05 M; pH 8; GTP
0.0001 M; ditioneitol 0.0045 M; Mg(OAc)₂ 0.0022 M; KCl 0.0085M
KOAc 0.1 M; fosfoenol piruvato-cinasa 6.3 µg; fosfoenol piruvato de potasio 250 µg y la fracción de germen de trigo que se

indica para cada caso en la sección de resultados. El volumen final fué de 170 μ l la mezcla se incubó a 20°C durante 10 minutos. La reacción se detiene diluyendo la mezcla con 5 ml de solución amortiguadora 8. Siguiendo el método reportado por Niremberg & Leder (1964) el complejo ternario iniciador se retiene en filtros de nitrocelulosa (0.45 μ). Los filtros se lavan tres veces con 5 ml de la misma solución amortiguadora, se secan durante 30 minutos bajo lámpara de infrarojo y se determina la radiactividad en viales con 5 ml de líquido de centelleo (PPO-POPOP-Tolueno) en un espectrofotómetro de centelleo líquido, con una eficiencia de conteo para ^3H de 54%.

Para determinar los requerimientos de cada fracción de germen de trigo en la formación de complejo ternario, se utilizan las condiciones que se indicarán en la sección de resultados.

Reacción para formar el complejo ternario de iniciación:



La incorporación del $^3\text{H-met-ARNt}^i$ en el complejo ternario de iniciación en presencia de las fracciones A o B de germen de trigo es aproximadamente 30 000 cpm/mg de proteína. Cuando la fracción proteínica no está presente en el medio de reacción o cuando se sustituye por otra proteína como albúmina de suero bovino, la incorporación es de 100 cpm/mg de proteína. La dependencia de la reacción por el GTP se presenta en la sección de resultados.

RESULTADOS

I. Efecto de las poliaminas en la reacción de aminoacilación.

A. Purificación de las aminoacil-ARNt sintetetasas y del ácido ribonucléico de transferencia.

Para realizar el presente trabajo se formó el metionil-ARNtⁱ (para iniciación), utilizando un sistema de aminoacilación heterólogo, compuesto por aminoacil-ARNt sintetetasas de E.coli y ARNt de germen de trigo. Dichas enzimas reconocen la especie de ARNtⁱ para la iniciación de las cadenas polipeptídicas y no la especie ARNt^{met} para posiciones internas en las cadenas polipeptídicas de eucariontes, como ha sido demostrado por: Lucas-Lenard & (1971); Hasel-Korn & Rotman-Denes (1973) y Gosh, et al. (1974). Las aminoacil ARNt sintetetasas fueron purificadas a partir de un sobrenadante de 100,000 xg de E.coli el cual se fraccionó a través de una columna de DEAE-celulosa con una solución amortiguadora de fosfatos de baja molaridad (0.02 M, y un pH 7.5). Estas condiciones permiten que las aminoacil-ARNt sintetetasas se fijen a la columna separándolas de un gran número de proteínas del homogenado. Posteriormente incrementado la molaridad de fosfato (0.25 M) y acidificando ligeramente la solución (pH 6.5), se logra eluir el conjunto de aminoacil-ARNt sintetetasas, que incluye las sintetetasas para metionina y leucina, requeridas para este estudio. En la figura 5 se muestra su perfil de elución. La mayor actividad de dichas enzimas fué detectada en las fracciones 52-54, por

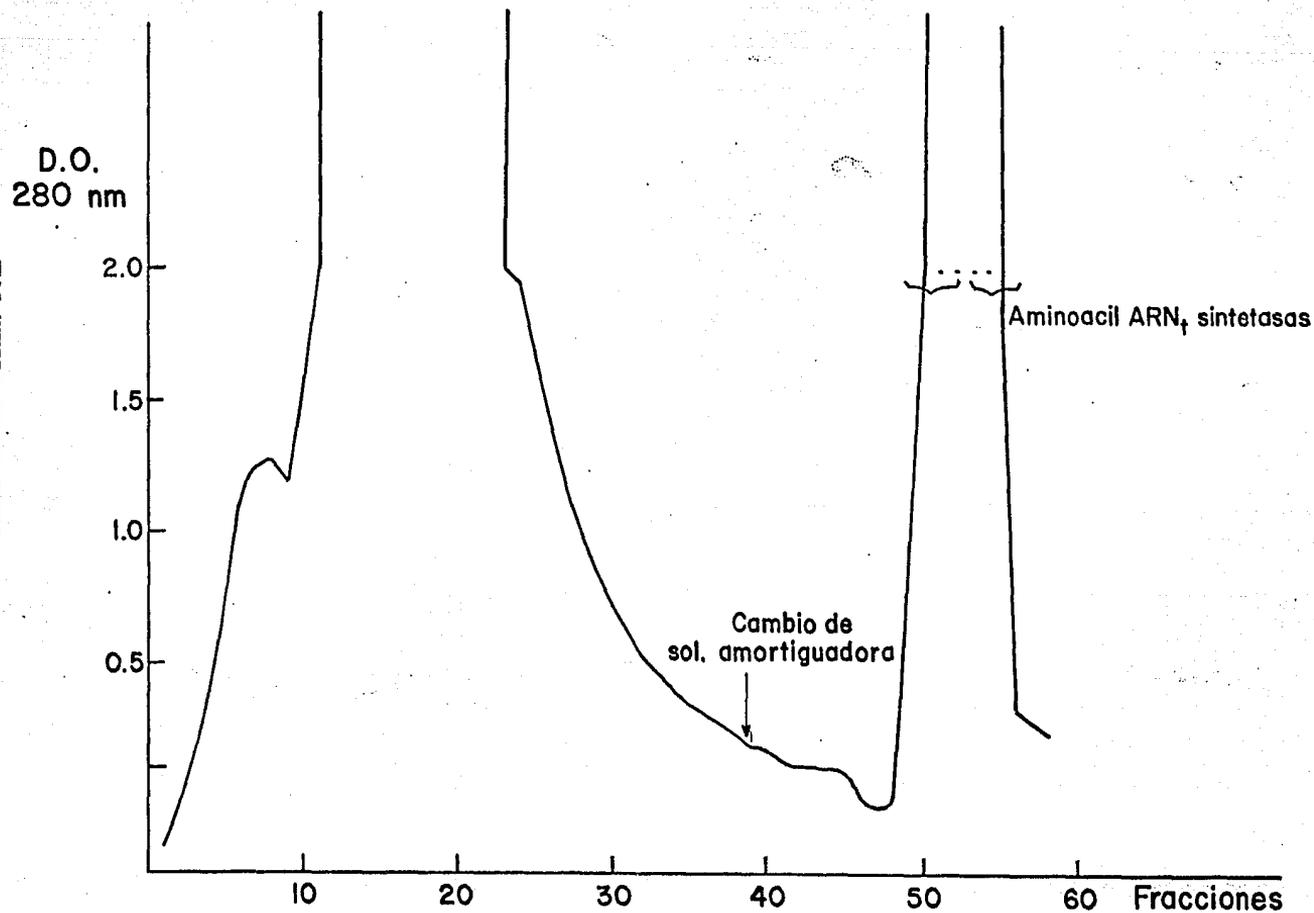


Figura 5. Perfil de elución de las aminoacil ARN_t sintetisas en una columna de DEAE-celulosa (16.5 x 1.5 cm).

lo que fueron estas las que se concentraron y se utilizaron en los estudios de la reacción de aminoacilación, como se indica en materiales y métodos.

Para el ARN_t, purificado a partir de un homogeneizado de germen de trigo (ver materiales y métodos), se obtuvo un rendimiento de 240 ± 50 $\mu\text{g/g}$ de germen. Este resultado fue reproducible en por lo menos cinco extracciones y se encuentra dentro del rango de los rendimientos generalmente reportados (Rogg, 1969 y Robinson & Zimmerman 1971).

B. Determinación de las condiciones óptimas para la reacción de aminoacilación.

En la reacción para formar el ^3H metionil-ARN_tⁱ, se optimizaron las siguientes condiciones: la concentración de enzima, la cantidad de aminoácido radiactivo, el tiempo de incubación y las concentraciones de Mg^{++} y ATP requeridas para dicha reacción. Otras condiciones como son: pH, las concentraciones de fosfoenol piruvato cinasa, fosfoenol piruvato de potasio, ditionitrol y ARN_t, habían sido determinados anteriormente (Giesen et al., 1976). En la sección de materiales y métodos se muestra la metodología y las condiciones finales determinadas para esta reacción de aminoacilación.

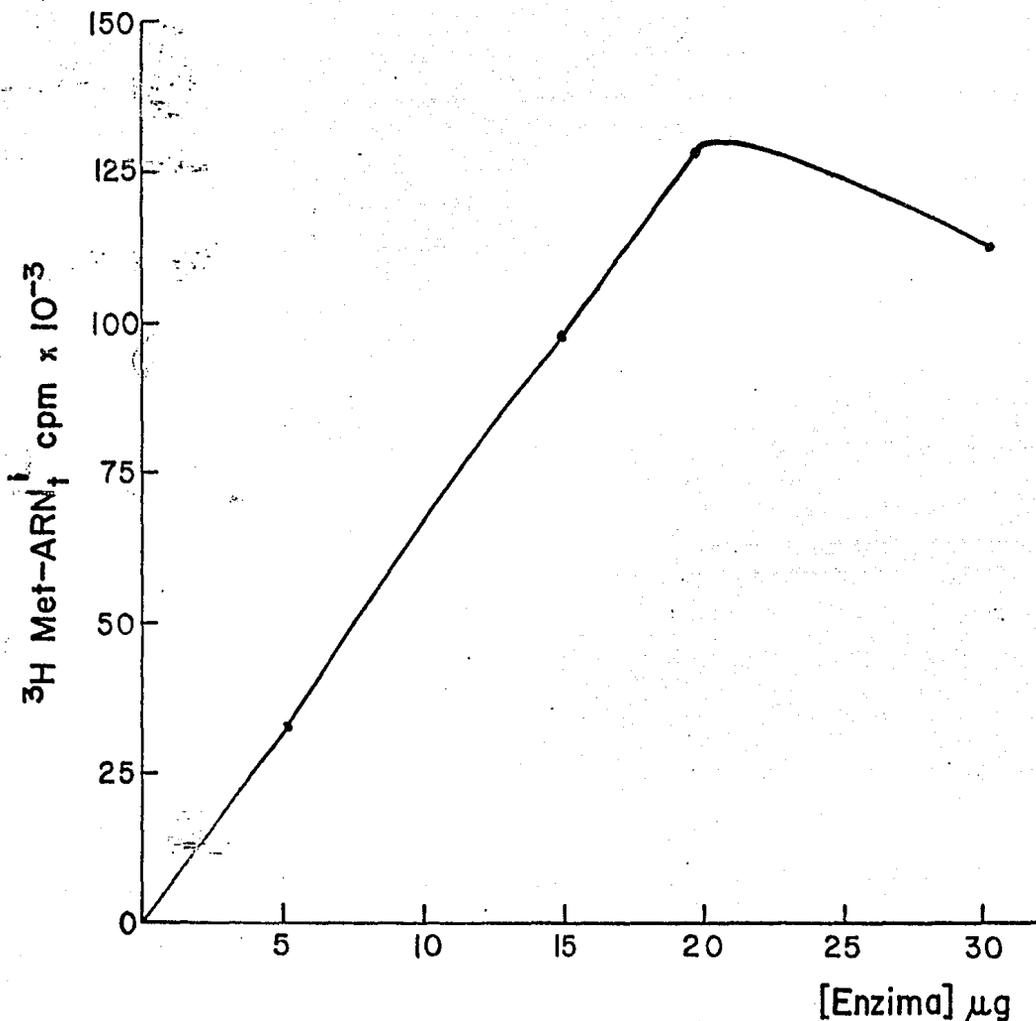


Figura 6. Variación de la concentración de las aminoacil-ARNt sintetetas de *E. coli* y su efecto en la formación de ^3H -met-ARNt¹. Las condiciones de la reacción se describen en la tabla 1 de la sección de materiales y métodos. Se adicionaron cantidades variables de enzima, hasta 30 μg en un volumen de reacción de 100 μl .

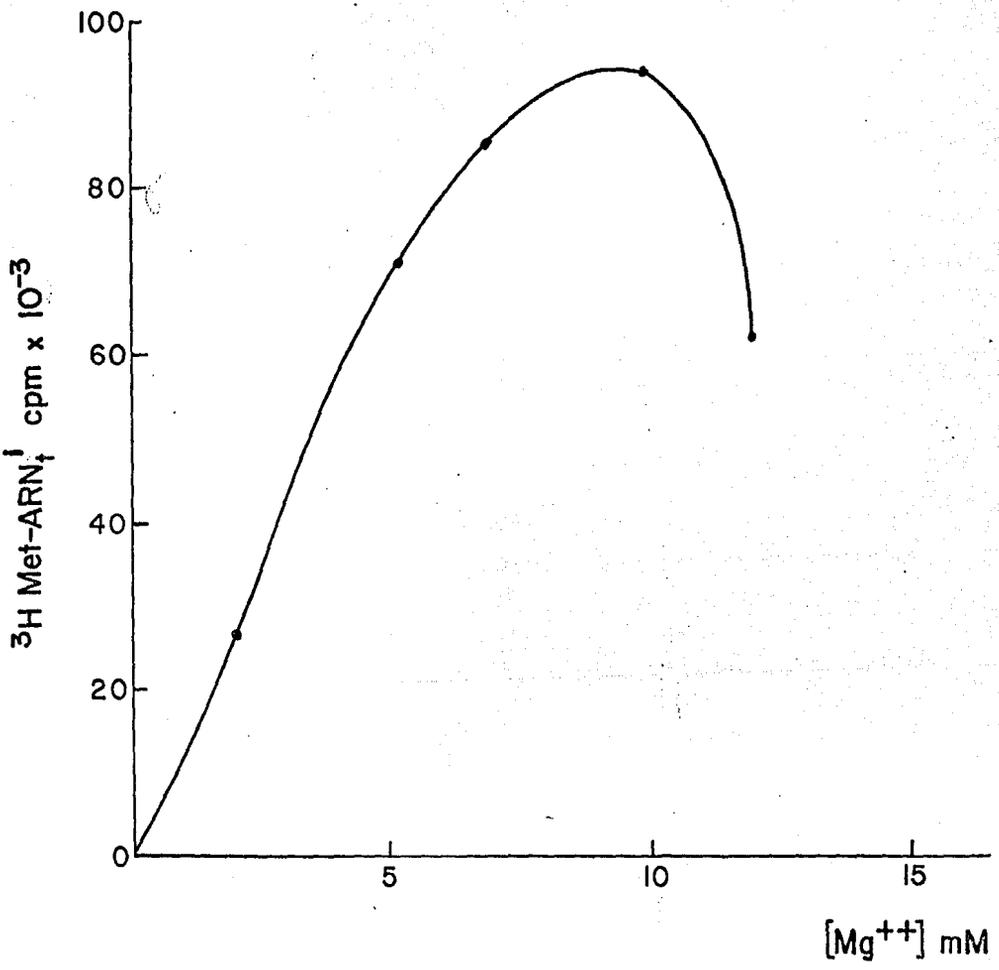


Figura 7. Determinación de la concentración de magnesio óptimo. La concentración de magnesio se varió en los ensayos para formar ^3H -met-ARNt, sin modificar las otras condiciones descritas en la tabla 1.

