

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

METODOS DE AISLAMIENTO, PURIFICACION Y FRACCIO-  
NAMIENTO DE ARN-t DE SERINA DE HIGADO DE RATA

REBECCA E. FRANCO Y BOURLAND

Q U I M I C O

1 9 7 3



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

FECHA 17/10  
REC 11-500

101



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	PROF. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL	PROF. ALEJANDRO BLANCO LABRA
SECRETARIO	PROF. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
1er. SUPLENTE	PROF. VICTORIA E. VALLES
2do. SUPLENTE	PROF. RUTH ROMAN PALACIOS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

SUSTENTANTE: REBECCA E. FRANCO Y BOURLAND

---

ASESOR DEL TEMA: DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

---

A MIS PADRES

A MI HERMANO

AL DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

A LA M. en C. VICTORIA VALLES DE BOURGES

A MIS MAESTROS

La realización de este trabajo fue posible gracias a un donativo otorgado por MEAD JOHNSON DE MEXICO, S.A. de C. V., - al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.....	1
I INTRODUCCION.....	2
II MATERIALES Y METODOS.....	12
1. ANIMALES.....	12
2. REACTIVOS.....	13
3. TECNICAS DE AISLAMIENTO DE ARN-t DE HIGADO - DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULA- DA CON HIERRO.....	13
Método A	13
Método B	16
Método C	19
4.- METODOS PARA LA PREPARACION Y CARACTERIZA CION DE LA FRACCION pH 5.0 DE HIGADO DE - RATA.....	21
A. Preparación de la fracción pH 5.0.	22
B. Caracterización de la fracción pH - 5.0.	23
a. Actividad enzimática.	23
b. Niveles endógenos de ARN-t y ATP.	23
c. Actividad ribonucleolítica.	24

5. AMINOACILACION DEL ARN-t.....	25
Condiciones de aminoacilación para el caso A.	25
Condiciones de aminoacilación para el caso B.	27
a. Análisis de las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G100.	27
b. Análisis de las fracciones eluidas de la columna de BD-celulosa.	28
Optimización de las condiciones de aminoacilación con L-leucina- <sup>14</sup> C y L-serina <sup>14</sup> C.	31
6. CROMATOGRAFÍA EN BD-CELULOSA.....	31
A. Preparación de la BD-celulosa.	31
B. Purificación y fraccionamiento del ARN-t <sup>Ser</sup> en BD-celulosa.	34
Purificación y fraccionamiento I	34
a. Preparación de la columna.	34
b. Prueba cromatográfica.	35
Fraccionamiento II del ARN-t <sup>Ser</sup> en BD-celulosa.	37
a. Preparación de la columna.	37
b. Prueba cromatográfica.	38
7. DIVERSAS TECNICAS EMPLEADAS EN EL CURSO - DE ESTE TRABAJO.....	38
A. Destilación del fenol.	38
B. Preparación de la bentonita.	39
C. Cromatografía en la columna de Sepha	

dex G100,	39
D. Desacilación del ARN-t.	40
E. Patrones de radioactividad para los ensayos de aminoacilación.	41
F. Soluciones de mezclas de aminoácidos.	41
8. METODOS EMPLEADOS EN LA CUANTIFICACION DE PROTEINA, ARN Y ADN.....	42
A. Determinación de proteína.	42
B. Cuantificación del ARN.	44
a. Cuantificación por el método colorimétrico de Mejbaum.	44
b. Cuantificación espectrofotométrica por absorción a 260 nm.	44
c. Equivalencias de las unidades empleadas en la cuantificación del ARN-t.	44
d. Incorporaciones teóricas máximas de un aminoácido a diferentes preparaciones de ARN-t.	46
C. Determinación del ADN.	47
III RESULTADOS.....	49
1. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE AISLAMIENTO DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.....	49
A. Rendimientos de ARN-t aislado por los métodos A, B y C.	49
B. Análisis cromatográfico en Sephadex G100.	51

a. Cromatografía del ARN-t aislado por el método A.	51
b. Cromatografía del ARN-t aislado por el método B.	51
c. Cromatografía del ARN-t aislado por el método C.	62
C. Capacidad aceptora de las preparaciones.	62
2. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN pH 5.0 DE HIGADO DE RATA.....	64
A. Tiempo óptimo de precipitación.	64
B. Rendimiento de la fracción pH 5.0.	66
C. Niveles endógenos de ATP y ARN-t en la fracción pH 5.0.	66
D. Actividad ribonucleolítica en la fracción pH 5.0.	69
E. Estabilidad de la fracción pH 5.0.	69
3. OPTIMIZACION DE LOS SISTEMAS DE AMINOACILACION CON L-LEUCINA- <sup>14</sup> C Y CON L-SERINA- <sup>14</sup> C.....	69
A. Optimización de las condiciones de la aminoacilación con L-leucina- <sup>14</sup> C.	72
B. Optimización de las condiciones de aminoacilación con L-serina- <sup>14</sup> C.	87
C. Importancia del estado funcional del ARN-t en los ensayos óptimos de aminoacilación.	87
4. COMPARACION DE LA INCORPORACION DE DIVER-	

SOS L-AMINOACIDOS- <sup>14</sup> C A PREPARACIONES CRUDAS DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO..	93
A. Comparación de la incorporación de la L-leucina- <sup>14</sup> C y de la L-serina- <sup>14</sup> C a ARN-t no desacilado y desacilado de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro.	93
B. Comparación de la incorporación de algunos L-aminoácidos- <sup>14</sup> C a preparaciones crudas de ARN-t desacilado de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro.	94
5. PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO DEL ARN-t DE SERINA DE HIGADO DE RATA NORMAL POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE BD-CELULOSA..	94
A. Purificación y fraccionamiento I.	94
B. Fraccionamiento II.	107
IV. DISCUSION.....	112
V. CONCLUSIONES.....	148
VI. BIBLIOGRAFIA.....	152

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ARN.....	ácido ribonucleico
ARN-m.....	ácido ribonucleico mensajero
ARN-r.....	ácido ribonucleico ribosomal
ARN-t.....	ácido ribonucleico de transferencia
ARN-t <sup>Fen</sup> .....	ácido ribonucleico de transferencia de fenilalanina
ATP.....	ádenosina-5'-trifosfato (sal dipotásica)
BD-celulosa.....	DEAE-celulosa benzoilada
bis-MSB.....	bis (O-metil-estiril) benceno
CTP.....	citidina-5'-trifosfato (sal disódica)
DEAE-celulosa.....	O-(dietilaminoetil) celulosa
EDTA.....	etilendiaminotetra-acetato de sodio -- (sal disódica)
Hepes.....	ácido N-2-hidroxi-etilpiperacina-N'-2- etanosulfónico
Leu.....	leucina
PPO.....	2,5 difeniloxazol
Ser.....	serina
Tir.....	tirosina
Tris.....	tris(hidroximetil)aminometano(2-amino- 2-hidroximetilpropano-1,3-diol)
Trp.....	triptofano

## I

INTRODUCCION

La ferritina es una proteína café-rojiza, que se encuentra ampliamente distribuida en los reinos vegetal y animal. Contiene cantidades variables de hierro, que pueden equivaler hasta un 25% del peso seco de proteína ( 1 ).

Vista al microscopio electrónico parece una cápsula, integrada por 24 subunidades idénticas de 18500 daltons de peso molecular, que encierra un núcleo denso a los electrones de un complejo coloidal de hidroxifosfato férrico cuya composición probable es  $(\text{FeOOH})_8 (\text{FeO PO}_3\text{H}_2)_2$  ( 2 ).

La ferritina tiene un papel muy importante en el metabolismo del hierro. En los mamíferos, desempeña dos funciones principales:

i.- Es un almacén intracelular temporal de hierro, en el que se deposita el exceso de dicho metal, que posteriormente es movilizado según las exigencias del organismo.

Existe un equilibrio dinámico entre el hierro de la ferritina y el hierro del plasma, que es transportado por la transferrina.

ii.- La ferritina es importante en la detoxificación del hierro libre, cuya presencia en el organismo es mortal. Esta función es posiblemente una de las razones que ha determinado su supervivencia a través de la evolución con muy pocos cambios estructurales.

Aparentemente, el nivel del hierro en el medio determina la cantidad de ferritina producida por la célula animal ( 2 ). Se ha visto que la administración aguda de hierro a diferentes organismos, induce la síntesis de la ferritina. (3, 4, 5).

Este fenómeno singular ha sido motivo de estudio - de gran número de investigadores, en su preocupación por establecer un posible modelo general de regulación de la síntesis de proteínas en los eucariotes.

El mecanismo de estimulación de la síntesis de la ferritina aún no se conoce. La evidencia actual concerniente a su síntesis y regulación, puede resumirse en los siguientes puntos:

i.- La ferritina se sintetiza en los polirribosomas libres. ( 6 ).

ii.- El hierro estimula la síntesis de novo de la parte proteínica de la molécula (apoferritina). ( 7 ).

iii.- El efecto estimulante del hierro desaparece-

totalmente en presencia de la cicloheximida, un potente inhibidor de la síntesis de proteínas. (4, 8).

iiii. El fenómeno de inducción no desaparece en presencia de la actinomicina D, administrada a una concentración de 1.5 ug/g de tejido, dosis que inhibe la transcripción en un 80%. ( 3 ).

La respuesta de la ferritina al estímulo con hierro no se altera en presencia de la actinomicina D y de hecho, la realza ( 4 ), por lo que se puede sospechar que la regulación de la síntesis es post-transcripcional.

Los parámetros sujetos a una posible regulación son:

i. Velocidad de transporte del ARN-m del núcleo al citoplasma.

ii. Velocidad de iniciación.

iii. Velocidad de elongación.

iiii. Velocidad de terminación o liberación de los péptidos.

Estudios por computadora han revelado que cuando el nivel de regulación es el de la traducción, el parámetro más factible de ser regulado es el de la velocidad de iniciación ( 9 ). La evidencia experimental apoya la hipótesis; aunque algunos sistemas, como el de la tirosina-amino-transferasa ( 10 ), son regulados a nivel de la terminación.

Rodríguez y Huberman ( 11 ) han observado la in--

ducción de la síntesis de la ferritina en el hígado de ratas hembras como respuesta a la administración de 50 mg de hierro (hierro-dextran) por vía intraperitoneal. Piensan que el nivel de regulación de la síntesis, es el de la iniciación, y han postulado varios mecanismos de estimulación posibles:

i. El ARN-m de la ferritina está bloqueado por una molécula, posiblemente de naturaleza proteínica, que impide la formación del complejo de iniciación. La función del hierro es desprender dicha molécula, en forma directa o indirecta, quedando el ARN-m libre para continuar en el proceso de síntesis.

ii. En presencia del hierro, alguno de los factores de iniciación sufren una alteración tal que aceleran la formación del complejo de iniciación con el mensajero de la ferritina, estimulando su síntesis.

iii. Partiendo de la hipótesis que la síntesis de la apoferritina del hígado de la rata se inicia con N-acetilserina, (secuencia terminal que ya ha sido identificada por Barahona y Huberman ( 12 ) y Huberman et al. ( 13 ), se puede pensar en la participación del N-acetil-seril-ARN-t como un ARN-t iniciador en la regulación de la síntesis de la ferritina. Esta entidad ha sido identificada en el hígado de la rata en regeneración ( 14 ) y en el hígado de la rata estimulada con hierro ( 15 ).

Es posible que el hierro induce un incremento en el nivel del N-acetil-seril-ARN-t a través de la inducción de una transacetilasa específica para la acetilación de una de las cuatro especies de ARN-t de serina, presentes en el hígado de la rata ( 16 ).

También puede ser que el hierro modifica a una de las especies de ARN-t de serina, quizás a través de la estimulación de una metilasa específica ( 17 ), transformación que permite su posterior acetilación y participación en la iniciación de la síntesis de la ferritina.

En base a un posible cambio en el ARN-t de serina, paralelo a la estimulación de la síntesis de la ferritina en presencia del hierro, se estableció la metodología descrita en este trabajo.

Los objetivos metodológicos fueron:

i. Establecer un método de aislamiento a gran escala de ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro. (Se define un animal estimulado con hierro como aquel al que se le administran 50 mg de hierro por vía intraperitoneal).

ii. Conocer las condiciones óptimas de aminoacilación de las preparaciones crudas de ARN-t con L-leucina-<sup>14</sup>C y L-serina-<sup>14</sup>C.

iii. Hallar un método cromatográfico adecuado para la purificación y el fraccionamiento del ARN-t de serina.

Las técnicas reportadas en la literatura para el aislamiento a gran escala de ARN-t de bacteria (18, 19) y de levadura (20, 21), no han sido satisfactorias para la preparación de ARN-t de mamífero ( 22 ). Por ello ha sido necesaria la modificación de los métodos tradicionales con el fin de obtener grandes cantidades de ARN-t de mamífero de lotes de tejido del orden de kilogramos (23, 24, 25).

Con estas técnicas se elimina uno de los principales obstáculos en el progreso de las investigaciones respecto a la naturaleza físico-química y a las funciones biológicas de los ARN-t de mamífero, restringidos hasta la fecha ca si exclusivamente a microorganismos.

Uno de los escasos estudios sobre la estructura de un ARN-t de un organismo superior, es el trabajo de Staehelin (26) en el que reporta la secuencia de los nucleótidos - de un ARN-t de serina de hígado de rata.

Existen varias técnicas cromatográficas que han encontrado gran aplicación en la purificación y en el fraccionamiento de los ARN-t.

La primera técnica empleada en el fraccionamiento del ARN-t, fue la de la distribución a contracorriente (27)- Esta se basa en la separación de las diferentes especies de ARN-t en dos fases líquidas, una acuosa y otra orgánica.

Aprovechando las propiedades hidrofóbicas del ARN-t, se ha tenido buen éxito en el fraccionamiento de las diferentes especies en columna de albúmina metilada adsorbida a kieselguhr (MAK) (28), técnica que ha mostrado un alto poder de resolución (29). El método ha sido mejorado, adsorbiendo la albúmina metilada a un soporte de ácido silícico (MASA) - (30), incrementando con ello la capacidad del sistema.

La cromatografía de partición también ha sido ampliamente utilizada en el fraccionamiento del ARN-t (31). El uso combinado de estas técnicas ha permitido aislar especies de ARN-t con alto grado de pureza (32, 33).

Las dos técnicas diseñadas ex-profeso para la puri

ficación y el fraccionamiento de los ARN-t han sido la cromatografía en fase reversa y la cromatografía en BD-celulosa.

En la cromatografía en fase reversa hay dos componentes (34). Un compuesto orgánico inmisible en agua está presente como una película sobre un soporte inerte (tierra de infusorios o dimetildicloro-silano, Chromosorb W) y una solución acuosa que al pasar a través de la columna, desarrolla el cromatograma.

La esterificación de los grupos hidroxilo de la DEAE-celulosa con grupos benzoilo, da un producto, la BD-celulosa, con propiedades de intercambiador aniónico que tiene una afinidad incrementada por grupos hidrofílicos, en especial por grupos aromáticos. Es por ello que la BD-celulosa constituye un medio cromatográfico muy útil en la purificación y en el fraccionamiento de los ARN-t. (35)

La aminoacilación del ARN-t es catalizada por las enzimas conocidas como aminoacil-ARN-t-sintetasas.

La acilación de preparaciones crudas de ARN-t con diferentes aminoácidos se realiza generalmente con preparaciones, también crudas, de las enzimas citadas anteriormente.

El conjunto de todas las aminoacil-ARN-t-sintetasas se aísla usualmente por precipitación a pH 5. El ARN-t endógeno de las preparaciones, que también precipita a este pH, se separa mediante un tratamiento con DEAE-celulosa (36) o por cromatografía en Sephadex G100 (37). Este paso es necesario con el fin de evitar cuantificaciones erróneas del producto de la reacción. Otra técnica para el aislamiento de las sintetasas involucra la purificación del sobrenadante post-ribosomal en una columna de DEAE-celulosa microgranular. (38). Las enzimas se fijan en la columna en presencia de una

solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, a pH 7.5. Después de varios lavados son desprendidas con una solución del mismo amortiguador, pero a pH 6.5. Esta técnica ha sido empleada por Pearson et al. (39) en el aislamiento a gran escala de la aminoacil-ARN-t-sintetasas.

Otras técnicas de aislamiento involucran la precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40), la ultra-centrifugación (41) y la cromatografía por afinidad (42).

Independientemente del método empleado para el aislamiento de las aminoacil-ARN-t-sintetasas, es importante asegurar la ausencia en dichas preparaciones, de nucleasas y otras enzimas, que pudieran ejercer un efecto inhibitorio sobre la aminoacilación.

Las condiciones de reacción de la aminoacilación requieren de una cuidadosa optimización, para asegurar el máximo rendimiento del aminoacil-ARN-t que se desea obtener. En condiciones de reacción subóptimas, es posible que ocurra una aminoacilación parcial o selectiva de uno o más isoaceptores de ARN-t (43, 44).

El peligro de una baja incorporación del aminoácido al ARN-t correspondiente, se ve incrementada cuando los integrantes del sistema de aminoacilación son preparaciones crudas de las aminoacil-ARN-t-sintetasas y del ARN-t.

Las condiciones óptimas varían para cada sistema. Hasta la fecha no se sabe la relación que guardan las condiciones establecidas como óptimas para los ensayos in vitro con las condiciones existentes in vivo.

En las pruebas de optimización debe prestarse especial interés en el establecimiento de las concentraciones óptimas absolutas del  $\text{Mg}^{+2}$  y del ATP, así como a la relación -

$Mg^{+2}/ATP$ . Las dos reacciones que constituyen la aminoacilación muestran una sensibilidad individual a la relación  $Mg^{+2}/ATP$ . Por ejemplo, la relación que resultó ser óptima para la reacción de aminoacilación con la treonil-ARN-t-sintetasa, dió lugar a un 50% de inhibición de la reacción de esterificación (99).

Otro factor importante en la aminoacilación, es la selección adecuada del amortiguador. Ciertas bases producen marcadas inhibiciones (46).

Una vez establecida la metodología, se procedió a establecer si las preparaciones crudas de ARN-t aisladas de hígado de rata estimulada con hierro, mostraban o no cambio en el nivel neto de ARN-t de serina en relación a su nivel en las preparaciones aisladas de hígado de rata normal.

Un incremento en la concentración neta del ARN-t de serina en el hígado de la rata estimulada con hierro, en relación a la concentración neta en el hígado de la rata normal, implicaría una regulación a nivel transcripcional. Ello no se opondría al efecto de la actinomicina D observada por varios autores (3,4,8), puesto que se sabe (46) que los niveles de actinomicina D necesarios para inhibir la síntesis del ARN-t son mucho mayores a 1.6 ug/g.

El hierro podría estar liberando un factor regulador en el genoma, permitiéndose con ello la transcripción acelerada de una o más de las especies de ARN-t de serina. En base a la hipótesis de la iniciación de la síntesis de la ferritina con N-acetil-seril-ARN-t, podría sospecharse un incremento específico en el nivel de esta especie de ARN-t de serina acetilable.

Se montó una técnica cromatográfica en BD-celulosa, que en el futuro permitirá hacer una determinación fina de -

los niveles de cada una de las especies de ARN-t de serina -  
provenientes de un sistema estimulado y compararlos con los-  
de un sistema normal.

## II

MATERIALES Y METODOS1. ANIMALES.

Se usan ratas albinas de la cepa Wistar, criadas en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición.