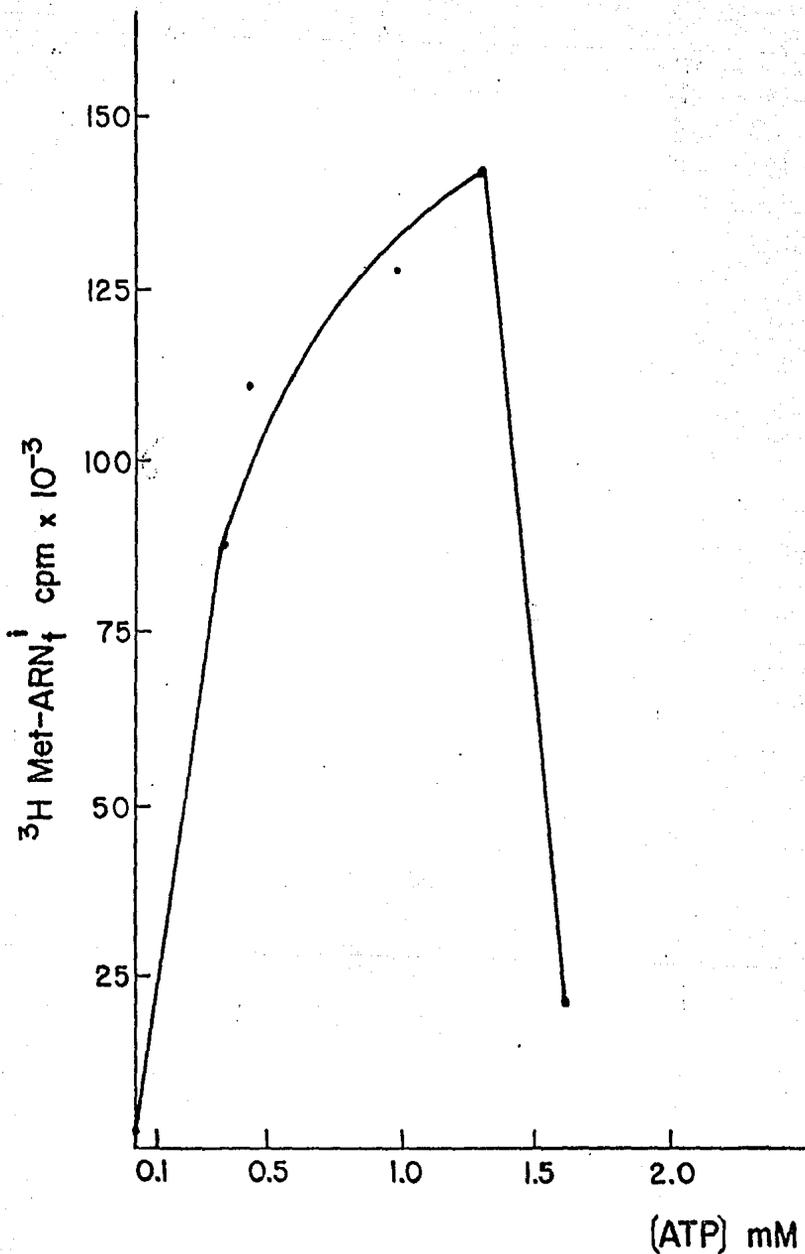


Figura 8. Determinación de la concentración de ATP óptima. La concentración de ATP se varió en los ensayos para formar ^3H -met-ARN i . La concentración de magnesio fue de 7 mM y las otras condiciones de la reacción no se modificaron.

En la figura 6 se observa que a medida que la cantidad de enzima se incrementa en el medio de reacción, la cantidad de radiactividad incorporada también aumenta y alcanza un nivel máximo a una concentración de enzima de 200-250 $\mu\text{g/ml}$. El valor máximo de radiactividad como ^3H -met incorporada al ^3H -met-ARnt fue de aproximadamente 125,000 cpm, lo que equivale a 7 pmoles. Las aminoacil-ARnt sintetasas se mantienen estables a -20°C durante aproximadamente un año, después del cual pierden un 20-30% de su actividad. Debido a ello es necesario ajustar periódicamente la concentración óptima para la reacción de aminoacilación. También se puede observar que la formación de ^3H -met-ARntⁱ empieza a decaer a concentraciones de enzimas mayores que el óptimo.

El tiempo óptimo de incubación para la reacción de aminoacilación con metionina fue de 25 min y la concentración de ^3H -metionina fue de 5 μM (datos no mostrados).

En las figuras 7 y 8 se muestra que las concentraciones óptimas de Mg^{++} y ATP son de 7-10 mM y de 1.33 mM respectivamente. Es un hecho conocido que la relación entre las concentraciones de Mg^{++} y ATP es uno de los factores que altera de manera importante la reacción de aminoacilación. Con una relación adecuada de estos componentes se puede evitar que se formen los complejos inactivos: MgATP^{-2} y MgATP_2^{-6} , como lo indican en sus publicaciones Mohan & Rechnitz (1974) y Franco

& Huberman (1975). Por esta razón en la reacción de aminoacilación con metionina se probaron varias relaciones de $(Mg^{++}) / (ATP)$ resultando ser las mejores de 5.8 a 7.5 (datos no mostrados).

Estas relaciones coinciden con las concentraciones óptimas de Mg^{++} y ATP determinadas previamente, de tal manera que, en los ensayos que se describen a continuación se mantuvieron esas concentraciones. Por otro lado, en la figura 8, que muestra la dependencia de la formación del 3H -met-ARNt a distintas concentraciones de ATP, se puede observar una caída drástica después de alcanzar la concentración óptima. Este efecto fue reproducible en por lo menos 6 ensayos y también ha sido observado en la aminoacilación con metionina en un sistema de mamíferos, (Vargas R: Román R. y Castañeda M., datos no publicados).

C. Efecto de las poliaminas en la reacción de aminoacilación.

Utilizando las condiciones óptimas observadas para la formación del met-ARNtⁱ, se realizaron los ensayos para determinar si en la reacción de aminoacilación existía algún efecto causado por las poliaminas.

Se sabe que las poliaminas sustituyen parcialmente al magnesio que se requiere en la reacción de aminoacilación y que son ca-

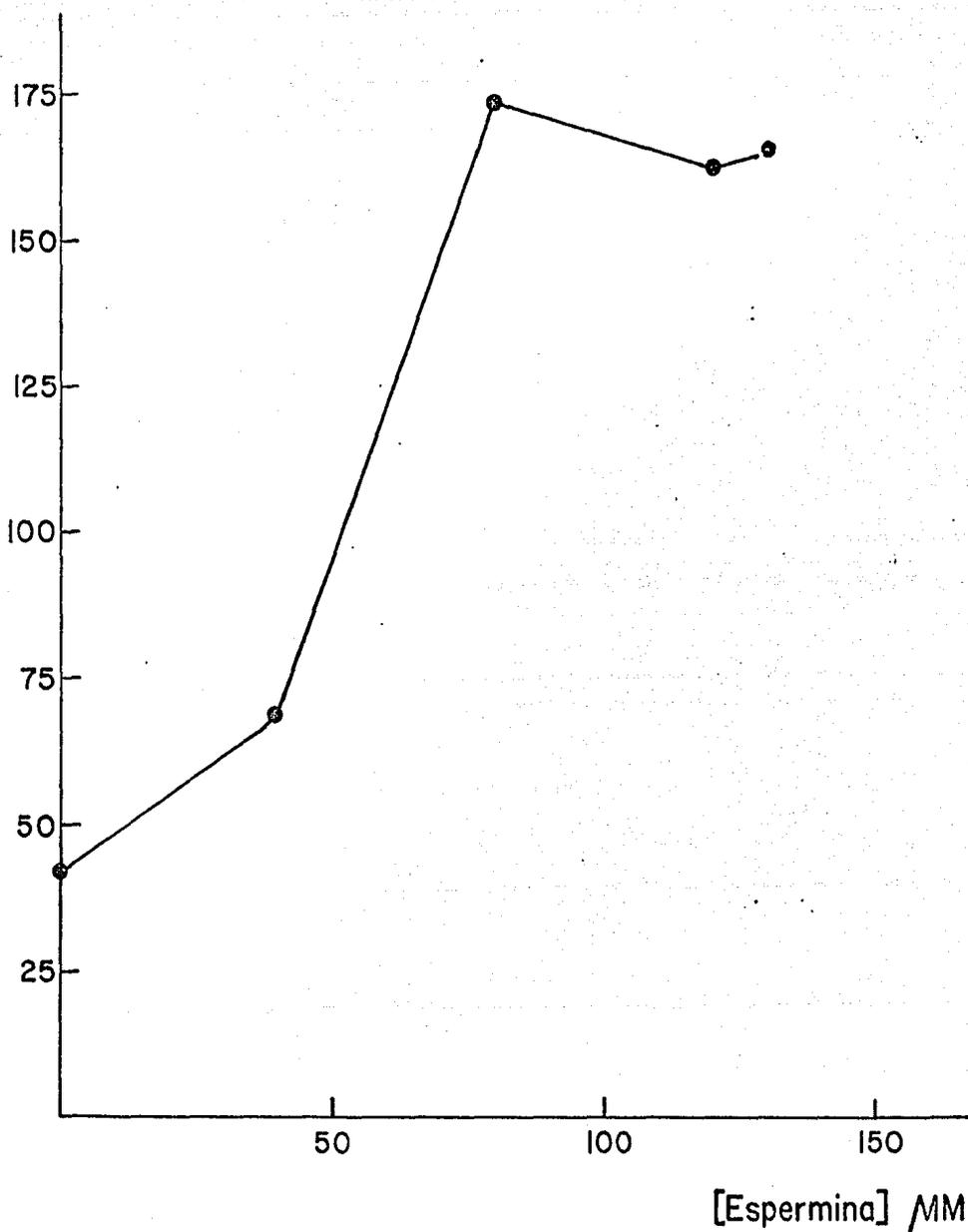


Figura 9. Determinación de la concentración de espermina óptima. La reacción de aminoacilación del ARNt de germen de trigo con ^3H -met, se llevó a cabo en presencia de concentraciones variables de espermina, la concentración de magnesio utilizada fue de 2 mM y las concentraciones del resto de los componentes de la reacción fueron las mismas que se indican en la tabla 1.

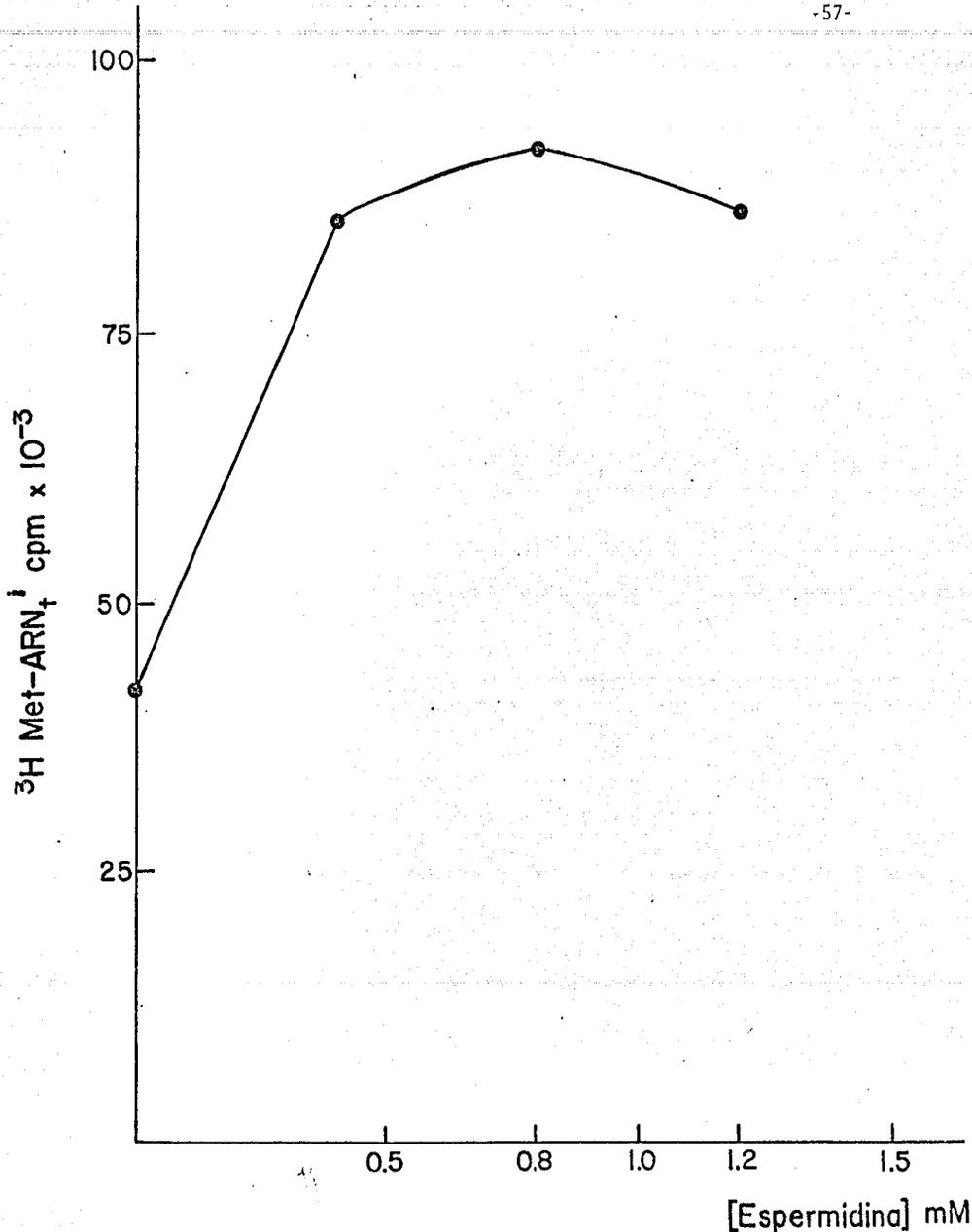


Figura 10. Determinación de la concentración de espermidina óptima. La reacción de aminoacilación del ARNt de germen de trigo con ^3H -met se llevó a cabo en presencia de concentraciones variables de espermidina y con una concentración de magnesio de 2 mM, las demás condiciones fueron las mismas que se indican en la tabla 1.

paces de estimular dicha reacción. La estimulación puede deberse a que las poliaminas alteran la conformación del ARNt (referencias en el inciso C de la introducción).