El ARN-t es aislado de hígados de ratas hembras normales y de hígados de ratas hembras estimuladas con hierro, con pesos entre 190 y 220 gramos (aprox. 2 meses de edad). La estimulación se produce por una inyección intraperitoneal Única de 50 mg. de hierro (Hi-Dex, complejo hierro-dextran hidrogenado, solución inyectable, 100 mg. de hierro elemental/ml; Mead Johnson de México). Antes de la administración del hierro, debe mantenerse a los animales en ayuno por espacio de 14 horas, sin suprimirles el agua. Durante las 4 horas de la estimulación<sup>+</sup>, las ratas son alimentadas "ad libitum!"; al cabo de este lapso, son sacrificadas y sus hígados son procesados como se indica más adelante.

+ Véase la nota al final del capítulo.

La fracción pH 5.0 se aísla de hígados de ratas macho normales, de 100 a 150 gramos de peso (aprox. 1 mes de edad).

## 2.- REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados se obtienen de fuentes comerciales y del mejor grado de pureza existente.

Para las aminoacilaciones se usan L-aminoácidos- $^{14}\text{C}$  uniformemente marcados, de la New England Nuclear Corporation:

NEC 279 L-leucina- $^{14}\text{C}$ ,	lote: 605-025,	260 mC/mmola
" " "	" 605-157,	262 "
" " "	" 605-271,	306 "
" " "	" 539-165,	260 "
NEC 286 L-serina- $^{14}\text{C}$ ,	lote: 605-087,	128 mC/mmola
" " "	" 539-083,	115.5 "
NEC 291 L-valina- $^{14}\text{C}$ ,	lote: 272-38A-15,	208.5 mC/mmola
NEC 280 L-lisina- $^{14}\text{C}$ ,	lote: 605-225,	260 mC/mmola
NEC 284 L-fenilalanina- $^{14}\text{C}$ ,	lote: 459-242,	370 mC/mmola

## 3. TECNICAS DE AISLAMIENTO DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.

### METODO A.

Este método está basado en el diseño por Sein et al. (47), que a su vez es una modificación del de Brunngraber (48). El aislamiento del ARN-t partiendo de la homogeneización de los tejidos enteros con fenol, da rendimientos más altos que cuando se desproteíniza la fracción pH. 5 o el so-

brenadante de la centrifugación a 105000 x g de homogenados de los tejidos.

Esta técnica de aislamiento de ARN-t involucra extracciones fenólicas, una precipitación fraccionada con isopropanol y un paso cromatográfico en una columna de DEAE-celulosa.

Todas las operaciones deben realizarse a 4°, a menos de que se indique lo contrario.

PRIMERA FASE. Se sacrificaron 20 ratas por golpe en la cabeza, seguido de la decapitación. Extraer los hígados y colocarlos en un volumen conocido de la solución amortiguadora usada para la homogeneización, la cual contiene NaCl 1M y EDTA 5 mM en Tris-HCl (Trizma base, Sigma) 0.1M, pH 7.5. Pesar los hígados y ajustar el volumen de la solución amortiguadora a 1.5 vol.

Se homogeneiza esta mezcla durante algunos segundos. Añadir 1.5 vol de fenol destilado y saturado con agua al 80%, conteniendo 0.1% de 8-hidroxiquinoleína. La mezcla se homogeneiza durante 90 segundo más.

Centrifugar el homogeneizado durante 15 minutos a 15000 x g. La fase acuosa se reextrae con un volumen igual de fenol agitando la mezcla vigorosamente durante 15 minutos. Se repiten las operaciones anteriores desproteinizando ahora por sólo 5 minutos. La fase acuosa obtenida después de la centrifugación, es precipitada con tres volúmenes de etanol al 96%. Dejar reposar a -20° durante toda la noche (mínimo de 3 horas.)

SEGUNDA FASE. El precipitado se colecta por centrifugación a 8000 x g durante 5 minutos. Se disuelve en acetato de sodio 0.3M, pH. 7.0, en una relación de 4ml/g de hígado. Esta resuspensión es lenta y requiere el uso de un ho-

mogenizador con émbolo flojo.

Añadir lentamente a esta solución 0.54 vol de isopropanol, agitando constantemente. Esta adición se hace a temperatura ambiente. Para esta operación, 1 vol se define como el volumen total de acetato de sodio 0.3M, pH 7.0, usado en la disolución del precipitado anterior.

Centrifugar la mezcla a 8000 x g durante 5 minutos. Descartar el precipitado. Añadir 0.44 vol de isopropanol al sobrenadante para tener una concentración final de isopropanol de 0.98 vol. Dejar reposar la mezcla a -20° durante toda la noche.

El precipitado, ARN-t con algunas impurezas, se centrifuga, lava y disuelve en el menor volumen posible de agua desionizada.

TERCERA FASE. El ARN-t es cromatografiado en una columna de DEAE-celulosa (Cellex D, Bio-Rad Laboratories).

Preparación de la DEAE-celulosa. Se pesan 15g de DEAE-celulosa y se resuspenden en 500 ml. de NaOH 1N. Después de sedimentadas las partículas más gruesas, se decanta el líquido superior y se añaden 500 ml. más de NaOH 1N. Se repite esta operación dos veces más, pero ahora con HCl 1N. Lavar la celulosa varias veces con agua y equilibrarla finalmente con la solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M, pH 7.5 (49).

Características de la columna de DEAE-celulosa. Ver tir la DEAE-celulosa equilibrada en un tubo de vidrio de dimensiones 26 x 2 cm. hasta que la celulosa empacada tenga una altura de 20 cm. Equilibrar la columna hasta que el flujo del eluyente sea constante y del orden de 30 ml/hr. Colectar fracciones de 2 ml.

Cromatografía en DEAE-celulosa. El total del ARN-t aislado del hígado de 20 ratas (60-80 mg), disuelto en 2.5ml de agua desionizada, es aplicada a la columna de DEAE-celulosa. La columna se lava con 100 ml de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, seguidos de 100 ml. de la misma solución amortiguadora conteniendo NaCl 1M. Esta concentración de sal desprende al ARN-t de la DEAE-celulosa.

La densidad óptica de la muestra eluída, se registra a 260 nm. Se toman alícuotas de 5 ó 50 ul de las fracciones eluidas. Se aforan con 1ml de agua desionizada. Su absorbencia se mide a 260 nm. Las fracciones con una densidad óptica mayor a 0.05, son reunidas y precipitadas con 3 vol de etanol al 96%. Se deja reposar la mezcla durante toda la noche a -20°, (Fig. 1)

Recuperar el precipitado por centrifugación y re-suspenderlo en el menor volumen de agua desionizada. Dializar la solución contra agua durante un mínimo de 3 horas. La preparación se reparte en pequeñas fracciones y se almacena a -20°.

La pureza de la preparación se determina por cromatografía en columna de Sephadex G100, técnica que se describe más adelante.

#### METODO B.

Este método está basado en el de Delihias y Staehelein (50), según la modificación hecha por Fink et al, (51).

La técnica se fundamenta en el aislamiento del ARN-t a través de los siguientes pasos de purificación: extracción con fenol, resuspensión selectiva en NaCl 1M y cromatografía en Sephadex G100.

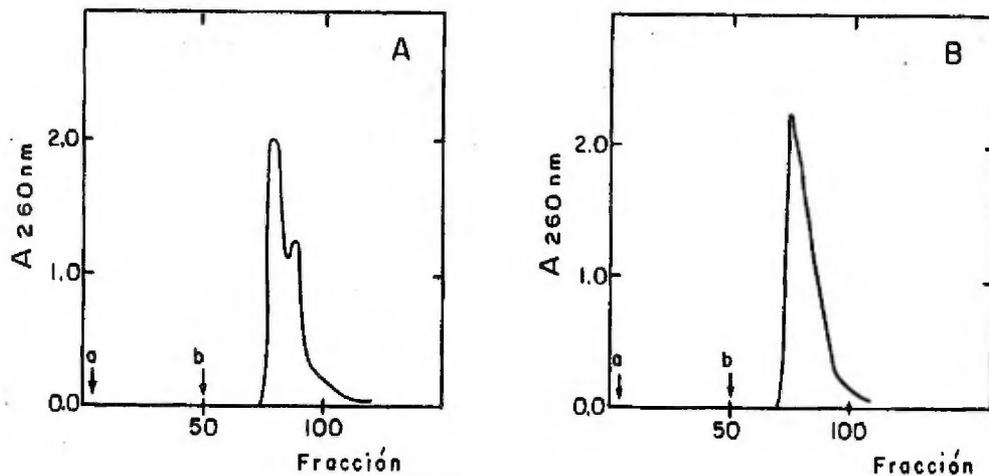


FIG. 1. CROMATOGRAFIA DE ARN-t EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA. A una columna de 20 x 2 cm. se aplicaron: A. 78 mg de ARN-t de hígado de rata normal; - B. 61 mg de ARN-t de hígado de rata estimulada con hierro. Ambos fueron eluidos con: a. Tris-HCl 0.1M, pH 7.5; y b. Tris-HCl 0.1M pH 7.5, NaCl 1M. Las demás condiciones de la cromatografía se especifican en el texto.

Deben realizarse las operaciones a 4°, a menos de que se indique lo contrario.

PRIMEA FASE. Se sacrifican 20 ratas por golpe en la cabeza y decapitación. Se extraen los hígados y se colocan en un volumen conocido de la solución amortiguadora -- Tris-HCl 0.01M, pH 7.0, con sacarosa 0.3M y 0.04% de bentonita, preparada según el método de Fraenkel-Conrat (52), el cual se describirá posteriormente.

Pesar los hígados y ajustar el volumen de la solución amortiguadora a 2. Homogeneizar la mezcla durante algunos segundos en una licuadora Waring. Añadir 2 vol de fenol-destilado y saturado con agua conteniendo 0.1% de 8-hidroxi-quinoleína. Homogeneizar por 2 minutos más a la velocidad máxima:

Agitar vigorosamente el homogeneizado a temperatura ambiente durante 1 hora; centrifugar a 13000 x g durante 25 minutos. La fase acuosa se reextrae tres veces con  $\frac{1}{2}$  vol de fenol saturado con agua, más 0.1% de 8-hidroxi-quinoleína y 0.1% de dodecil - sulfato de sodio, agitando vigorosamente una vez durante 1 hora y dos veces durante  $\frac{1}{2}$  hora.

La fase acuosa obtenida se precipita con 0.1 vol de acetato de sodio 2M, pH 5.0 y 2 vol de etanol al 96%. La mezcla se deja reposar a -20°, durante 4 horas o más.

SEGUNDA FASE. El precipitado se recupera por centrifugación a 13000 x g por 30 minutos. Se resuspende en -- NaCl 1M en una relación de 40 ml/100g de hígado. La mezcla se agita suavemente durante 8 horas.

TERCERA FASE. El material insoluble, principalmente ARN-t, se elimina por centrifugación a 13000 x g durante 30 minutos. El material soluble en el NaCl 1M, se precipita con 2 vol de etanol al 96%. La mezcla se deja reposar a -20° durante un mínimo de 3 horas.

CUARTA FASE. El precipitado se recupera centrifugando 30 minutos a 13000 x g. El ARN-t de dicho precipitado es separado de las impurezas que junto con él se resuspenden en el NaCl 1M, por cromatografía en Sephadex G100.

EL ARN-t puro se resuspende en el menor volumen de agua desionizada y se dializa contra esta misma. Finalmente se almacena la preparación en pequeñas fracciones a -20°.

### METODO C.

Basado en la técnica de Rogy et al. (23).

En este método, el aislamiento del ARN-t se logra a través de las siguientes etapas de purificación: extracción fenólica, cromatografía en DEAE-celulosa microgranular y precipitación fraccionada con isopropanol.

PRIMERA FASE. En esta fase las operaciones se realizan a temperatura ambiente.

Se sacrifican de 65 a 70 ratas (en lotes de 20 en 20). Se obtienen aproximadamente 500 g de hígado. Colocar el tejido en un volumen conocido de la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M, pH 7.0 con 0.04 de bentonita. Homogeneizar los hígados durante 30 segundos en la misma solución llevada a 1.5 vol, añadiendo 0.45 vol de sacarosa 1M. Agregar 1.5 vol de una mezcla fenol-agua (73:27, v/v), con 0.1% de 8-hidroxiquinoleína. Homogeneizar la mezcla por 2 minutos más a la velocidad máxima.

El homogeneizado se transfiere a un frasco con tapón esmerilado y se agita vigorosamente durante 1 hora. Centrifugar a 2000 x g por una hora. Precipitar el sobrenadante con 0.1 vol de acetato de potasio 2M, pH 5.0 y 2 vol de etanol al 96%.

Dejar reposar durante toda la noche a 4°.

SEGUNDA FASE. Se elimina el mayor volumen posible de sobrenadante por succión. Recuperar el precipitado por centrifugación a 3000 x g y a 4°, temperatura a la cual se deben realizar los demás pasos de la purificación, a menos de que se indique lo contrario. El precipitado se lava 3 veces con etanol al 96% y 3 con éter.

El residuo se seca al vacío y se disuelve en 0.6 vol de acetato de potasio 0.1M, pH 5.0 (medida tomada en relación al peso total de hígados). Este proceso lleva toda una noche.

TERCERA FASE. El material insoluble se elimina por centrifugación a 12000 x g durante 30 minutos y a 0°. El sobrenadante se purifica con DEAE-celulosa microgranular (DE-52, Whatman).

Preparación de la DEAE-celulosa microgranular. La DEAE-celulosa microgranular es una celulosa prehinchada que como único tratamiento, debe ser equilibrada en una solución amortiguadora 10x más concentrada que la solución amortiguadora empleada en la cromatografía.

Así, pues, se equilibró la DEAE-celulosa en una solución de acetato de potasio 1M, pH 5.0. Después se la equilibró en esta solución 10x más diluida, para su empleo en la purificación del sobrenadante de la centrifugación a 12000xg, anterior.

Purificación con DEAE-celulosa microgranular. El sobrenadante obtenido de la centrifugación a 12000xg, se mezcla con 10g de DEAE-celulosa por cada 100 g de hígado. Agitar la mezcla durante 1 hora.

Recuperar el adsorbente por centrifugación y lavar lo con acetato de potasio 0.1M, pH 5.0, hasta que el eluyente salga claro. Repetir el proceso con acetato de potasio --

0.1M, pH 5.0 más NaCl 0.3M.

Finalmente, el ARN-t y las impurezas que lo acompañan se desprenden de la celulosa con NaCl 1M; disuelto en el amortiguador ya mencionado. Se repite esta operación tantas veces sea necesario, hasta que la absorbencia del eluyente a 260 nm sea menor de 0.5.

Se combinan los eluyentes obtenidos en presencia del NaCl 1M y se precipitan con 2 vol de etanol al 96%. Se deja reposar la mezcla durante toda la noche.

CUARTA FASE: El precipitado se recupera por centrifugación. Se lava tres veces con etanol al 96% y tres con éter. El residuo se seca con una corriente de  $N_2$ , se pesa y se disuelve a temperatura ambiente en 50 ml de acetato de sodio 0.3M, pH 7.0 por gramo de polvo seco.

A esta solución se adicionan 0.54 vol de isopropanol. El precipitado se elimina por centrifugación. Adicionar 0.44 vol de isopropanol y dejar precipitando durante toda la noche a 4°.

QUINTA FASE. El precipitado se recupera por centrifugación. Lavarlo 3 veces con etanol y 3 con éter.

Finalmente se seca con una corriente de  $N_2$  y se resuspende en el menor volumen posible de agua desionizada. La solución se fracciona y almacena a -20°.

La pureza de las preparaciones de ARN-t se determina por cromatografía en Sephadex G100.

#### 4. MÉTODOS PARA LA PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LA FRACCION pH 5.0 DE HIGADO DE RATA.

La fracción pH 5.0 es la fuente de las aminoacil-ARN-t-sintetasas, empleadas en forma cruda para catalizar -

las reacciones de aminoacilación realizadas en el curso de este trabajo.

#### A. PREPARACION DE LA FRACCION pH 5.0

Sacrificar 6 ratas jóvenes por golpe en la cabeza, seguido de la decapitación. Extraer los hígados y colocarlos inmediatamente en un baño de hielo. Todos los pasos subsecuentes deben realizarse a 4°.

Se pesan los hígados, se pican y se homogeneizan en 2 vol de la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05M, pH-7.6, sacarosa 0.25M, MgCl<sub>2</sub> 5mM y KCl 25mM. El homogeneizado se centrifuga 30 minutos a 14500xg.

Centrifugar el sobrenadante a 270000xg (prom.), durante 30 minutos. Extraer el sobrenadante postmicrosomal cuidadosamente del tubo con una jeringa, para evitar su contaminación con la capa lipídica que queda en la parte superior.

Ajustar el pH de esta fracción a 5.0 con ácido acé tico 1N, goteando el ácido lentamente y con agitación cons tante para evitar la desnaturalización local de las enzimas. Este paso debe realizarse manteniendo al sobrenadante postmi crosomal en un baño de hielo. El potenciómetro debe calibrar se previamente a 4°.

Inmediatamente después de ajustado el pH, recupe rar el precipitado centrifugado a 1350xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en el menor volumen posible de la solución amortiguadora pH 7.6 (no más de 20 ml para evi tar la desnaturalización por dilución de las enzimas).

La solución enzimática se trata con DEAE-celulosa- equilibrada con la solución amortiguadora pH 7.6.

Preparación de la DEAE-celulosa. La DEAE-celulosa- usada en la purificación de la fracción pH 5.0 con el fin de

eliminar el ARN-t endógeno de las preparaciones no requiere de un pretratamiento con ácido o base. Se equilibra directamente con la solución amortiguadora pH 7.6 durante una noche; se lava tres veces más con la misma solución para eliminar - las partículas finas.

Purificación de la fracción pH 5.0 con DEAE-celulosa. Mezclar la solución enzimática y la DEAE-celulosa en una relación de 100 mg de celulosa por mililitro del preparado - enzimático. Agitar la mezcla durante 30 minutos.

Separar la DEAE-celulosa por centrifugación a - - 1350xg durante 10 minutos. Adicionar 2-mercaptoetanol al sobrenadante, a una concentración final de 0.01M (aprox. 10 ul de 2-mercaptoetanol (Sigma), por cada 10 ml de la solución - enzimática).

Concentrar la solución en una celdilla de ultrafiltración Amicon, modelo 52, usando una membrana Diaflo XM 50- y aplicando una presión de  $N_2$  de 3.5 kg/cm<sup>2</sup>.

Almacenar la fracción pH 5.0 en 50% de glicerol, - distribuida en fracciones de 200 ul, a -20°.

## B. CARACTERIZACION DE LA FRACCION pH 5.0.

### a. Actividad enzimática.

La actividad enzimática de la fracción pH 5.0 se - determina por su capacidad para catalizar la aminoacilación- de diversos aminoácidos en las condiciones de reacción óptimas para cada uno de ellos. Estas se describen más adelante.

### b. Niveles endógenos de ARN-t y ATP.

Los niveles endógenos de ARN-t y ATP en las prepa-

raciones enzimáticas de las aminoacil-ARN-t-sintetasas se de terminan por la capacidad de dichas preparaciones para cata- lizar las aminoacilaciones en las que se ha omitido alguno - de estos dos componentes fundamentales de la reacción.

Los valores de incorporación así obtenidos repre- sentan el valor de fondo de las aminoacilaciones realizadas- en presencia de todos los componentes de la reacción.