En el presente estudio era necesario determinar las concentraciones óptimas de espermina y de espermidina en la reacción para aminoacilar el ARNt de germen de trigo con ^3H -met, para lo cual la concentración de magnesio se disminuyó a 2 mM y las otras condiciones de la reacción no se alteraron. Se utilizó esta baja concentración de magnesio tomando como base los trabajos reportados por: Takeda & Igarashi (1969) e Igarashi, et al., (1971), quienes demostraron que las poliaminas estimulan la reacción de aminoacilación en E.coli cuando la concentración de magnesio es de 2 mM.

Otros autores como Konecki et al. (1975) y posteriormente Igarashi et al. (1978) demostraron que las poliaminas estimulan la síntesis de los polipéptidos en sistemas libres de células de eucariontes, siempre y cuando la concentración de magnesio sea menor al nivel óptimo en ausencia de ellas. Estos últimos sistemas dependen de la reacción de aminoacilación.

Los resultados se presentan en las figuras 9 y 10, donde se observa que la incorporación de ^3H -met en ^3H -met-ARNtⁱ se incrementa al aumentar la concentración de poliamina, obt-

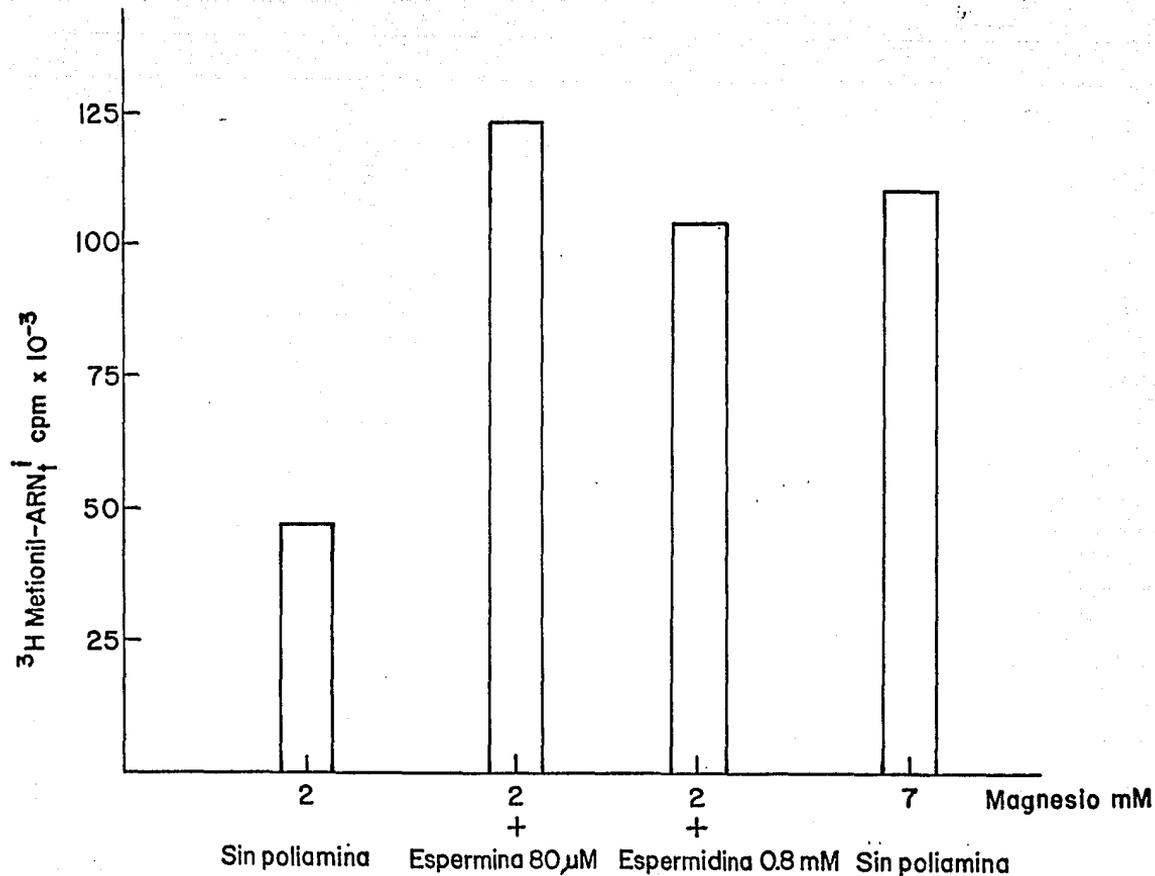


Figura 11. Efecto de las poliaminas sobre la formación del ^3H -met-ARNt¹. Los ensayos se realizaron como se indica en métodos, excepto que en este caso se formó el ^3H -met-ARNt en presencia de: magnesio 2 mM; espermina 80 μM + magnesio 2 mM; espermidina 0.8 mM + magnesio 2 mM y con magnesio 7 mM.

niéndose una máxima incorporación a una concentración de espermina de 80 μM y de espermidina de 0.8 mM respectivamente (promedio de 6 ensayos). Los resultados logrados en presencia de cada poliamina en la reacción de aminoacilación, presentan diferencia en cuanto: i) al incremento total alcanzado siendo mayor con espermina; ii) la concentración de cada poliamina necesaria para obtener dicho incremento (espermina 80 μM , espermidina 0.8 mM) y iii) la cinética que describen, ya que la curva con espermina presenta un período de estimulación bajo, a menor concentración de espermina, aumentando considerablemente a partir de 50 μM , mientras que la curva descrita por espermidina no presenta este efecto.

Los datos de la figura 11, muestran que en presencia de niveles saturantes de espermina o de espermidina y una concentración de magnesio de 2 mM, se logra una estimulación en la formación de ^3H -metionil-ARNtⁱ de un 260% y 220% respectivamente. Estos porcentajes se calcularon tomando como base la radiactividad obtenida en ^3H -met ARNt en presencia de magnesio 2 mM sin poliamina. La cantidad total de ^3H -met-ARNt formado en la reacción que se lleva a cabo a baja concentración de magnesio y con poliaminas, resultó similar a la formada con niveles óptimos de magnesio (7 mM) comunmente usados (sin poliamina). No obstante cuando se realizaron los ensayos en presencia de poliaminas y de concentraciones de magnesio óptimas o inclusive más altas, no se lograron resultados reproducibles (datos no mostrados).

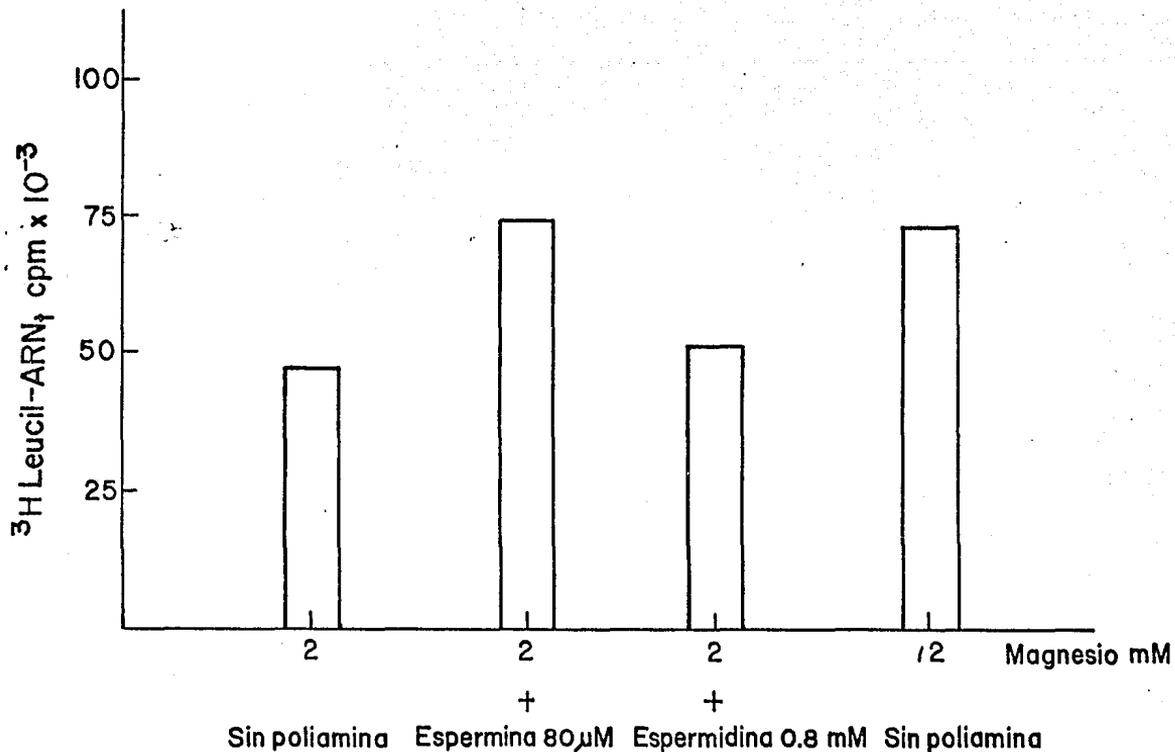


Figura 12. Efecto de las poliaminas sobre la formación de $^3\text{H-leu-ARNt}$. Los ensayos se realizaron como se indica en métodos, excepto que en este caso se formó el $^3\text{H-leu-ARNt}$ en presencia de: magnesio 2 mM, espermina 80 μM + magnesio 2 mM, espermidina 0.8 mM + magnesio 2 mM y con magnesio 12 mM.

Para saber si el efecto de las poliaminas en la reacción de aminoacilación era específico, se midió esta con otro aminoácido. Se realizaron los ensayos de la aminoacilación con ^3H -leucina, usando las condiciones previamente establecidas para metionina. En la reacción en presencia de las poliaminas la concentración de magnesio también fue de 2 mM.

El efecto de las poliaminas sobre la aminoacilación con leucina se muestra en la figura 12, donde se puede apreciar que espermina 80 μM , también estimula la formación de ^3H -leucil-ARnt (160%), sin embargo con espermidina 0.8 mM casi no hay estimulación (108%) comparadas con la reacción en presencia de magnesio 2 mM sin poliaminas. La estimulación obtenida en presencia de espermina fue nuevamente similar a la incorporación obtenida en condiciones de magnesio óptimo sin poliaminas, tal como se describió anteriormente para la aminoacilación con metionina. La concentración óptima de magnesio para la aminoacilación con leucina fue de 12 mM.

II. Influencia de las poliaminas en la formación del complejo ternario de iniciación.

A. Actividad específica de las fracciones α , A, B y δ aisladas de germen de trigo y efecto de las poliaminas en la formación previa del metionil-ARNtⁱ.

Una vez que se demostró que las poliaminas estimulaban la reacción de aminoacilación con una concentración de magnesio baja, el siguiente paso se encaminó a estudiar si en la primera reacción de la iniciación de síntesis de proteínas, esto es, la formación del complejo ternario de iniciación: [Factor.met-ARNtⁱ.GTP] el ³H-met-ARNtⁱ, formado en presencia de poliaminas, resultaba más activo que el ³H-met-ARNtⁱ formado únicamente en presencia de una concentración óptima de magnesio. La proposición anterior se apoyó en el hecho de que las poliaminas se unen al ARNt (Quingley, et al 1978; Bolton & Kearns 1977), por lo que durante la reacción de aminoacilación podrían quedar unidas al met-ARNtⁱ, afectando su conformación y haciéndole más fácil su interacción con los otros componentes que intervienen en la iniciación de la síntesis de proteínas.

Para llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación, fue necesario aislar el ³H-met-ARNtⁱ de la mezcla de reacción. Con este fin se aumentó el volumen de la mezcla

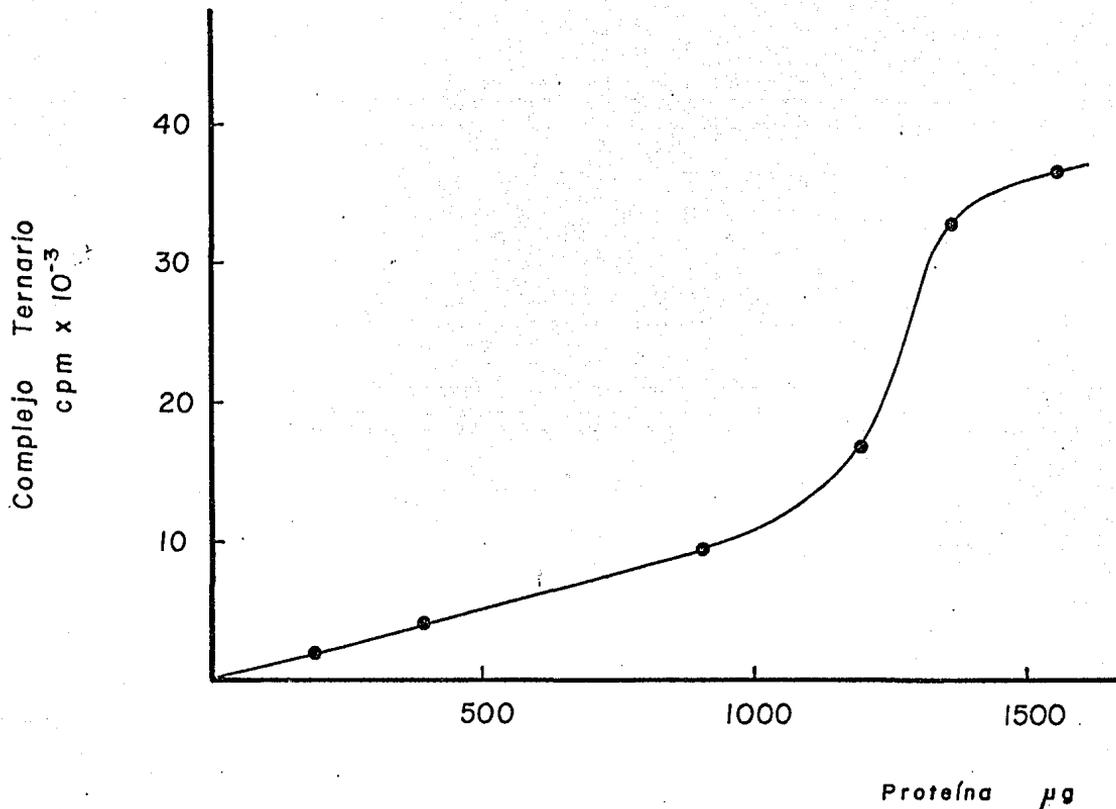


Figura 13. El complejo ternario de iniciación (factor ³H-met-ARNT. GDP), se formó en presencia de cantidades variables de la fracción B. Las condiciones de la reacción se indican en el inciso E de materiales y métodos.