### c. Actividad ribonucleolítica.

La actividad ribonucleolítica de la fracción pH - 5.0 se determina por el grado de hidrólisis de una muestra - de ARN-t, incubado en presencia de dicha fracción.

Se mezclan 0.3 mg de ARN-t y 0.45 mg de la frac- - ción pH 5.0, aforándose el volumen a 250 ul con agua desioni- zada. Se incuba el sistema a 37°. Tanto las concentraciones del ARN-t y de la enzima, como la temperatura de incubación- son las óptimas para la aminoacilación.

Se toman alícuotas de 50 ul a los tiempos (en minu- tos) 0, 5, 10, 15 y 20 y se llevan a tubos que contienen 50 ul de ácido tricloroacético al 10%.

Las muestras se centrifugan a 1350xg durante 10 mi- nutos. Se toman alícuotas de 50 ul y se aforan a 1 ml con - agua desionizada en celdillas de cuarzo de 1 cm. Se mide su absorbencia a 260 nm, usando como blanco una solución que - contiene ácido tricloroacético y glicerol en las mismas pro- porciones en las que estas substancias se encuentran presen- tes en los sistemas incubados. Ambos absorben a 260 nm.

Paralelamente con la prueba anterior deben incubarse sistemas que contengan sólo uno de los componentes, ya sea el ARN-t o la fracción pH 5.0. Estos sistemas deberán manipularse en la forma ya descrita para los sistemas que contienen la mezcla.

#### 5. AMINOACILACION DEL ARN-t.

Las aminoacilaciones del ARN-t fueron hechas en dos formas, según su finalidad:

A. Comparar las incorporaciones de diferentes aminoácidos a muestras de ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro.

B. Identificar las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G100 y de la columna de BD-celulosa.

#### CONDICIONES DE AMINOACILACION PARA EL CASO A.

Los sistemas de aminoacilación óptimos para los diferentes aminoácidos fueron integrados según se indica en la Tabla. 1a.

Los reactivos, sin la enzima, se mezclan en frío. La reacción se inicia con la adición de la enzima y se lleva a cabo a 37° durante 15 minutos.

La reacción se detiene sumergiendo el sistema en un baño de hielo, diluyéndolo con 0.5 ml de agua desionizada fría y adicionándole 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10%, también frío.

CONDICIONES OPTIMAS DE AMINOACILACION: CASO A<sup>a</sup>.

	<u>L-LEUCINA</u>	<u>L-SERINA</u>	<u>L-VALINA</u>	<u>L-LISINA</u>
Tris-HCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
pH	7.0	7.5	7.5	7.5
MgCl <sub>2</sub> <sup>b</sup>	3 mM	15 mM	15 mM	25 mM
ATP <sup>c</sup>	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
ARN-t <sup>d</sup>	1.14 mg/ml	1.14 mg/ml	1.14 mg/ml	1.14 mg/ml
a.a. <sup>14</sup> C <sup>e</sup>	9.5 nm/ml	40.0 nm/ml	41.9 nm/ml	38.6 nm/ml
Max.a.a. <sup>f</sup>	2 nm/ml, c/u	2 nm/ml, c/u	2 nm/ml, c/u	2 nm/ml, c/u
Fracción pH 5.0 <sup>g</sup>	variable	variable	variable	variable

- a. En un volumen final de 50 µl (añorados con agua desionizada), incubados a 37° durante 15 minutos.
- b. La concentración fluctúa ligeramente según el volumen de la fracción pH 5.0.
- c. Sal dipotásica, neutralizada con Tris-HCl 0.05M, pH 6.8, solución empleada en todas las aminoacilaciones realizadas en este trabajo.
- d. Concentración óptima de ARN-t, hallada experimentalmente.
- e. Actividad específica (mM/Amola): L-leucina-<sup>14</sup>C, 269; L-serina-<sup>14</sup>C, 198; L-valina-<sup>14</sup>C, 209.5; L-lisina-<sup>14</sup>C, 260.
- f. 18 aminoácidos, menos asparagina y el aminoácido radioactivo correspondiente.
- g. La concentración proteínica óptima fluctúa entre 1.3 y 1.4 µg/ml, según su actividad enzimática.

El aminoacil-ARN-t formado se mide como la cantidad de aminoácido radioactivo insoluble en ácido, recuperada en discos de fibra de vidrio de 24 mm de diámetro (GF/A, - - Whatman).

Se asegura la máxima recuperación reproducible, - así como el mínimo de contaminación de aminoácido radioactivo libre, lavando cada tubo de ensayo tres veces con ácido - tricloroacético al 5%, así como el precipitado sobre el disco.

Se secan los discos bajo una lámpara de radiación-infrarroja. La radiactividad se mide en 10 ml de la solución centelleante de tolueno (4 g de PPO, grado centelleante, New-England Nuclear; 81.63 mg de bis-MSB, New England Nuclear; - ambos aforados a un litro con tolueno).

Cada muestra se cuenta por dos minutos en un espectrómetro de centelleo líquido Packard, modelo 3003, en condiciones de eficiencia máxima para el carbono 14, de 86%.

#### CONDICIONES DE AMINOACILACION PARA EL CASO B.

##### a. Análisis de las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G100.

Las fracciones eluidas de la columna de Sephadex - G100 se identifican por su capacidad de incorporación de diferentes aminoácidos radioactivos. Las condiciones de reacción se resumen en la Tabla 2a.

Se toman alícuotas de 20 ó 100 ul directamente de cada una de las fracciones eluidas de la columna, sin concentrar. Se mezclan con una alícuota de una de las soluciones -

de sales (Tabla 2b). El volumen de los ensayos de 0.1 ó 0.5 ml, se completa con agua desionizada. Los componentes de -- los sistemas se mezclan en frío.

Antes de iniciar la reacción con la adición de la fracción pH 5.0, se equilibran los sistemas a la temperatura de incubación, de 37°, durante 5 minutos. La aminoacilación se lleva a cabo en 20 minutos. La reacción se para enfriando las muestras a 4°, diluyéndolas con 0.5 ml de agua fría y precipitando el producto con 0.6 ó 1 ml de ácido tricloroacético al 10%, también frío.

El precipitado se recupera en discos de fibra de vidrio de 24 mm de diámetro y se lava, seca y cuenta tal y como se indica para el caso A.

b. Análisis de las fracciones eluidas de la columna de BD-celulosa.

Las fracciones eluidas de la columna de BD-celulosa requieren ser concentradas por dos motivos:

1. El ARN-t se encuentra muy diluido.
2. La concentración de NaCl es muy alta. Se sabe que concentraciones altas de la sal ejercen un efecto inhibitorio sobre la reacción de la aminoacilación.

Las muestras se concentran en la siguiente forma:

Cada fracción es precipitada con 0.1 vol de acetato de potasio 2M y 2 vol de etanol al 96%. Se dejan reposar durante una noche a 4°.

Los precipitados se recuperan en discos Millipore,

TABLA 2a .

CONDICIONES DE AMINOACILACION PARA LA IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES  
MOVILES DE LA COLUMNA DE SEFALDEX GYRO.

1. SOLUCIONES DE SALES.

	<u>SOLUCION A (1)</u>	<u>SOLUCION B (2)</u>	<u>SOLUCION C (3)</u>
Tris-HCl	50 mM	50 mM	100 mM
pH	7.5	7.5	7.5
MgCl <sub>2</sub>		10 mM	10 mM
ATP	5 mM	4 mM	4 mM
CTP	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
CKI	50 mM	50 mM	50 mM
a.a. <sup>14</sup> C	110 nm/ml	320 nm/ml	108 nm/ml
Mez. a.a.	-	5 mM, c/u.	-
Vol final <sup>+</sup>	5 ml	10 ml	5 ml

Actividad especifica (mC/nmola): L-leucina-<sup>14</sup>C, 306; L-serina-<sup>14</sup>C, 115.5; L-fenilalanina-<sup>14</sup>C, 370.

+ Aforo con agua desionizada.

TABLA 2b .

CONDICIONES DE AMINOACILACION PARA LA IDENTIFICACION DE LAS  
FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA DE SEPHADE G100.

II. SISTEMAS DE REACCION.#

ENSAYO CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C (1a).

50 µl solución (1a)<sup>†</sup>  
 20 µl fracción eluida<sup>††</sup>  
 x<sup>†††</sup> µg fracción pH 5.0  
 100 µl volumen final<sup>†</sup>

ENSAYO CON L-SERINA-<sup>14</sup>C (2).

100 µl solución (2)<sup>†</sup>  
 100 µl fracción eluida<sup>††</sup>  
 x<sup>†††</sup> µg fracción pH 5.0  
 500 µl volumen final<sup>†</sup>

ENSAYO CON L-FENILALANINA-<sup>14</sup>C (3).

100 µl solución (3)<sup>†</sup>  
 100 µl fracción eluida<sup>††</sup>  
 x<sup>†††</sup> µg fracción pH 5.0  
 500 µl volumen final<sup>†</sup>

Los sistemas se incuban a 37° durante 20 minutos.

Ver Tabla 2a.

Ver Materiales y Métodos (pág. 28 ).

La concentración de la fracción pH 5.0 es variable y depende de su actividad enzimática.

Aforo. con agua desionizada.

HAWP 02600, HA 0.45 u, de 25 mm de diámetro. Lavarlos tres veces con etanol al 96%. Secar los discos y resuspender el precipitado en 0.5 ml (muestras fraccionadas) o en 1 ml muestras purificadas) de agua desionizada.

A cada fracción concentrada, se le determina su capacidad de incorporación de serina. Ello permite establecer el grado de pureza de la fracción después de su cromatografía en BD-celulosa. Las condiciones de aminoacilación se especifican en la Tabla 3a.

OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMINOACILACION CON L-  
LEUCINA - <sup>14</sup>C Y L-SERINA - <sup>14</sup>C.

Las condiciones de aminoacilación de los ensayos encaminados a la optimización de las condiciones de incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C y de L-serina-<sup>14</sup>C, se describen en la sección de Resultados.

6. CROMATOGRAFIA EN BD-CELULOSA.

A. PREPARACION DE LA BD-CELULOSA.

Suspender 250 g de BD-celulosa (Boehringer Mannheim, 15318 HTAD) en aproximadamente 1 l de etanol al 96%. Dejar sedimentar durante una hora, con el fin de eliminar las impurezas que la contaminan, como son el ácido benzoico, el anhídrido benzoico, piridina, cloruro de piridinio y materiales coloridos de constitución desconocida.

Se decanta la mayor parte del sobrenadante, eliminando las partículas finas. Filtrar la BD-celulosa a través-

TABLA 3a .

CONDICIONES OPTIMAS DE AMINOACILACION PARA LA IDENTIFICACION DE LAS UNIDADES DIFERENTES DE LAS CADENAS DE BD-CELULOSA."

I. SOLUCION DE SALES (1b).

Tris-HCl	50 mM, pH 7.5
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
ARP	15 mM
GTP	0.5 mM
KCl	50 mM
L-serina- <sup>14</sup> C	40 nm/ml
Vol Final	5 ml

II. ENSAYO CON L-SERINA-<sup>14</sup>C (1b).

50	µl solución (1b)
50	µl fracción eluida y concentrada <sup>+++</sup>
50	µl fracción pH 5.0
105	µl volumen final <sup>†</sup>

L-serina-<sup>14</sup>C, 128.0 mC/mmola.

# Purificación y fraccionamiento I; Fraccionamiento II.

+ Aforo con agua desionizada.

++ Los sistemas se incuban a 37° durante 20 minutos.

+++ Ver Materiales y Métodos (pág. 29).

† La concentración de la fracción pH 5.0 es variable y depende de su actividad enzimática.

un doble filtro de papel en un Büchner, casi a secuedad. Resuspender la celulosa en 500 ml de una solución que contiene 80% de NaCl 2M y 20% de etanol al 96%. Dejar reposar durante 1 ó 2 horas.

La normalización del tamaño de las partículas depende del uso que se va a dar a la BD-celulosa. Para separaciones a granel se usan partículas que pasan a través de un tamiz de malla 30 (0,6 mm de abertura). Las separaciones cromatográficas requieren de partículas más finas. El material que pasa a través de un tamiz de malla 50 (0,3 mm de abertura), es el usado para la separación en columnas grandes. En columnas de diámetro pequeño, se puede mejorar la resolución notablemente empleando material aún más fino, como el que atraviesa una malla 100 (0,15 mm de abertura) (53).

Para el caso específico de este trabajo, se montan columnas para la purificación y el fraccionamiento del ARN-t. Consecuentemente las partículas de BD-celulosa útiles, son las que atraviesan una malla de 50 y son retenidas por una de 100.

Las partículas útiles son resuspendidas en etanol al 96%. Se filtran en un Büchner a través de 2 filtros de papel Whatman # 1 y se lavan con etanol hasta que el filtrado salga claro. Los primeros mililitros del lavado tienen una coloración amarilla. Se consume 1 l de etanol por cada 50 g. de BD-celulosa.

Continuar el lavado de la BD-celulosa con una solución de NaCl 2M y 20% de etanol (1 l por cada 50 g. de BD-celulosa).

Tomar una alícuota del lavado y medir su densidad-

Óptima a 260 nm. La absorbencia no debe exceder de 0.05. -- Ello indica que la celulosa está suficientemente pura para ser usada en las pruebas cromatográficas.

Eliminar el líquido en el que está suspendida la celulosa filtrándola en un Büchner y resuspenderla en la solución amortiguadora inicial del proceso de purificación o de fraccionamiento, según sea el caso.

La BD-celulosa debe almacenarse en NaCl 2M y en etanol al 20%. No deben usarse tolueno ni cloroformo como preservativos, ya que estos agentes alteran la estructura del material (53).

#### B. PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO DEL ARN-t<sup>Ser</sup> EN BD-CELULOSA.

El aislamiento de las especies de ARN-t<sup>Ser</sup> se realiza en columnas de BD-celulosa. Involucra una purificación y una secuencia de dos pasos de fraccionamiento, descritos como métodos I y II.

La técnica de purificación tiene como fundamento el comportamiento casi exclusivo de los ARN-t<sup>Ser</sup> en columnas de BD-celulosa, libres del ión Mg<sup>+2</sup>. En estas condiciones, los ARN-t<sup>Ser</sup> permanecen fijos a la celulosa.

Por otra parte, los dos pasos de fraccionamiento requieren de la presencia de dicho metal.

#### PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO I.

##### a. Preparación de la columna.

Una vez purificada la BD-celulosa, se equilibra en

la solución amortiguadora A con NaCl 0.20M. Se denomina solución amortiguadora A a la solución de acetato de sodio 0.05M, pH 4.5 y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1mM.

Suspendida en esta solución, se vierte la BD-celulosa en una columna de dimensiones de 30 x 1.5 cm. Se empaca la celulosa a una altura de 25 a 28 cm. Se equilibra el sistema durante una noche con la misma solución amortiguadora. Estas y las demás operaciones de purificación y fraccionamiento I, se realizan a una temperatura entre 2 y 4°.

El flujo de la columna se ajusta a 30 ml/hr. mediante una bomba peristáltica. Se colectan fracciones de 10 ml.

#### b. Prueba cromatográfica.

Ambas operaciones, la purificación y el fraccionamiento I, comprenden un mismo proceso cromatográfico.

La concentración de la muestra aplicada a la columna no debe ser mayor de 1-2 mg/ml/cm<sup>2</sup>, debido a que el ARN-t es un polianión que puede actuar como eluyente (54).

Los ARN-t comienzan a eludir de las columnas de BD-celulosa a una concentración de NaCl de 0.5M. (54).

Tomando en cuenta estos dos hechos, la muestra de los ARN-t crudos fue aplicada disuelta en 25 ml de la solución amortiguadora A con NaCl 0.2M.

#### Primera Etapa.

La primera etapa involucra la separación del - -

ARN-t<sup>Ser</sup> de la mayoría de los demás ARN-t. Esta se realiza con un gradiente lineal de NaCl de 0.20 M a 1.0 M, disuelto en la solución amortiguadora A. El volumen del gradiente es de 10x el volumen de la columna, o sea de 500 ml. En general el volumen del gradiente en los procesos cromatográficos en BD-celulosa debe ser de 8 a 25x el volumen de la columna. -- (54)

La elución total del ARN-t en esta fase requirió de 350 ml más de la solución amortiguadora A con NaCl 1.0M.

#### Segunda Etapa.

Una vez eluida la mayor parte del ARN-t, se equilibra la columna con la solución amortiguadora A más NaCl -- 0.175 M (250 ml).

#### Tercera Etapa.

Equilibrar la columna con la solución amortiguadora A más NaCl 0.175 M y MgCl<sub>2</sub> 10mM. (250 ml).

#### Cuarta Etapa.

El ARN-t<sup>Ser</sup>, retenido en la columna durante las primeras etapas del proceso, es fraccionado parcialmente. Esto se logra combinando el uso de dos gradientes lineales, -- uno a base de NaCl exclusivamente y otro a base de NaCl más-etanol, ambos gradientes en presencia de MgCl<sub>2</sub> 10mM.

Gradiente lineal de NaCl. El fraccionamiento parcial se inicia con un gradiente de NaCl de 0.2 a 1.0M, disuelto en la solución amortiguadora A con MgCl<sub>2</sub> 10mM. El volumen total del gradiente es de 600 ml.

En el presente caso hubo necesidad de terminar la elución de la primera banda con 225 ml. más de NaCl 1.0M disuelto en la solución amortiguadora A con  $MgCl_2$  10 mM.

Gradiente lineal mixto de NaCl y etanol. La segunda fase del fraccionamiento se hace empleando un gradiente lineal mixto de NaCl de 1.0M a 2.0M y de etanol de 0 a 14%, en volumen total de 500 ml.

Las fracciones fueron identificadas por ensayos de aminoacilación como se indicó anteriormente.

### FRACCIONAMIENTO II DEL ARN-t<sup>Ser</sup> EN BD-CELULOSA. (55).

#### a. Preparación de la columna.

Equilibrar la columna con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01M, pH 7.5,  $MgCl_2$  10 mM,  $NaN_3$  0.4% y  $Na_2S_2O_3$  1mM (solución amortiguadora B) con NaCl 0.2M.

Todas las operaciones involucradas en el fraccionamiento II deben realizarse a temperatura ambiente.

Vertir la mezcla en una columna de dimensiones - - 30 x 1.5 cm. Empacar la celulosa hasta una altura de 25 a 28 cm. Equilibrar el sistema, durante una noche, con el amortiguador B más NaCl 0.2M. El flujo de la columna debe ajustarse a aproximadamente 26 ml/hr, mediante una bomba peristáltica. Se colectan fracciones de 5 ml.

Las dimensiones de las columnas de BD-celulosa empleadas en este trabajo caen dentro del rango de dimensiones señaladas como óptimas para las separaciones de ARN-t (54).

### b. Prueba cromatográfica.

Se precipita cada una de las fracciones de la banda (1) Fig. 34, correspondiente al fraccionamiento parcial I, con 0.1 vol de acetato de potasio 2.0M y 2 vol de etanol al-96%.

Se ensaya la capacidad aceptora de serina de cada fracción, como se indica en el inciso (5) de esta sección.

Se reúnen las fracciones y se aplican a la columna equilibrada con el amortiguador B con NaCl 0.2M.

La muestra se eluye con un gradiente lineal de - - NaCl de 0.2 a 1.2M disuelto en la solución amortiguadora B - (500 ml. de volumen total).

Las fracciones eluidas de la columna son concentra- das e identificadas como se indica en la sección correspon- diente a las aminoacilaciones.