T a b l a 2

Especificidad de formación del complejo ternario de iniciación.

Fracción	cpm/ mg de proteína	
	leu- ³ H-ARnt	met- ³ H-ARnt ⁱ
∞	nd	4 969
A	882	34 700
B	3 445	22 063
γ	228	11 465

La formación del complejo ternario fue hecha con ³H-leu-ARnt y ³H-met-ARntⁱ en las condiciones que se indican en el inciso G de materiales y métodos con las fracciones de germen de trigo que se indican. Los resultados se dan como cpm del aminoacil-ARnt respectivo por mg de proteína.
nd = no se determinó.

de reacción a 12 ml y se llevó a cabo en algunos casos con la concentración óptima de magnesio (7-10 mM) y en otros casos con la concentración óptima de espermina (80 mM) y magnesio a 2 mM. Las condiciones para aislar el $^3\text{H-met-ARNt}^i$, se presentan en la sección de materiales y métodos.

Para la formación del complejo ternario de iniciación era necesario purificar el factor proteínico, con actividad para unir específicamente $^3\text{H-met-ARNt}^i$ en una reacción dependiente de GTP. Para obtener este factor, se fraccionó un sobrenadante de 100,000 xg de germen de trigo y después de varios pasos de purificación, se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio, cuatro fracciones proteínicas: α (0-30%); A (30-50%), B (50-72%) y β (72-80%) de saturación con sulfato de amonio. En la figura 13 se muestra un ejemplo de una curva de la formación del complejo ternario de iniciación contra la concentración de la fracción B. Para determinar la concentración saturante de proteína se hicieron curvas similares en cada una de las fracciones (datos no mostrados). Todas las curvas mostraron linealidad a bajas concentraciones, y a altas concentraciones el nivel de incorporación llega a estabilizarse, en términos generales describen una curva de tipo sigmoide. A cada una de las fracciones se les determinó su actividad específica para formar el complejo ternario de iniciación, así como la especificidad para unir otro aminoacil-ARNt. Estos resultados se presentan en la tabla 2, donde puede notarse que

T a b l a 3

Influencia del ^3H -met-ARNtⁱ formado previamente en presencia, o en ausencia de espermina en la formación del complejo ternario de iniciación.

^3H -met-ARNt (formado previamente)	Complejo ternario de iniciación. (actividad específica) cpm/mg
sin espermina	6 363 \pm 175
con espermina 80 μM	7 206 \pm 140

Para formar el complejo ternario de iniciación, la reacción se llevó a cabo en presencia de ^3H -met-ARNtⁱ formado previamente en presencia ó en ausencia de poliamina. La determinación del complejo ternario de iniciación se describe en el inciso G de materiales y métodos. En este caso se usó la fracción B de germen de trigo. Los resultados se dan como cpm de ^3H -met-ARNtⁱ incorporado al complejo ternario por mg de proteína.

las fracciones A y B, son las que presentan mayor actividad específica para unir el $^3\text{H-met-ARNt}^i$ y que unen, por el contrario, al $^3\text{H-leu-ARNt}$ en muy baja proporción. Estos datos indican que el factor que une $^3\text{H-met-ARNt}^i$ precipita en un rango muy amplio de saturación con sulfato de amonio, entre 30 y 72%, sin embargo se decidió seguir haciendo el fraccionamiento de esa manera por los datos que posteriormente se describen. La fracción A presenta mayor actividad específica que B, para unir el met-ARNt^i y menor actividad para unir el leu-ARNt . En los experimentos realizados posteriormente se utilizaron principalmente las fracciones A o B, debido a sus actividades específicas y al mayor rendimiento que se obtuvo de ellas.

Con los $^3\text{H-met-ARNt}^i$ preformados en presencia o ausencia de poliamina y la fracción proteínica B que une el $^3\text{H-met-ARNt}^i$, se midieron los complejos ternarios respectivos. En la tabla 3 se muestran estos resultados (promedio de 5 experimentos). De estos datos se concluye que los $^3\text{H-met-ARNt}^i$ preformados en presencia o ausencia de poliamina se comportan de manera semejante en la reacción para formar el complejo ternario de iniciación: $\{\text{Factor. } ^3\text{H-met-ARNt}^i \cdot \text{GTP}\}$.

Para determinar si las poliaminas de otra manera podían ejercer un efecto en la formación del complejo ternario de iniciación, se decidió adicionarlas al medio de reacción en presencia de las fracciones A ó B. En todos los casos se utilizó

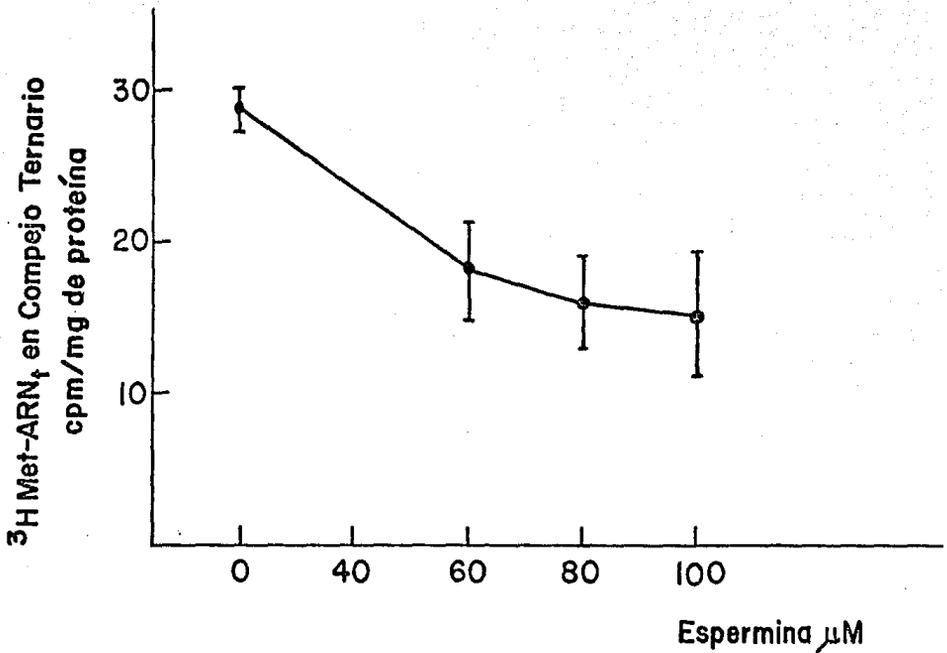


Figura 14. Formación del complejo ternario de iniciación con la fracción A en presencia de espermina. Las condiciones de la reacción se indicaron en la sección de materiales y métodos. En este caso los ensayos se realizaron en presencia de concentraciones variables de espermina.

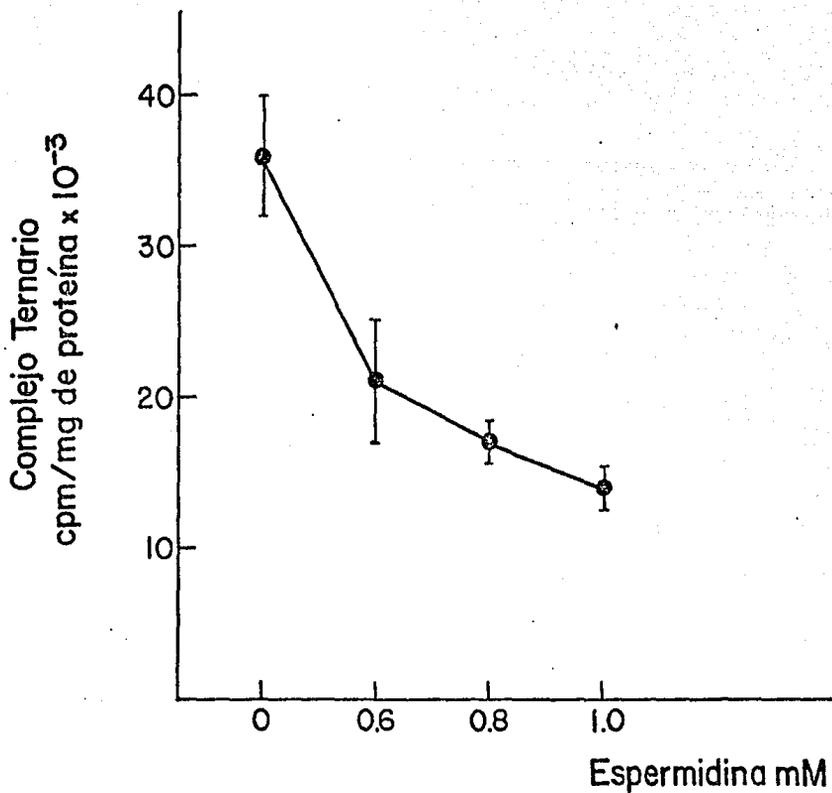


Figura 15. Formación del complejo ternario de iniciación con la fracción A en presencia de espermidina. Las condiciones de la reacción se indicaron en la sección de materiales y métodos. En este caso los ensayos se realizaron en presencia de concentraciones variables de espermidina.

^3H -met-ARNtⁱ, el cual se había aminoacilado unicamente en presencia de magnesio. Los resultados se presentan a continuación.

B. Efecto directo de las poliaminas sobre la formación del complejo ternario de iniciación.

a. Niveles de saturación de poliamina en la reacción del complejo ternario de iniciación.

En la reacción de iniciación mencionada, se determinaron los niveles de saturación de espermina o de espermidina con cada una de las fracciones A y B. Todos los datos que se muestran a continuación son un promedio de 4-6 experimentos. En la figura 14, se describe el efecto de espermina en la formación del complejo ternario de iniciación con la fracción A. Se observa que espermina inhibe la reacción y lo hace en relación a la concentración utilizada, llegando a un máximo de inhibición del 45% a 100 μM de espermina. La Figura 15 muestra exactamente el mismo efecto cuando se utiliza espermidina, alcanzando una inhibición de 60% a 1mM.

Sin embargo con la fracción B, se observan incrementos en la radiactividad incorporada al complejo ternario de iniciación con espermina y con espermidina (Figuras 16 y 17). Con espermina 100 μM se encontró un máximo de estimulación de 166% y

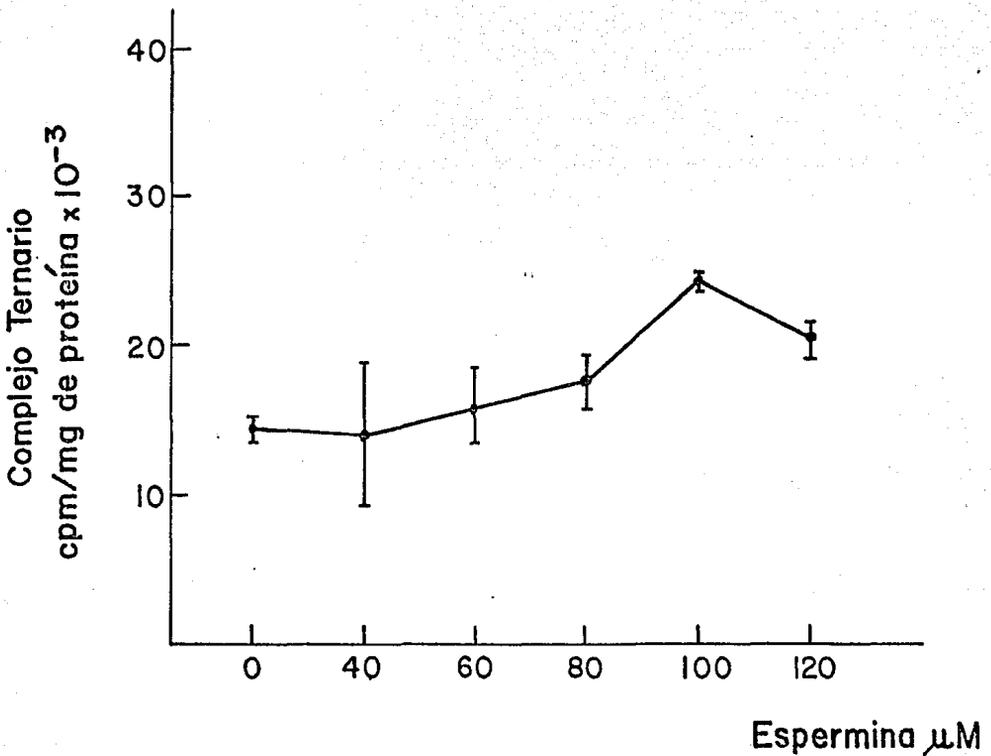


Figura 16. Formación del complejo ternario de iniciación en presencia de espermina con la fracción B. Las condiciones de la reacción se indicaron en la sección de materiales y métodos. En este caso, los ensayos se realizaron en presencia de concentraciones variables de espermina.

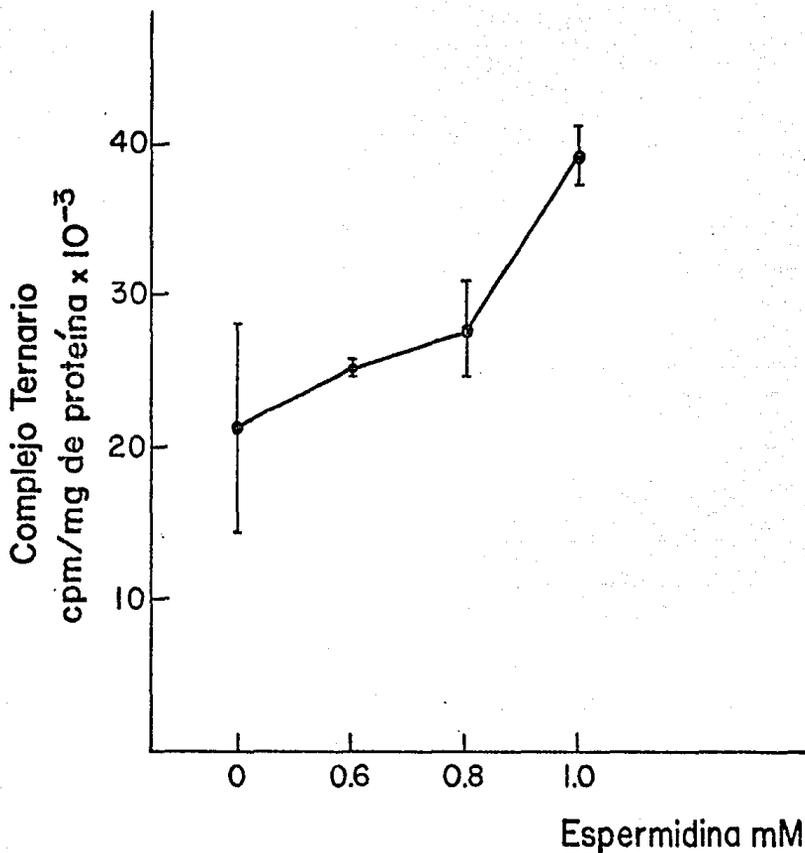


Figura 17. Formación del complejo ternario de iniciación con la fracción B en presencia de espermidina. Las condiciones de la reacción se indicaron en la sección de materiales y métodos. En este caso los ensayos se realizaron en presencia de concentraciones variables de espermidina.