## 7. DIVERSAS TECNICAS EMPLEADAS EN EL CURSO DE ESTE TRABAJO.

### A. DESTILACION DEL FENOL.

El primer paso en el aislamiento de ARN-t de higa- do de rata es la desproteinización del tejido, mediante el - empleo de fenol. Es indispensable que el fenol sea destilado, puesto que los compuestos oxidados derivados de él pueden re- sultar dañinos al material que se busca aislar.

Asimismo es deseable que el fenol usado en la des- proteinización sea de la mejor calidad posible; generalmente se recomienda el de la casa comercial Merck, que es el em- -

pleado en este trabajo.

El fenol se destila sobre polvo de zinc (un agente reductor), en un sistema de destilación con refrigerante de aire, conectado al vacío.

En estas condiciones el fenol destila alrededor de los 132-135°.

El fenol destilado se recibe en un matraz sumergido en hielo. Debe almacenarse protegido de la luz y a -20°, - condiciones en las que permanece inalterable durante varios meses.

Una vez diluido el fenol en agua, es estable a la oxidación por sólo una semana, a pesar de la adición de 0.1% de 8-hidroxiquinoleína.

#### B. PREPARACION DE LA BENTONITA (52).

Se suspenden 2 g de bentonita (Sigma) en 40 ml. de agua; se centrifuga la mezcla a 1350xg por 15 minutos. La pastilla obtenida se resuspende en EDTA 0.1M, pH 7.0, y es mantenida en suspensión durante 2 días a temperatura ambiente. Centrifugar a 8600xg. Resuspender finalmente la pastilla en acetato de sodio 0.01M, pH 6.0, a una concentración del 2 al 6%, en relación al peso seco de la bentonita.

#### C. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100. (56)

Se equilibran 35 g de Sephadex G100 (Pharmacia Fine Chemicals) en 500 ml de la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.02M, pH 7.5, con MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 50mM, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1mM y EDTA 1mM (solución amortiguadora C), durante 5 horas en un -

baño María.

Se enfría la mezcla y se equilibra el gel en la solución amortiguadora anterior sin EDTA (solución amortiguadora D).

Una vez equilibrado, el Sephadex se vierte en una columna de dimensiones 100 x 2.5 cm, hasta alcanzar una altura aproximada de 90 cm. Esta y las demás operaciones deben realizarse a temperatura ambiente.

Equilibrar la columna durante una noche con la solución amortiguadora D.

Determinar el volumen vacío de la columna, haciendo pasar un volumen de azul de dextrano al 2% en el amortiguador D, igual al volumen de la muestra a cromatografiar, es decir, de 2 ml.

Se aplica la muestra a la columna; su concentración no debe exceder de 15 mg/2 ml. Eluir el material con la solución amortiguadora D, colectando fracciones de 10 ml, a una velocidad de 30 ml/hr, la cual es controlada por una bomba peristáltica. El porcentaje de transmitancia de las fracciones eluidas de la columna se registra en un espectrofotómetro de flujo que trabaja a una longitud de onda fija de 254nm.

#### D. DESACILACION DEL ARN-t.

Zamecnik y Sarin (57) han desarrollado un método de desacilación del ARN-t, que aparentemente no daña la estructura secundaria del ácido ribonucleico.

La desesterificación se realiza incubando la muestra en Tris-HCl 1.8M, pH 8.0, a 37°, durante 1.5 horas.

El ARN-t se recupera añadiendo 1.5 vol de acetato de potasio 2M pH 5.0, y 2 vol de etanol al 96%. Dejar reposar la mezcla durante una noche a 4°.

Centrifugar y lavar el residuo con etanol al 96% y luego con éter. Secarlo con una corriente de N<sub>2</sub> y finalmente resuspenderlo en el menor volumen de agua desionizada. Almacenar la muestra a -20°.

E. PATRONES DE RADIATIVIDAD PARA LOS ENSAYOS DE AMINOACILACION.

Se preparan sistemas con todos los componentes propios de la aminoacilación, exceptuando el aminoácido radiactivo correspondiente. Dichos sistemas se manipulan como si se tratasen de sistemas de reacción completos.

Una vez seco el disco de fibra de vidrio, se aplica una cantidad conocida del aminoácido radiactivo. Se seca y cuenta en las mismas condiciones de conteo de los demás ensayos de aminoacilación.

Con ello se establece una relación entre las cuentas/min registradas por el contador de radiactividad y la molaridad de la muestra (normalización externa).

F. SOLUCIONES DE MEZCLAS DE AMINOACIDOS.

Las soluciones de mezclas de aminoácidos, se preparan empleando 19 de los 20 aminoácidos (asparagina se encuentra ausente en todas ellas). (Calbiochem)

Se preparan soluciones 0.1M de cada aminoácido. Se mezclan 0.1 ml. de las soluciones de 18 aminoácidos omitiénd-

dose el aminoácido radiactivo empleado en la prueba. Estas - soluciones son diluídas para dar las concentraciones indica- das en el ensayo correspondiente (ver las condiciones de ami- noacilación para el caso A).

La solubilización de cada aminoácido es individual en cuanto a su requerimiento de ácido o base. El ácido em- pleado es una solución diluída de HCl, y la base una solu- ción diluída de NaOH.

El pH de las soluciones mezcla de aminoácidos es - de 2.

Las soluciones de cada aminoácido, así como las - mezclas, son almacenadas a  $-20^{\circ}$ .

## 8. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA CUANTIFICACION DE PROTEINA, ARN Y ADN.

### A. DETERMINACION DE PROTEINA.

La determinación de proteína se hace por el método de Lowry et al., en la forma descrita por Campbell, y Sar- gent (58), introduciendo como únicas modificaciones el uso - de 0.4 ml. de la solución diluída del reactivo de Folin-Cio- calteu (Merck) en vez de 0.5 ml. y el empleo de una longitud de onda de 600 nm, en vez de 660 nm, para las determinacio- nes de la absorbencia de las muestras.

Como patrón se usa una solución de albúmina bovina (solución al 22%, pH 7.5, Ortho Diagnostics), Fig. 2.

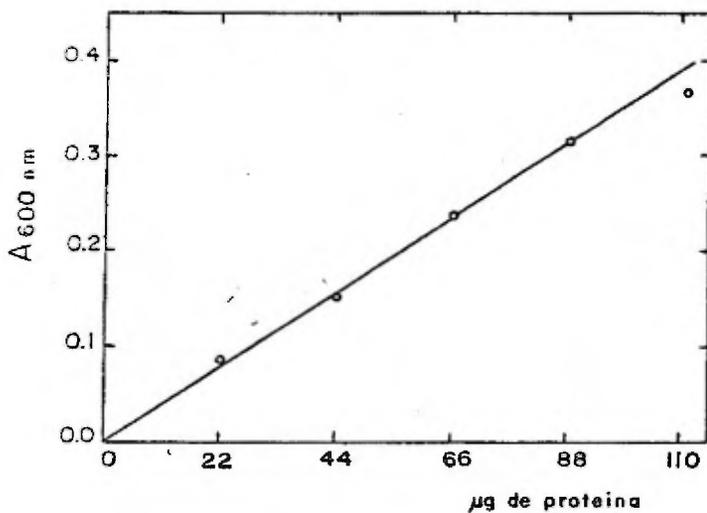


FIG. 2. CURVA PATRÓN DE ALBUMINA BOVINA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY (58). La solución patrón de albúmina bovina tiene una concentración de 110  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

## B. CUANTIFICACION DEL ARN.

### a. Quantificación por el método colorimétrico de - Mejbaum (69).

La curva patrón se determina usando ARN de levadura, altamente polimerizado (Mann Research Laboratories), - - Fig. 3.

### b. Quantificación espectrofotométrica por absor- ción a 260 nm.

La densidad óptica de las muestras de ARN diluidas en agua desionizada, se determina en un espectrofotómetro -- Zeiss PM QII, empleando celdillas de cuarzo de 1 cm.

Los valores de absorbencia obtenidos son relaciona-  
dos a las diluciones de las soluciones problema, según la -  
ecuación:

$$\frac{A \times \text{dilución}}{24} = \text{mg de ARN/ml. de solución}$$

### c. Equivalencias de las unidades empleadas en la - cuantificación del ARN-t.

24	$A_{260}$	1,000 mg de ARN-t
1	$A_{260}$	0,042 mg de ARN-t
1	$A_{260}$	1615 pmolas de ARN-t <sup>+</sup>

+ Para el cálculo correspondiente se toma como peso molecular aproximado del ARN-t de hígado de rata, 26000 - daltons (60).

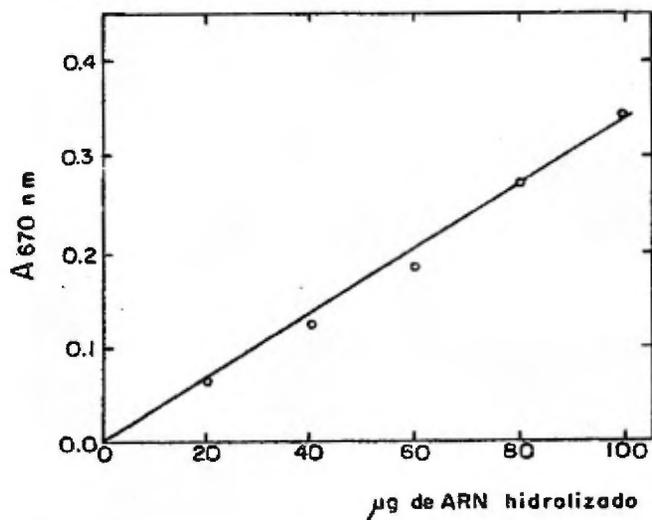


Fig 3. CURVA PATRON DE ARN HIDROLIZADO PARA LA CUANTIFICACION DEL ARN-t POR EL METODO DE MEJBAUM (55). La solución patrón de ARN hidrolizado tiene una concentración de 100 µg/ml. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

d. Incorporaciones teóricas máximas de un aminoácido a diferentes preparaciones de ARN-t.