Tabla 4. Dependencia de los nucleótidos trifosfatos en la formación del complejo ternario de iniciación.

Experi- mento	Espermina 100 μM	GTP 58.8 μM	ATP 61 μM	Actividad Específica cpm/mg	%	Efecto
1	-	+	-	36 304	100	-
2	-	-	-	4 923	13.5	In
3	-	+	-	36 304	100	-
4	+	+	-	18 800	52	In
5	-	+	-	36 304	100	-
6	-	-	+	16 011	44	In
7	-	-	-	4 923	100	-
8	+	-	-	6 652	135	Es
9	-	-	+	16 011	100	-
10	+	-	+	13 342	83	In
11	+	+	-	18 800	100	
12	+	-	-	6 652	35	In
13	+	+	-	18 800	100	
14	+	-	+	13 342	71	In

Las reacciones se llevaron a cabo con la fracción A de germen de trigo. Los resultados se dan como cpm de ^3H -ARNⁱ incorporado al complejo ternario de iniciación por mg de proteína.

(-) el componente que se indica no se adicionó al medio de reacción,

(+) sí se adicionó.

In = Inhibición.

Es = Estimulación.

con espermidina 1 mM de 182%.

Los niveles de inhibición (52%) o de estimulación (174%) con cualquiera de las poliaminas probadas con las fracciones A o B; dieron un efecto reproducible en cuando menos 5 experimentos.

b. Determinación de los requerimientos de la reacción para formar el complejo ternario de iniciación, en presencia y ausencia de poliamina.

En muchos trabajos se ha demostrado ampliamente que la reacción del complejo ternario de iniciación depende de GTP y es inhibida por las sustancias que inhiben la iniciación de síntesis de proteínas (Dettman & Stanely 1972 ; Cashion & Stanely, 1973; Stanely, 1974; Treadwell & Robinson, 1975; Benne , et al., 1979; Dettman & Stanely, 1973).

Esto nos llevó a determinar si la reacción en estudio mostraba los mismos requerimientos. En primer lugar se determinó la dependencia de nucleótidos trifosfato en la formación del complejo ternario de iniciación, para las fracciones A y B . La tabla 4 muestra los resultados obtenidos con la fracción A . Nuevamente la presencia de espermina con la fracción A, inhibe la formación del complejo ternario de iniciación (experimentos 3 y 4 de la tabla 4 y figura 14). Esta reacción en ausencia o en presencia de poliamina depende de GTP un 86% y un

Tabla 5. Dependencia de los nucleótidos trifosfatos en la formación del complejo ternario de iniciación.

Experi- mento	Espermina 100 μ M	GTP 18.8 μ M	ATP 61 μ M	Actividad Específica cpm/mg	%	Efecto
1	-	+	-	36 792	100	
2	-	-	-	22 031	60	In
3	-	+	-	36 792	100	
4	+	+	-	59 603	162	Es
5	-	+	-	36 792	100	
6	-	-	+	55 165	150	Es
7	-	-	-	22 031	100	
8	+	-	-	25 033	114	Es
9	-	-	+	55 165	100	
10	+	-	+	60 210	109	Es
11	+	+	-	59 603	100	
12	+	-	-	25 033	42	In
13	+	+	-	59 603	100	No hay
14	+	-	+	60 210	101	efecto

Las reacciones se llevaron a cabo con la fracción B de germen de trigo. Los resultados se dan como cpm de $^3\text{H-ARNt}^1$ incorporado al complejo ternario de iniciación por mg de proteína.

(-) el componente que se indica no se adicionó al medio de reacción, (+) sí se adicionó.

In = Inhibición

Es = Estimulación.

65% respectivamente (experimentos 1 y 2; 11 y 12 de la tabla 4). Existe cierto porcentaje de actividad que es independiente de los nucleótidos trifosfatos y que se estimula en presencia de espermina (experimentos 7 y 8). El ATP puede reemplazar parcialmente al GTP (experimentos 5 y 6; 9 y 10; 13 y 14), sin cambiar la respuesta inhibitoria.

En la reacción para formar el complejo ternario de iniciación la fracción B, en ausencia ó en presencia de poliamina, muestra una dependencia por el GTP de un 40% y un 58% respectivamente (experimentos 1 y 2; 11 y 12 de la tabla 5). La espermina con la fracción B estimula la reacción un 62% (experimentos 3 y 4 de la tabla 5), lo que nuevamente confirma los resultados anteriores (figura 16).

Espermina también estimula (un 14%) la reacción para formar el complejo ternario de iniciación que no depende de GTP (experimentos 7 y 8). El ATP puede sustituir completamente al GTP e inclusive estimula la reacción (experimentos 5 y 6). Espermina estimula la reacción con ATP en menor proporción que cuando está presente GTP (experimentos 9 y 10). Si se comparan los resultados de la reacción con espermina en presencia de GTP y de ATP, experimentos 13 y 14 respectivamente, no se observa un incremento de la actividad de la fracción B.

T a b l a 6

Inhibición de la formación de complejo ternario de iniciación en presencia de ATA.

Fracción	Espermina 100 μ M	ATA 30 μ M	cpm/mg de proteína	Efecto %
A	-	-	30 825	100
	-	+	14 232	In 54
	+	-	18 613	In 38
	+	+	9 347	In 70
B	-	-	31 391	100
	-	+	14 126	In 55
	+	-	48 243	Es 154
	+	+	21 949	In 30

Se adicionó ácido aurintricarboxílico (ATA) 30 μ M a la mezcla de reacción para formar el complejo ternario (inciso G de materiales y métodos). Los experimentos se realizaron con las fracciones A y B de germen de trigo en presencia y en ausencia de espermina como se indica en la tabla.

Se notará que las actividades específicas de las fracciones A y B que se presentan en la tabla 3 son diferentes a los resultados de las tablas 4 y 5, esto se debe a que se utilizaron diferentes preparaciones de ^3H -met-ARNt, las cuales tuvieron radiactividades específicas distintas, que fueron de $1.0 \times 10^5 - 1.5 \times 10^6$ cpm/mg de ARNt, la misma explicación es válida para los resultados de las otras tablas.

Para determinar si la radiactividad detectada (en los filtros de nitrocelulosa) correspondía al complejo ternario de iniciación, se decidió estudiar: primero si dicho complejo era inhibido por el ácido aurintricarboxílico (ATA) y segundo si otros ácidos ribonucléicos podrían sustituir al met-ARNt¹ en la reacción.

El ATA es un inhibidor de la iniciación de síntesis de proteínas, inhibe la formación de los complejos: ternario, [40SI] y [80SI] (Siegelman & Apiron (1971) ; Dettman & Stanley (1973) . En la tabla 6 se muestra que el ATA (30 μM) inhibe la reacción para formar el complejo ternario de iniciación aproximadamente un 55% con las fracciones A y B. También en presencia de espermina se observa que el ATA inhibe en la misma proporción. Se habían usado previamente varias concentraciones de ATA y se obtuvo la mayor inhibición con ATA 30 μM . (datos no mostrados).

T a b l a 7

Presencia de ARNm y ARNt en la formación del complejo ternario de iniciación.

Fracción	Espermina 120 μ M	ARNm-TMV 7.2 μ g	ARNt de germen de trigo 7.2 μ g	cpm/mg de proteína	Inhibición %
A	+	-	-	19 078	100
	+	+	-	15 430	19
	+	-	+	15 072	21
B	+	-	-	24 903	100
	+	+	-	18 034	28
	+	-	+	19 922	20

A la mezcla de reacción para formar el complejo ternario de iniciación se adicionaron las cantidades indicadas del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) correspondiente al virus del mosaico de tabaco (TMV) y del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) de germen de trigo. El complejo ternario se midió en presencia de espermina con las fracciones A y B de germen de trigo.

T a b l a 8

Estabilidad a temperatura de las fracciones A y B de germen de trigo.

Fracción	37°C 5 min	50°C 5 min	70°C 5 min	cpm/mg de proteína	Actividad remanente %
A	-	-	-	34 850	100
	+	-	-	6 055	17
B	-	-	-	20 820	100
	+	-	-	44 968	215
	-	+	-	25 400	122
	-	-	+	16 560	80

Las fracciones A y B se calentaron durante 5 min. a las temperaturas que se indican y posteriormente se determinó su actividad para formar el complejo ternario iniciador. En presencia de poliamina los resultados fueron similares.

Por otro lado se determinó si los ácidos ribonucleicos mensajero o de transferencia, podían competir con el ^3H -met-ARNTⁱ que se une al factor para formar el complejo ternario de iniciación, la unión causaría una disminución en la radiactividad incorporada a dicho complejo. En la tabla 7 se muestra que la presencia de 7.2 μg del ARNm del virus del mosaico (TMV) inhibe la reacción con las fracciones A o B en un 19-28% y cuando se adicionó a la reacción ARNT de germen de trigo, también se observó una inhibición del 20% con ambas fracciones.

c. Determinación de la estabilidad de las fracciones A y B a diferentes temperaturas.

El hecho de que las fracciones A y B mostraron efectos diferentes en la formación del complejo ternario de iniciación en presencia de espermina, indujo a pensar que estas dos fracciones podrían tener otras características distintas, como por ejemplo, su estabilidad a diferentes temperaturas.

La tabla 8 muestra los resultados en relación a la actividad remanente de cada una de las fracciones A o B, después de que se preincubaron a las temperaturas que se indican. Como se puede observar, la fracción A es poco estable a la temperatura, ya que cuando se preincubó a 37°C durante 5 minutos, su actividad remanente fué de 17%, mientras que la fracción B en las mismas condiciones se activa, siendo su actividad re-

T a b l a 9

Titulación de la fracción A con la fracción B.

Fracción		Espermina μM	Actividad específica cpm/mg	Efecto	%
A	B				
ug	ug				
704	+ 1562	-	38 845	-	100
704	+ 1562	120	43 444	Es	111
352	+ 1562	120	49 162	Es	106
704	+ 781	120	48 460	Es	107
704	+ 520	120	35 970	In	7.4

El complejo ternario iniciador se formó en presencia de espermina, con una mezcla de las fracciones A y B como se indica en la tabla.

manente de 215%. Cuando la fracción B se incubó a 50°C durante el mismo tiempo, aún presenta una gran estabilidad y únicamente se logra observar una ligera pérdida de la actividad cuando esta fracción se incubaba a 70°C. La actividad residual también fue medida en presencia de espermina y los resultados obtenidos fueron muy similares a los mostrados en la tabla 8.

d. Efecto de las poliaminas en la formación del complejo ternario de iniciación en presencia de una mezcla de las fracciones A y B.

La síntesis de proteínas siempre se ha visto estimulada en presencia de poliaminas, como lo indican los datos reportados en la literatura, tanto a nivel de elongación (eucariontes) (Konecki et al., 1975; Atkins et al., 1975; Cohen & Zalik, 1978; Hunter, et al., 1977), como a nivel de iniciación (procariontes) (Algranati & Goldember, 1971; Igarashi & Hirose, 1978). En el presente trabajo se encontraron resultados hasta cierto punto contradictorios, ya que solamente con una de las fracciones se observa estimulación y con la otra inhibición en presencia de los policationes utilizados. Además en un extracto de germen de trigo (en el cual están presentes ambas fracciones en un momento dado), cuando este extracto (23,000 x g) se incubaba con una mezcla de aminoácidos radiactivos, ARNm-TMV y poliamina, se ha observado estimulación en la síntesis de proteínas

(resultados obtenidos por diferentes personas en este mismo laboratorio). Lo anterior llevó a plantear la pregunta ¿Cuál sería el efecto preponderante en un sistema de iniciación fraccionado (como el descrito hasta aquí), cuando se midiera este paso de iniciación en presencia de ambas fracciones A y B?. La respuesta a esta pregunta se encuentra en los resultados de la tabla 9. En estos experimentos, el complejo ternario de iniciación se formó en presencia de espermina con una mezcla de las fracciones A y B. Utilizando la mezcla de A y B a niveles de saturación de cada una de ellas en la reacción sin poliaminas, el resultado no fue la suma de las actividades específicas de las dos fracciones, sino que resultó ligeramente superior a los resultados obtenidos con cada fracción por separado.

Con las fracciones A y B en concentraciones saturantes y en presencia de espermina, el efecto encontrado fue ligeramente estimuladorio, comparado con el resultado en ausencia de poliaminas. Cuando la reacción se realizó con la fracción A a su nivel de saturación y se mezcló con concentraciones saturantes o con la mitad de la concentración de la fracción B, el efecto encontrado fue también de una ligera estimulación. Únicamente se observó una ligera inhibición (7%) comparada con la reacción sin poliamina cuando la concentración de la fracción B se disminuyó a un tercio. Si por el contrario la concentración saturante de la fracción B se mantiene y la concentración de la

fracción A se disminuye a la mitad de su saturación, el efecto en presencia de espermina es de estimulación.

DISCUSSION Y CONCLUSIONES

Existe amplia evidencia que demuestra que las poliaminas estimulan la síntesis de proteínas. Algunos autores proponen que es la etapa de iniciación la que principalmente se estimula (Ochoa, et al., 1967; Igarashi & Hirose, 1978; Igarashi et al., 1978; Igarashi et al., 1980) en cambio otros autores proponen que es a nivel de elongación de la cadena polipeptídica donde se ejerce el efecto de estimulación, (Martin & Ames, 1962; Igarashi et al., 1974; Konecki, et al., 1975; Hunter et al., 1977 y Cohen & Zalik, 1978).

La presente tesis se propuso apoyar que las poliaminas estimulan la síntesis de proteínas a nivel de la iniciación. El trabajo se desarrolló tomando como base los datos (no publicados) de la Dra. Ruth Román, quien observó que las poliaminas estimulaban la síntesis de proteínas, en un sistema libre de células de germen de trigo cuando se iniciaba la síntesis con una mezcla de aminoácidos libres y en cambio las poliaminas no estimulaban la síntesis de proteínas cuando se adicionaban aminoacil-ARNt's. Por lo tanto serían las reacciones de aminoacilación y de iniciación las que podrían estar estimuladas.

Como se ha podido observar en la introducción de esta tesis, se presentaron escasos reportes relacionados con el efecto de las poliaminas en la iniciación de la síntesis de proteí-

nas y además la mayoría de estos estudios se han realizado en procariontes. Debido a esto nuestro trabajo se encaminó a estudiar dos de las reacciones primarias de la síntesis de proteínas que son: la reacción de aminoacilación y la reacción para formar el complejo ternario de iniciación. Y este estudio se realizó en un sistema de eucariontes (el germen de trigo).

I. Reacción de aminoacilación.

La reacción de aminoacilación del ARNtⁱ de germen de trigo con metionina, la cual fué catalizada por las aminoacil-ARNt sintetetasas de E.coli, fue muy sensible a pequeñas variaciones en las concentraciones de cada uno de sus componentes.

En la curva de la formación del met-ARNtⁱ contra la concentración de enzima (aminoacil-ARNt sintetetasas) se puede observar que la incorporación de la ³H-met al ³H-met-ARNtⁱ empieza a decaer cuando la concentración de enzima rebaza el nivel óptimo (figura 6). Es posible que estas concentraciones se manifiesten los efectos de ciertos inhibidores de las aminoacil-ARNt sintetetasas, los cuales, copurifican con ellas (Malathi & Mazumder, 1978).

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la eficiencia de la reacción para formar el aminoacil-ARNt depende de la relación $[Mg^{++}] / [ATP]$ presente en la mezcla de reacción, si se tiene una relación adecuada se evita que se formen los complejos inactivos: $Mg ATP^{-2}$ y $Mg ATP_2^{-6}$ (Mohan & Rechnitz, 1974, Franco & Huberman, 1975).

El efecto de la relación $[Mg^{++}] / [ATP]$ es notorio en la curva de incorporación de la 3H -met al 3H -met-ARNtⁱ, que representa la variación de la concentración de magnesio cuando se mantiene constante la concentración de ATP (figura 7) y este mismo efecto se hace más notable en la curva contra la concentración de ATP cuando se mantiene constante la concentración de magnesio (figura 8), en ésta última se puede observar que la formación del met-ARNtⁱ sufre una caída drástica después que se alcanza la concentración óptima de ATP. El efecto se puede explicar porque al cambiar la concentración de ATP, la relación $[Mg^{++}] / [ATP]$ también se altera, pudiendo dar lugar a una relación tal que sea inhibitoria para la reacción. En este caso la relación óptima de $[Mg^{++}] / [ATP]$ fue la que resultó usando las concentraciones óptimas de Mg^{++} y ATP.

Bajo las condiciones óptimas para formar el met-ARNtⁱ se demostró que tanto espermina (80 μ M) como espermidina (0.8 mM) en presencia de una baja concentración de magnesio (2mM),

estimulan la reacción de aminoacilación del ARNt de germen de trigo con metionina o con leucina (figuras 11 y 12 respectivamente). El nivel de estimulación con espermina fue mayor para el met-ARNtⁱ (260%) que para el leu-ARNt (160%), en presencia de espermidina casi no se observó el efecto con leu-ARNt.

Estas diferencias en el grado de estimulación y las diferencias en los niveles de incorporación entre el leu-ARNt y el met-ARNtⁱ pueden deberse a que, en los dos casos, se utilizó la misma concentración óptima de poliamina, la cual se había determinado previamente para metionina y puede ser que los requerimientos de poliamina, en la reacción de aminoacilación, varíen para cada aminoácido.

De los trabajos publicados (Igarashi et al., 1969, 1971 y 1972; Robison & Zimmerman, 1971; Igarashi & Hirose, 1978 y Lapointe & Kern, 1979) y del presente trabajo, se puede concluir que la reacción de aminoacilación estimulada por las poliaminas presenta las siguientes características:

- i) se requiere de una concentración de magnesio baja (1-3mM).
- ii) en todos los casos la concentración óptima de espermina es siempre menor que la de espermidina y ésta todavía menor que la de putrescina (Igarashi et al., 1969 y 1971).

iii) la eficiencia de formación del aminoacil-ARNt en un sistema de baja concentración de magnesio más poli-amina, es tan eficiente como su formación en presencia de una concentración óptima de magnesio.

iv) el efecto de las poliaminas se presenta tanto en los sistemas de aminoacilación homólogos (Takeda & Igarashi, 1969. e Igarashi et al., 1972) como heterólogos (Igarashi & Hirose, 1978 y la presente tesis) de los procariontes y de los eucariontes.

v) en la reacción de aminoacilación, las poliaminas en presencia de concentraciones mayores al óptimo de magnesio presentan efectos inhibitorios (Lapointe & Kern, 1979 y datos de nuestro laboratorio). Este efecto se debe principalmente, a que las altas concentraciones de cationes provocan la precipitación del ARNt (Bachrack, 1973) que se encuentra en el medio de reacción, o bien por alterar la relación óptima $[Mg^{++}] / [ATP]$ provocando en cualquier caso la inhibición de la reacción.

Por otro lado, se ha observado que las poliaminas no promueven la reacción de intercambio ATP-PPi (Igarashi et al., 1971; Matsuzaki & Takeda, 1973; Pochon & Cohen, 1972; Pastuzyn & Loftfield, 1972 y Lapointe & Kern, 1979), ni la formación de complejos aminoacil-adenilatos; ambos característicos de la reacción de aminoacilación. Tales complejos se forman únicamente en presencia de magnesio como lo de--

muestran Matsuzaki & Takeda (1973). De estos datos se ha propuesto que, el mecanismo de la reacción de aminoacilación en presencia de poliaminas, sea diferente al que se lleva a cabo con magnesio. Por los datos mostrados anteriormente, al usar el término "estimulación" por poliaminas, se debe entender que se trata de un incremento en la formación del aminoacil-ARNt, siempre con respecto al que se forma en presencia de una baja concentración de magnesio (sin poliaminas) y no a una mayor aminoacilación con respecto al magnesio óptimo (figuras 11 y 12). Se puede decir que las poliaminas estimulan por simple sustitución del magnesio en la reacción, pero no por ocupar los mismos sitios del magnesio, ya que se sabe que cuando interaccionan las poliaminas y el magnesio con el ATP, enzimas o ARNt, cada uno tiene diferentes sitios de unión (Quingley et al., 1978 y fig. 2 en la introducción). Esto podría indicar que la reacción de aminoacilación procede bajo mecanismos diferentes.

II. Formación del complejo ternario de iniciación.

Para entender esta reacción fue necesario obtener una fracción proteínica de germen de trigo, capaz de formar el complejo ternario de iniciación [factor. met-ARNtⁱ.GTP], la cual se purificó parcialmente a partir de un sobrenadante de 100,000 xg. Como se muestra en la tabla 2, se encontraron tres fracciones que presentan actividad para formar el

complejo ternario. Aún cuando en el presente trabajo se seguía una secuencia de purificación similar a la que presentan Geisen et al. (1976) y Spremulli et al. (1979), nosotros encontramos que la fracción con capacidad para formar el complejo ternario podíamos fraccionarla en dos partes de acuerdo a su comportamiento en presencia de las poliaminas. Las actividades de las fracciones A, B, son similares a las del factor eIF-2 en cuanto a que unen el met-ARNtⁱ y esta unión depende del GTP (Dettman & Stanley, 1972; Dettman & Stanley, 1973; Schreirer & Staehelin, 1973; Weissback & Ochoa, 1976). En presencia de ácido aurintricarboxílico la formación del complejo ternario también se inhibe (Dettman & Stanley, 1973; Levin et al., 1973; Adams et al., 1975; Trachsel et al., 1977).

En nuestro caso la mayor actividad específica, se encontró en la fracción A que precipita entre 30-50% de saturación con sulfato de amonio, disminuyendo la actividad en la fracción B (50-72% de saturación) y la fracción B' contiene sólo la parte final de la actividad, si se considera al fraccionamiento como una distribución del tipo campana de Gauss. Estos datos difieren un poco de los publicados por Giesen, et al. (1976), quienes encontraron la mayor parte de la actividad en una fracción que precipita entre 50-72% de saturación con sulfato de amonio y también difieren de los resultados de Spremulli, et al. (1979) quienes, invierten

el proceso de purificación concentrando con sulfato de amonio antes de la cromatografía y encuentran la actividad del factor eIF-2 entre 40-60% de saturación con sulfato de amonio. Esto nos lleva a pensar que las características de purificación (precipitación y cromatografía) no son determinantes como criterios para definir si en una fracción se encuentra el factor proteínico deseado, sino que debe complementarse con características de funcionalidad y especificidad.

Debido a que las poliaminas se unen al ARNt (Quingley et al., 1978) afectando su conformación (Pochon & Cohen, 1972; Bolton & Kearns, 1977), se pensó que si esta interacción es lo suficientemente estable, se podrían mantener unidas al met-ARNtⁱ, y obtener un mayor rendimiento en la formación del complejo ternario de iniciación. Para estudiar este punto se preparó met-ARNtⁱ en presencia de poliaminas y se usó como sustrato en la reacción para formar el complejo ternario de iniciación. Sin embargo, como se mostró en la tabla 3, la formación de dicho complejo es igual de eficiente que con el met-ARNtⁱ preparado únicamente con una concentración de magnesio alta. Este resultado puede explicarse si: a) la poliamina unida al met-ARNtⁱ (formado en su presencia) se hubiera dissociado al purificar el aminoacil-ARNt a través de la columna de DEAE-celulosa o durante la diálisis posterior a su precipitación con alcohol; b) la conformación del met-ARNtⁱ conferida por la poliamina no fuese lo

suficientemente estable como para manifestar su efecto en la siguiente reacción y c) el ARNt utilizado en la formación del met-ARNtⁱ contenga poliamina endógena unida en nivel saturante que ya no se modifica por la poliamina exógena, lo cual impediría diferenciarlo en la reacción del complejo ternario.

Estudiamos también el efecto de las poliaminas a nivel del complejo ternario al adicionarlas directamente en el medio de reacción. Los resultados obtenidos demuestran que la espermina y la espermidina presentan efectos diferentes sobre el complejo ternario de iniciación, formado con las fracciones A y B. Mientras que la actividad de la fracción A se inhibió un 45% con espermina y un 60% con espermidina (figuras 14 y 15), la fracción B se estimuló un 166% y un 182% con espermina y con espermidina respectivamente (fig. 16 y 17).

Ya que el principal efecto de la presencia de poliaminas sobre la síntesis total de proteínas es de estimulación, era de esperarse que este fuera el único efecto observable en la formación del complejo ternario de iniciación, sin embargo los resultados fueron hasta cierto punto contradictorios, siendo necesario tratar de investigar dicha reacción con mayor detenimiento. En primer término sabemos que la reacción para formar el complejo ternario de iniciación debe cumplir

con ciertos requisitos, como son: que la reacción depende de GTP (Dettman & Stanley, 1972; Cashion & Stanley, 1973; Stanley 1974; Treadwell & Robinson, 1975; Giesen, et al., 1976 y Benne et al., 1979) y que se inhibe con bajas concentraciones del ácido aurintricarboxílico (Dettman & Stanley, 1973). Junto con los parámetros anteriores, también se determinó la especificidad por otros aminoacil-ARNt's y la unión a otros polinucleótidos, como criterios para determinar que las fracciones proteínicas tenían las características propias de un factor de iniciación que es capaz de formar el complejo ternario de iniciación.

Los resultados de la tabla 4 mostraron que para formar el complejo ternario de iniciación la fracción A, en presencia ó en ausencia de poliamina depende del GTP un 65% y un 86% respectivamente. La fracción B mostró una menor dependencia por el GTP, 58% y 40%, en presencia y en ausencia de poliamina respectivamente (tabla 5). Los dos valores de la fracción A y de la fracción B con poliamina están cerca del rango que se ha reportado para los factores aislados de germen de trigo y de ascites Krebs II, en estos sistemas la dependencia por el GTP es de 60-70% (Giesen et al., 1976; Spremulli et al., 1979 y Reynolds et al., 1977). En cambio la dependencia de la fracción B por el GTP en la reacción con poliamina esta fuera de los valores mencionados y resul

tó superior a los valores del factor de iniciación EIF-1 de ascites Kefs II, en este caso cuando se lleva a cabo la reacción con el met-ARNtⁱ de levadura, la dependencia por el GTP es de un 28% con el factor sin purificar y la dependencia por GTP es de 48% cuando el factor se ha purificado parcialmente (Reynols* et al., 1977).

También se observó que, en la reacción para formar el complejo ternario de iniciación con la fracción A, el ATP sustituye parcialmente al GTP (44% tabla 4), siendo este efecto similar al reportado por Benne, et al. (1979) con el factor eIF-2 de reticulocito de conejo. La reacción con la fracción B, mostró una mayor unión independiente de GTP, en presencia o ausencia de poliamina (tabla 5), lo cual indica que dicha fracción contiene más impurezas que la fracción A.

Por otro lado, concentraciones de ácido aurintricarboxílico (ATA) alrededor de 30 μ M, inhibieron parcialmente la reacción del complejo ternario formado con la fracción A, con y sin poliamina un 70 y 54% respectivamente y en presencia de la fracción B esta inhibición fué de 30 y 55% respectivamente (tabla 6). Los niveles de inhibición del ácido aurintricarboxílico en la reacción sin poliamina, son menores a los reportados por Dettman & Stanley (1975); Reynolds* et al. (1977) y Roy et al. (1981), en estos casos la inhibición

* La referencia está al final del índice bibliográfico.

es cerca del 100%. Reynolds et al. (1977) muestran que en la reacción para formar el complejo ternario de iniciación, con el factor de iniciación de ascites Krebs II y en presencia del met-ARNTⁱ de reticulocito de conejo el ATA (30 μ M) inhibe un 98% y con el met-ARNTⁱ del mismo sistema de ascites Krebs II la inhibe un 67%. Al adicionar el cofactor denominado Co-EIF-1 (que copurifica con los factores de iniciación), la inhibición por el ATA disminuye entre 9 y 14%. En el presente trabajo las fracciones A y B de germen de trigo podrían tener una proteína similar al Co-EIF-1, la cual podría evitar que el ATA inhibiera la reacción en un 100% y es por esto que la inhibición observada es de un 30-70%.

En cuanto a la especificidad de las fracciones A y B en el reconocimiento de los aminoacil-ARNT's se encontró una fuerte preferencia de unión por el met-ARNTⁱ comparativamente con el leu-ARNT (tabla 2). Cuando la reacción para formar el complejo ternario de iniciación se llevó a cabo en presencia de ácidos ribonucléicos diferentes al met-ARNTⁱ, se observó una inhibición de 19 y 28% en presencia de ARNm-TMV con las fracciones A y B respectivamente (tabla 7), el porcentaje fue similar a la inhibición con el factor de iniciación eIF-2 de reticulocito de conejo reportado por Kaempfer, et al. (1978), el cual se puede unir a diferentes

ácidos ribonucléicos. Al adicionar ARNt, este inhibe la reacción en igual proporción (20%) con ambas fracciones (tabla 7). En estas fracciones se podría encontrar una proteína que se une al ARNt, existen bases para hacer esta proposición ya que, Reynolds et al. (1977) encontraron que en sus preparaciones del factor de iniciación capaz de formar el complejo ternario, tienen una proteína que se une al ARNt y que esta unión también inhibe (11%) la reacción.

De los resultados anteriormente mencionados, por un lado la total y parcial dependencia por el GTP y la inhibición parcial por el ATA, y por otro lado la poca competencia con el met-ARNtⁱ que mostraron el ARNm y el ARNt presentes en la reacción sirven de apoyo para proponer que el complejo ternario de iniciación con cualquiera de las fracciones A y B de germen de trigo presenta efectivamente el comportamiento esperado para un complejo ternario de iniciación de la síntesis de proteínas con o sin poliamina.

Otro hecho importante fue la diferencia tan marcada que mostraron las fracciones A y B en cuanto a su estabilidad a la temperatura, la fracción A perdió 83% de su actividad cuando se calentó a 37°C, durante 5 min, mientras que la

fracción B únicamente perdió un 20% al calentarla a 70°C, durante 5 minutos (tabla 8), mostrando esta última fracción mayor estabilidad e inclusive fue superior a la que presenta el factor de iniciación aislado del germen de trigo por Spremulli et al. (1979), el cual pierde 50% de su actividad al ser calentado a 45°C durante 5 minutos.

Es muy importante notar que aunque el efecto de las poliaminas en la formación del complejo ternario de iniciación es opuesto con cada una de las fracciones A y B, el efecto preponderante con una mezcla de ellas (con niveles saturantes de cada una), es de un ligera estimulación como se esperaría de los datos previamente publicados, que muestran en todos los casos una estimulación en la síntesis de proteínas (inicio e de la introducción).

En los experimentos que se presentan de la tabla 9 se puede observar que el efecto de inhibición en la formación del complejo ternario de iniciación se manifiesta solamente cuando un tercio de la fracción B está presente, (inhibición 7.4%), además este efecto no es tan marcado como el que muestra la fracción A por separado (inhibición 45%, figura 14).

En la literatura se ha reportado que las poliaminas estimulan la iniciación y la elongación de la síntesis de proteínas. De los pocos datos que existen a nivel de la iniciación

tenemos que:

a) La espermidina estimula, en los procariontes, la formación del complejo de iniciación compuesto por: la subunidad ribosomal 30S, el fmet-ARNt, el GTP, el ARNm y los factores de iniciación, el complejo se denomina como [30SI]. En estos organismos no se forma un complejo ternario de iniciación. El grado de estimulación del complejo [30SI] es de 136% (Igarashi et al., 1978) y resulta menor a la estimulación que hemos observado en la formación del complejo ternario de iniciación [Factor.met-ARNtⁱ.GTP] con la fracción B de germen de trigo (en este caso la estimulación fue de 166% y 182% en presencia de espermina y de espermidina respectivamente), y b) La espermidina estimula un 290% la formación del complejo de iniciación [40SI] de reticulocito de conejo, dicho complejo esta compuesto por: la subunidad ribosomal 40S, el met-ARNtⁱ, el GTP y los factores de iniciación, la estimulación con espermidina en este caso resulta mayor a la que hemos observado en la formación del complejo ternario de iniciación del germen de trigo.

En relación con la estimulación de las poliaminas a nivel de la elongación de la síntesis de proteínas ya se tienen varias publicaciones, las cuales se han citado en la introducción, una de las más recientes es la reportada por Igarashi et al. (1980), estos autores determinan la incorporación del met-ARNtⁱ a la cadena polipeptídica en presencia de espermidina en un sistema libre de células de germen de trigo y

también encuentran, como en otros reportes, que dicha incorporación se estimula en presencia de las poliaminas, el grado de estimulación resulta similar a la que hemos observado en la formación del complejo ternario de iniciación del germen de trigo.

Hasta la fecha no existe otro reporte que muestre la estimulación en la formación del complejo ternario de iniciación en presencia de las poliaminas, como el que se presenta en esta tesis.

Para relacionar los datos encontrados con el mecanismo de la síntesis de proteínas, propongo tres interpretaciones, cualquiera de ellas implica que los factores requieren de una mayor purificación. La primera presupone la existencia de un componente proteínico adicional, X, que precipita principalmente con la fracción A. La segunda presupone la existencia de dos componentes proteínicos, uno en A y otro en B, que medien la respuesta hacia la poliamina. Y la tercera proposición es que el componente X fuera una cinasa.

Explicando con más detalle la primera interpretación propongo que en la fracción A se encuentra algún componente proteínico, X, que media la sensibilidad hacia las poliaminas, uniéndose a uno de los componentes del complejo ternario de iniciación provocando la disociación de cierto porcentaje

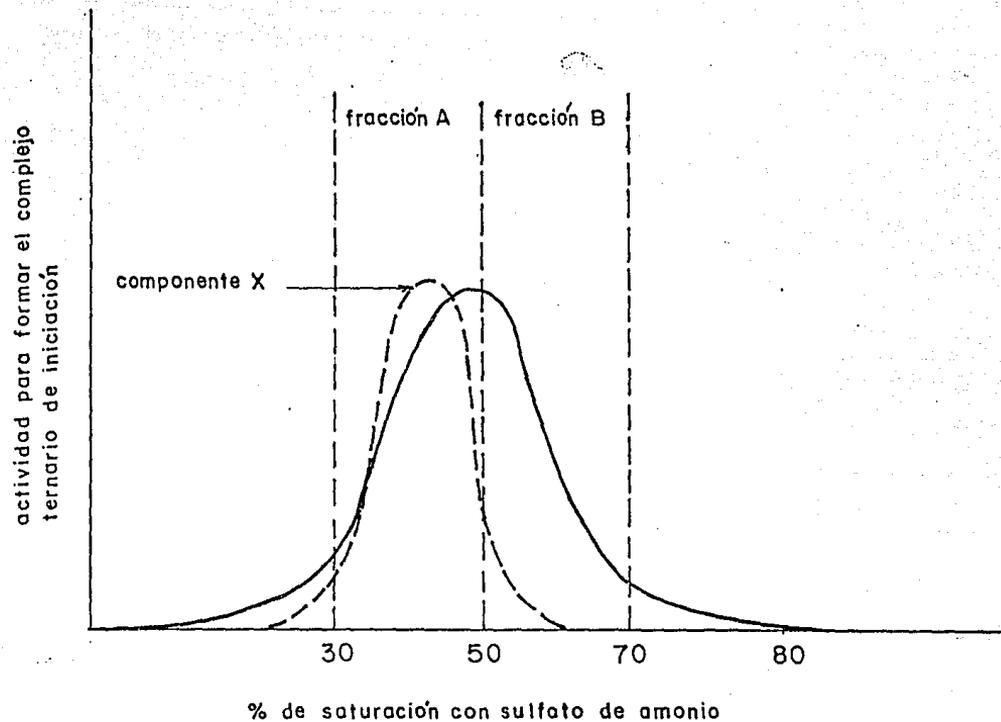


Figura 18. Distribución de la actividad para formar el complejo ternario de iniciación con las fracciones α , A, B y δ de germen de trigo y distribución hipotética del componente X.

del mismo (el efecto inhibitorio que se ha observado con la fracción A). Esta fracción es altamente sensible a la temperatura, presenta alta dependencia por GTP y tiene mayor especificidad en el reconocimiento del met-ARntⁱ con respecto a otros aminoacil-ARnt's. Sin embargo la fracción A se inhibe un 20% con el ARnt desacilado, sugiriendo que el componente X (no obstante que la reacción es dependiente de GTP) le confiere alrededor del 20% de inespecificidad en la fracción A y podría ser el causante de su inestabilidad a la temperatura.

En el caso de la fracción B, esta presentaría una mínima cantidad del componente X, de tal manera que no se manifiesta inhibición en presencia de poliamina, sino que se estimula la formación del complejo ternario de iniciación. Esto es concomitante con un aumento muy considerable en su estabilidad a temperatura. La figura 18 ayuda a visualizar cómo estarían distribuidas las actividades de cada una de las fracciones y la presencia hipotética del componente X, causante del efecto de inhibición que presenta la fracción A.

En nuestro laboratorio se analizaron las fracciones A y B por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) (datos no mostrados) y se encontró que algunas bandas con pesos moleculares de 40,000 y 50,000 eran similares en ambas fracciones, la fracción A presentó un ma

yor número de bandas con pesos moleculares arriba de 45,000 no presentes en la fracción B. Los pesos moleculares que se esperan para el factor de iniciación (eIF-2) que forma el complejo ternario de iniciación de reticulocito de conejo son de 38,000 y de 48,000. Por lo tanto las proteínas con mayor peso molecular que las anteriores y que se encuentran en la fracción A, podrían ser el componente X propuesto, ya que este no se encuentra en la fracción B. De acuerdo a esta interpretación, el efecto estimulador en la formación del complejo ternario de iniciación ocasionado por las poliaminas, parece estar oscurecido en la fracción A por la presencia de un componente. Aún con la presencia del componente X, el efecto producido por las poliaminas a este nivel de iniciación sería de estimulación. Los experimentos de la tabla 9 apoyan esta interpretación, ya que cuando se hizo la mezcla de las fracciones A y B y se midió el complejo ternario de iniciación en presencia de espermina, el efecto que se encontró fue predominante de estimulación y únicamente se inhibió cuando la concentración de B era muy baja, manifestándose entonces el componente X de la fracción A en la mezcla de las dos fracciones.

La segunda interpretación es menos simple, pero puede explicar las diferencias en el comportamiento de las fracciones A y B. En este caso propongo que en cada fracción existiera

un componente proteínico Y y Z respectivamente, los cuales les confieren a las fracciones A y B características distintas. Cuando la reacción para formar el complejo ternario de iniciación se realiza en presencia de las poliaminas, el componente Y se comportaría de una manera similar al de la primera proposición, disociando parte del complejo ternario de iniciación causando así una inhibición. Sin embargo el componente Z de la fracción B, podría formar un intermedio con la poliamina o con los otros componentes del complejo ternario, de tal manera que favoreciera sus interacciones, desplazando la reacción hacia la formación del complejo de iniciación: [Factor.met-ARNTⁱ, GTP], lo que se manifestaría en un efecto estimulatorio.

Por otro lado Roy, et al. (1981) han descrito en el reticulocito de conejo la existencia de un co-factor del factor que une el met-ARNTⁱ denominado Co-eIF-2A, el cual por sí mismo estimula la formación del complejo ternario de iniciación y precipita entre 0-60% de saturación con sulfato de amonio, este co-factor podría estar junto con la fracción A o con la fracción B. Si en germen de trigo, postulamos la existencia de un co-factor similar, lo situaríamos junto con la fracción A ya que de acuerdo a lo aportado por Roy, et al.(1981), las poliaminas inhiben la formación del complejo ternario y que tal inhibición persiste aún en presencia del co-factor. Sin embargo otras características del Co-eIF-2A, lo situarían en la fracción B, ya que este co-factor de reticulocito revierte la inhibición del complejo ter

nario causada por ATA o por ARNm y es estable a 50°C, características que manifestó la fracción B (excepto la inhibición por ARNm).

Aún cuando queda en duda la intervención de un co-factor en la actividad de las fracciones A o B, su presencia en otro sistema apoya la proposición de la posible existencia de un componente "extra", como aquí se ha propuesto.

En la tercera posibilidad un último dato de la literatura - ayudaría a entender nuestros resultado. Cuando el factor - eIF-2 que une el met-ARNtⁱ es fosforilado, pierde su capacidad de formar el complejo ternario de iniciación (*Austin & Clemens, 1980). Una posibilidad pudiera ser que el componente X fuera una cinasa, la cual se estimulara en presencia de la poliamina de tal manera que el factor eIF-2 de la --- fracción A y no el de la fracción B se fosforilara, inactivándolo, lo que traería por consecuencia que cuando las --- fracciones A y B se mezclan, pudiera no haber una estimulación sino que únicamente se redujera la inhibición observada con la fracción A, porque el factor estaría fosforilado en la fracción A y no en la fracción B.

Para comprobar cual de las tres posibilidades es la mas factible es necesario establecer experimentalmente la existencia de los componentes X, Y y Z mediante una mayor purificación de las fracciones y de ser posible, demostrar que cuan

do cada componente se adiciona por separado a la reacción para formar el complejo ternario de iniciación, muestre -- una inhibición o una estimulación en presencia de las poliaminas. También se pueden marcar radiactivamente cada uno de los componentes en la reacción (factores, componentes X, Y y Z, met-ARNtⁱ, GTP o poliaminas), para identificar si es que participan o no en la formación del complejo ternario de iniciación y posteriormente analizar que tipo de complejo (s) se forman en presencia de las poliaminas.

Como podemos observar, es necesario tener una mayor información relacionada con el mecanismo por el cual las poliaminas estimulan la síntesis de proteínas y también es necesario determinar qué reacción o reacciones se encuentran afectadas de manera más importante. Una vez que se conozca dicha información se podrá proponer un mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas en el que muy probablemente participen las poliaminas.

En esta tesis se presentan los datos que constituyen el primer reporte, hasta la fecha, que apoyan el hecho de que las poliaminas estimulan la síntesis de proteínas a nivel de la etapa de iniciación, específicamente en la formación del complejo ternario de iniciación, en un sistema de eucariontes (germen de trigo), siendo esta una reacción previa a la formación del complejo de iniciación [40SI].

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, S.L. Safer, B., Anderson, W.F., y Merrick, W.C. J. Biol. Chem. 250 ; 9083-9089 (1975).
Eukaryotic initiation complex formation. Evidence for two distinct pathways.
2. Algranati, I.D. y Goldemberg, S.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75 ; 1045-1051 (1977).
Translation of natural mRNA in cell free systems from polyamina-requiring mutant of E.coli.
3. Altman, A., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A. Plant. Physiol. 60 ; 570-574 (1977).
Stabilisation of oat leaf protoplast trough polyamine-mediated inhibition of senescence.
4. Atkins, J.F., Lewis, J.B., Anderson, C. W. y Gesteland, R.F. J. Biol. Chem. 250; 5688-5695 (1975).
Enhanced differential synthesis of proteins in a mammalian cell-free system by addition of polyamine.
5. Bachrack, U. Function of naturally occurring polyamines. Academic Press N.Y. (1973).
Cap. 8 pág. 63-149 (Polyamines and nucleic acids).
6. Bagni, N., Caldadera, G.M. y Moruzzi, G, Esperientia (Bazel) 25 ; 139-140 (1967).
Spermine and spermidine distribution during wheat growth.
7. Benne R., Amesz, H., Hershey, J.W.B. y Voorma, H.O. J. Biol. Chem. 254; 3201-3205 (1979).
The activity of eukariotic initiation factor eIF-2 in ternary complex formation with GTP and met-tRNf.

8. Benne, R. y Hershey, J.W.B.
J. Biol. Chem. 253; 3079-3087 (1978).
The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes.
9. Bergman, F.H. Methods in Enzymology
V; 708 (1962).
Bacterial amino acyl-RNA synthetases.
10. Bolton, P.H. y Kearns, D.R. Biochem.
Biophys. Acta 477; 10-19 (1977)
effect of magnesium and polyamines
on the structure of yeast tRNA^{phe}.
11. Cashion, L.M. y Stanley W.M. Jr. Biochim.
Biophys. Acta 324; 410-419 (1973).
Comparative studies on the properties of the
eukaryotic protein synthesis initiation factor
eIF-2 from several sources.
12. Cohen, A.S. y Zalik, S. Phytochem. 17; 113-118 (1978).
Magnesium replacement by polyamines in higher
plant cell-free polyphenylalanine synthesis.
13. Dettman, G.L. y Stanley W.M. Jr.,
Biochim. Biophys. Acta, 287; 124-133 (1972).
Recognition of eukaryotic initiator
tRNA by an initiation factor and the transfer of the
methionine moiety into peptide linkage.
14. Dettman, G.L. y Stanley W.M. Jr.
Biochim. Biophys. Acta, 299; 142-147 (1973).
The ternary complex of initiation factor IF-1, met-tRNA^{met}
and GTP. An aurintricarboxylate sensitive intermediate in
the initiation of eukaryotic protein synthesis.

15. Franco, R. Huberman, A. Rev. Inv. Clin. (Méx.) 27; 11-22 (1975).
The importance of individual optimization of tRNA aminoacylating conditions.
16. Galston, A.W. y Kaur-Sawhney, R. What's New in Plant Physiol. 11; 5-8 (1980).
Polyamines and Plant cells.
17. Ghosh, K., Gosh, H.P., Simsek, M. y Raj Bhandary, U.L. J. Biol. Chem. 249; 4720-29 (1974).
Initiator methionine transfer ribonucleic acid and partial nucleotide sequence.
18. Giesen, M. Roman, R., Seal, S.N. y Marcus, A.J. Biol. Chem. 251 ; 6075-6081 (1976).
Formation of an 80S methionyl-tRNA initiation complex with soluble factors from wheat germ.
19. Guarino, L.A. y Cohen, A.S. Proc. Natl. Acad. Sci. 76; 3660-64 (1979).
Mechanism of toxicity of putrescine in anacystis nidulans.
20. Hasel-Korn, C & Rotman-Denes, L.B. Annu. Rev. Biochem. 42 ; 397-458 (1973).
Protein Synthesis.
21. Hunter, A.R., Farrel, P.J. Jackson, R.L. y Hunt, T. Eur. J. Biochem. 75; 149-157 (1977).
The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system.

22. Igarashi, K. Matsuzaki, K. y Takeda, Y.
Biochem. Biophys. Acta. 254; 91-103 (1971).
Aminoacyl-transfer RNA formation I.
Absence of pyrophosphate-ATP exchange
in aminoacyl-tRNA formation stimulated by polyamines.
23. Igarashi, K, Matsuzaki, K. y Takeda Y.
Biochem. Biophys. Acta. 262; 476-487 (1972).
Aminoacyl transfer RNA formation II. Comparation of
the mechanisms of aminoacylations stimulated by polyamines
and Mg⁺⁺.
24. Igarashi, K. Sagawara, K. Izumi, I., Nagayama,
Ch. e Hirose, S. Eur. J. Biochem. 48; 495-502 (1974).
Effect of polyamines on polyphenylalanine synthesis
by E.coli and rat liver ribosomes.
25. Igarashi, K. Watanabe, Y., Matsumoto, E., Kogo, A.,
Yabuki, M. e Hirose, S. Biochem. Biophys. Res. Commun.
76; 18-25 (1977).
Responsibility of 16S RNA for the stimulation of
polypeptide synthesis by spermidine.
26. Igarashi, K. e Hirose, S. Adv. in polyamine
Research. 1; 243-254 (1978).
Mechanisms of polypeptide synthesis by spermidine
27. Igarashi, K., Eguchi, K., Tanaka, M.C.
Hirose, S. Eur. J. Biochem. 82; 301-307 (1978).
Effect of polyamines on isoleucyl-tRNA
formation by rat liver isoleucyl-tRNA synthetase.

28. Igarashi, K. Kojima, M., Watanabe, Y., Macda, K. e Hirose, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 480-486 (1980).
Stimulation of polypeptide synthesis by spermidine at the level of initiation in rabbit reticulocyte and wheat germ cell-free systems.
29. Isacksson, L.A. *Biochem. Biophys. Acta.* 312; 134-146 (1973).
Formation in vitro of 1-methylguanine in 23S RNA from E.coli. The effects of spermidine and two proteins.
30. Jakubowski, H. *Febs. Letters.* 103; 71-76 (1979).
A role for protein-protein interactions in the maintenance of active forms of aminoacyl-tRNA synthetases.
31. Jakubowski, H. *Febs. Letters.* 109; 63-65 (1980).
Polyamines and yellow lupin aminoacyl-tRNA synthetases.
32. Jay, G. y Kaempfer, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71; 3199 (1974).
Sequence of events in initiation of translation. A role for initiator transfer-RNA in the recognition of messenger RNA.
33. Kaempfer, R. Hollender, R., Abrams, W.R. e Israeli, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75; 209-213 (1978).
Specific binding of messenger RNA and methionyl-tRNA_f^{met} by the same initiation factor for eukaryotic protein synthesis.

34. Kayne, M.S. y Cohn, M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46; 1285-1291 (1972).
Cation requirements of isoleucyl-tRNA synthetase from E.coli.
35. Konecki, D. Kramer, G., Pinphanichakarn, P. y Hardesty, B. Arch. Biochem. Biophys. 169; 192-198 (1975)
Polyamines are necessary for maximum in vitro synthesis of globin peptides and play a role in chain initiation.
36. Lapointe, J. y Kern, D. Biochimie. 61; 1257-1272 (1979)
The twenty aminoacyl-tRNA synthetases from Escherichia coli. General separation procedure, and comparison of the influence of pH and divalent cation on their catalytic activities.
37. Leboy, P. & Glick J. Biochim. Biophys. Acta 435; 30-38 (1976).
tRNA methyltransferases from rat liver. Differences in response of partially purified enzymes to polyamines and inorganic salts.
38. Levin, D.Ht. Kyner, D. y Acs, G. J. Biol. Chem. 248; 6416-6425 (1973).
Protein synthesis initiation in eukaryotes.
Characterization of ribosomal factors from mouse fibroblasts.
39. Lipman F. y Nathans, D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47; 497-504 (1961).
Amino acid to protein on ribosomes of Escherichia coli.

40. Lucas-Lenard, J. & Lipman, F. *Annu. Rev. Biochem.* 40; 409-448 (1971).
Protein biosynthesis.
41. Malathi V.G. & Mazumder, R. *Biochim. Biophys. Acta.* 517; 228-235 (1978).
An inhibitor which interferes with the enzymatic aminoacylation of tRNA.
42. Mans, R.U. & Novelli, G.D. *Arch. Biochem. Biophys.* 94; 48-53 (1961).
Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by filter paper disk method.
43. Martin, R.G. & Ames, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48; 2171-2178 (1962).
The effect of polyamines and of poly U size on the phenylalanine incorporation.
44. Matsuzaki, K. & Takeda, Y. *Biochem. Biophys. Acta.* 308; 339-351 (1973).
Aminoacyl transfer RNA formation III. Mechanism of aminoacylation stimulated by polyamines.
45. Michalski, Ch. J., Sells, B.H. & Boyle S.M. *Can. J. Biochem.* 57; 250-254 (1979).
Influence of magnesium and polyamines on the reactivity of individual ribosomal subunit proteins of lactoperoxidase-catalyzed iodination.

46. Mohan, M.S. & Rechnitz, G.A. Arch. Biochem. Biophys. 162; 194-199 (1974).
Ion Electrode study of magnesium (II)-ATP and manganese (II)-ATP association.
47. Moruzzi, G. y Caldarera, C.M. Arch. Biochem. Biophys. 105; 209-210 (1964).
Occurrence of polyamines in the germs of cereals.
48. Moore, M.N., Sperrazza, J.M. y Spremulli, L.L. New Orelans-Lousiana. Federation Proceeding. Jun. 1-3 (1980).
Cation effects on wheat germ ribosomal subunit interactions.
49. Morris, D.R. & Jordstad C.M. Bacteriol 101; 731-737 (1970).
Influence of polyamine limitation on the chain growth rates of β -galactosidase and of its messenger ribonucleic acid.
50. Morris, D.R. y Hansen M.T. J. Bacteriol. 116; 588-592 (1973).
Isolation conditionally putrescine-deficient mutants of Escherichia coli.
51. Nirenberg, M. y Leder, P. Science 145; 1399-1407 (1964)
RNA codewords and protein synthesis.
52. Ochoa, S., Salas, M., Hille M.B. Lasty, J.A. y Whaba, A.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57; 387-394 (1967).
Translation of the genetic message, II. Effect of initiation factors on the binding of formyl-methionyl-tRNA to ribosomes.

53. Pastuszyn, A. Loftfield, R.B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47; 775-783 (1972).
Non-participation of aminoacyl-adenylates in the spermine catalyzed aminoacylation of transfer-RNA.
54. Pochon, F. & Cohen, S.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47; 720-726 (1972). 4-thiouridine and the conformation of E.coli tRNA by spermidine.
55. Quingley, G.J. Teeter, M.M. y Rich, A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75; 64-68 (1978).
Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer-RNA.
56. Robison, B. & Zimmerman, T.P. J. Biol. Chem. 246; 4664-4670 (1971).
Cation dependence of the transfer ribonucleic acid synthetase from baker's yeast.
57. Rogg N., Biochem Biophys. Acta 195; 13- (1969).
Isolation of mammalian transfer ribonucleic acids.
58. Rosano, C.L., y Hurwitz, Ch. J. Biol. Chem. 252 ; 652-654 (1977).
Antagonistic action between spermidine and putrescine on association and dissociation of purified, run-off ribosomes from Escherichia coli.
59. Roy, R., Gosh-Dastidar, P., Das, A., Yaghmai, B. y Gupta, N.K. J. Biol. Chem. 256; 4719-4722 (1981).
Protein synthesis in rabbit reticulocytes. Co-eIF-2A reverses mRNA inhibition of ternary complex [met-tRNA_f. eIF-2.GTP] formation by eIF-2.

60. Safer, B., Adams, S.L., Anderson, W.F. y Merrick, W.C.
J. Biol. Chem. 250; 9076-9082 (1975).
Binding of met-tRNA and GTP to homogeneous initiation factor M.P.
61. Schreier, M.H. & Staehelin, T. Nature 242; 35-38 (1973).
Initiation of eukaryotic protein synthesis:
[met-tRNA^f.40S ribosome] initiation complex catalyzed
by purified initiation factor in the absence of mRNA.
62. Siegelman, F. & Apiron D. J. Bacteriol. 105; 902-907
(1971).
Aurintricarboxylic Acid, a preferential inhibitor of
initiation of protein synthesis.
63. Smith, T.A. Biol. Rev. 46; 201-241 (1971).
The occurrence, metabolism and functions of polyamines in
plants.
64. Spremulli, L.L. Wathall, B.J. Lax, S.R. y Ravel, R.M.
J. Biol. Chem. 254; 143-148 (1979).
Partial purification of the factors required for the
initiation of protein synthesis in wheat germ.
65. Stanley, W.M. Jr. Methods Enzymol. 29; 530-547 (1974).
Specific aminoacylation of the methionine specific tRNA's
of eukaryotes.
66. Stulberg, M.P. & Novelli, G.D. Methods in Enzymology. V;
703-707 (1962).
Amino acid-activating enzymes: methods of assay.
67. Tabor, C.W. Biochem. Biophys. Res. Commun.
2; 117-120 (1960).
The stabilizing effect of spermine and the related amines
on mitochondria and protoplast.

68. Tabor, C.W. & Tabor, H. *Ann. Rev. Biochem.*; 285-300 (1976).
1,4 diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine.
69. Takeda, Y. & Igarashi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37; 917-924 (1969).
Polyamines and protein synthesis IV.
Stimulation of aminoacyl-transfer RNA formation by polyamines.
70. Trachsel, H. Erni, B., Schreier, M.H. y Stachelin, T.J. *Mo. Biol.* 116; 755-767 (1977).
Initiation of mammalian protein synthesis II.
The assembly of the initiation complex with purified initiation factors.
71. Treadwell B.V. & Robison, W.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65; 176-183 (1975).
Isolation of protein synthesis initiation factor M.P. from the high supernatant fraction of wheat germ.
72. Villanueva, V.R. Adlakha. R.C. y Cantera, S.A.M. *Phytochem.* 17; 1245-1249 (1978).
Changes in polyamine concentration during seed germination.
73. Weissbach, & Ochoa, S. *Ann. Rev. Biochem.* 45; 191-216 (1976).
Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis.
74. Young, D.V. & Srinivasan, P.R. *Biochem. Biophys. Acta.* 258; 447-463 (1971).
The effect of polyamines on the methylation of E.coli methyl-deficient transfer RNA by their homologous methylases.

75. Zubay, G.J. Mol.Biol. 4; 347 (1962).

The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid.

* Austin S.A. & Clemens, M.J. Febs Lett. 110; 1-6 (1980).
Control of the initiation of protein synthesis in mammalian cells.

* Reynolds, S.H., Dasgupta, A., Palmieri, S., Majumdar y Gupta, N.K. Arch. Biochem. Biophys. 184; 328-335 (1977).
Protein synthesis initiation in eucaryotic cells: A comparative site of the mechanism of peptide chain initiation using cell-free systems from mouse ascites tumor cells and rabbit reticulocytes.