La incorporación teórica máxima de un aminoácido específico a una preparación cruda de ARN-t es de:

$$20 \text{ pmolas} / A_{260}$$

suponiendo que:

1. El número de especies de ARN-t en las preparaciones obtenidas de tejidos de mamífero es de: 80 (60).
2. El aminoácido es aceptado por sólo una de las 80 especies.

Si un aminoácido tiene R isoaceptores, la incorporación teórica máxima esperada para él, será de:

$$20 \times R \text{ pmolas} / A_{260}$$

Estos valores permiten conocer el grado de optimización de las condiciones de aminoacilación para un aminoácido específico. En este trabajo son empleados para establecer los niveles óptimos de aminoacilación con L-leucina, L-serina, L-valina y L-lisina.

Estos valores de ninguna manera son absolutos debido a diversos factores, como son diferencias en las velocidades de incorporación de los aminoácidos a los diversos isoaceptores, y al hecho que aún no se sabe con certeza el número real de isoaceptores en la célula de mamífero ni de ningún otro organismo.

La incorporación teórica máxima de un aminoácido -

específico a una preparación de una especie pura de ARN-t es de:

$$1615 \text{ pmolas/A}_{260}$$

La relación entre los valores de incorporación experimentales y este valor teórico, permite conocer la pureza relativa de un ARN-t específico.

Con este valor se determina el grado de pureza de las diversas muestras de ARN-t<sup>Ser</sup> fraccionadas en BD-celulosa.

### C. DETERMINACION DEL ADN.

El ADN es medido por el método colorimétrico de la difenilamina de Dische, según la modificación de Burton (61).

Como patrón se usa ADN de timo de ternera (tipo V, sal de sodio, altamente polimerizado, Sigma), Fig. 4.

NOTA. El nivel máximo de la síntesis de la ferritina en el hígado de la rata, inducida por la administración intraperitoneal de 50 mg de hierro (complejo hierro-dextrán), se alcanza a las 6 horas de la estimulación (10).

Es factible suponer que antes de las 6 horas, esté incrementada la poza de los ARN-t.

Con el fin de obtener una preparación de ARN-t representativa de la estimulación, este material fue aislado a las 4 horas de haberse inducido la síntesis de la ferritina, tiempo que corresponde aproximadamente a la mitad del nivel máximo de estimulación de dicha proteína.

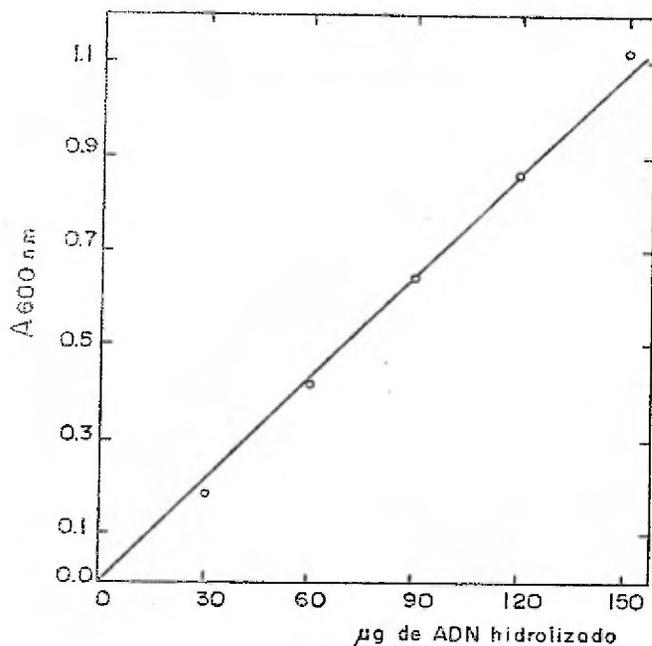


FIG. 4. CURVA PATRÓN DE ADN HIDROLIZADO PARA LA CUANTIFICACION DEL ADN-POR EL METODO DE BURTON (54). La solución patrón de ADN hidrolizado tiene una concentración de 150 µg/ml. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

### III RESULTADOS

1. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE AISLAMIENTO DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.
  - A. RENDIMIENTOS DE ARN-t AISLADO POR LOS METODOS A, B y C.

Nó se observaron diferencias aparentes en las recuperaciones del ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, en ninguno de los métodos empleados.

Los rendimientos de ARN-t aislado por los diferentes métodos, se muestran en la Tabla 4.

Aparentemente los rendimientos de ARN-t aislado — por los métodos A y B son iguales. Sin embargo, el rendimiento en el caso B es mucho menor, ya que el grado de pureza de las preparaciones aisladas por este método es sólo de un 53%, mientras que para el caso A es de un 73%.

Comparado con los métodos A y B, el rendimiento de ARN-t por el método C es notablemente mayor.

TABLA 4 .

RENDIMIENTOS DE ARN-t<sup>a</sup> AISLADO POR LOS METODOS

A, B Y C.

METODO	RENDIMIENTO (mg ARN-t/g de hígado húmedo)	
	<u>NORMAL</u>	<u>ESTIMULADO</u>
A	0.23	0.25
B	0.23	_b
C	0.37	0.33

- a. Debe notarse que el grado de pureza de las diferentes preparaciones de ARN-t es muy variable (ver Tabla 5).
- b. No fue posible determinar la concentración del ARN-t obtenido, debido a la contaminación de la preparación con hierro.

## B. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN SEPHADEX G100.

Esta técnica se aplicó con fines analíticos en el caso de los métodos A y C. Su aplicación en el método B fue preparatoria.

### a. Cromatografía del ARN-t aislado por el método A.

Figs. 5 y 6. Las muestras, tanto de animal normal - como de animal estimulado, presentan las mismas contaminaciones, con excepción de un contaminante de menor peso molecular que el ARN-t, que sólo aparece en el caso de la preparación normal.

Los contaminantes son:

- i. Material pesado que eluye en el volumen vacío.
- ii. Material que eluye poco antes del ARN-t. Es posible que este material se trate de ARN 5S (62, 63) o de -- ARN-t desnaturalizado (64).

### b. Cromatografía del ARN-t aislado por el método B.

Figs. 7-11. Los contaminantes comunes a las preparaciones aisladas de hígados de ratas normales y de hígados de ratas estimuladas con hierro son:

- i. Material pesado, que eluye en el volumen vacío. En el caso de las preparaciones de animales estimulados, las fracciones en las que eluye este material muestran una absorbencia mucho mayor que la correspondiente para el caso de -- las preparaciones de animales normales. Esto se debe a la -- contaminación de las primeras con hierro. No se sabe en que forma se asocia este metal con el ácido nucleico.

Lo más probable es que estas fracciones contengan-ARN-r, como principal impureza de alto peso molecular. El -ADN debe contribuir en una proporción muy baja al total del material que eluye en esta posición, debido a la precaución tomada para evitar esta contaminación en las preparaciones -de ARN-t, homogeneizando el tejido en presencia de sacarosa-0.3M.

ii. Material que eluye poco antes del ARN-t, el -cual se sospecha que es ARN 5S (62, 63) o ARN-t desnaturalizado (64).

El análisis cromatográfico de ARN-t dimerizado en columnas de Sephadex G100 de iguales dimensiones a las de la columna empleada en este trabajo, muestra que su posición de elución es similar al de este contaminante. Sin embargo, la posibilidad de que este material sea ARN-t dimerizado ha sido descartado en vista de que no se aprecia incorporación de ninguno de los aminoácidos radiactivos empleados en los ensayos de identificación de las fracciones eluidas de la columna. Se sabe que la velocidad de incorporación de un aminoácido al ARN-t dimerizado, es casi igual a la velocidad de incorporación del mismo aminoácido al monómero de ARN-t (65, -66).

La preparación de ARN-t de hígado de rata normal -presenta una contaminación de un material de bajo peso molecular, que corresponde a un 15% del material aplicado inicialmente a la columna (Fig. 7). Esta contaminación desaparece en el caso de la preparación proveniente de un animal estimulado (Fig. 10).

Comparando los perfiles de elución de las Figs. 7-9, se observa que para una buena resolución, la cantidad de - -ARN-t máxima aplicable a una columna de Sephadex G100 de di-

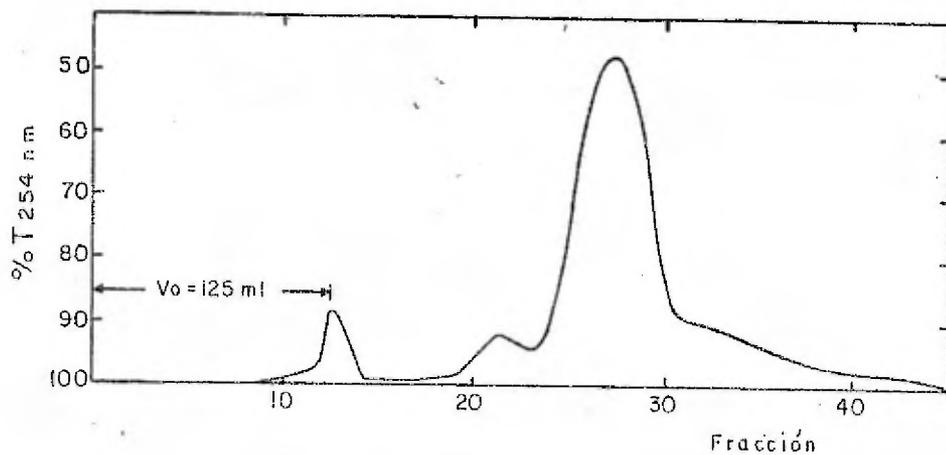


FIG. 5. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ANH-t DE HIGADO DE RATA NOROCCIDENTAL, AISLADO POR EL MÉTODO A. Se cromatografiaron 4,30 mg de ANH-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 33)

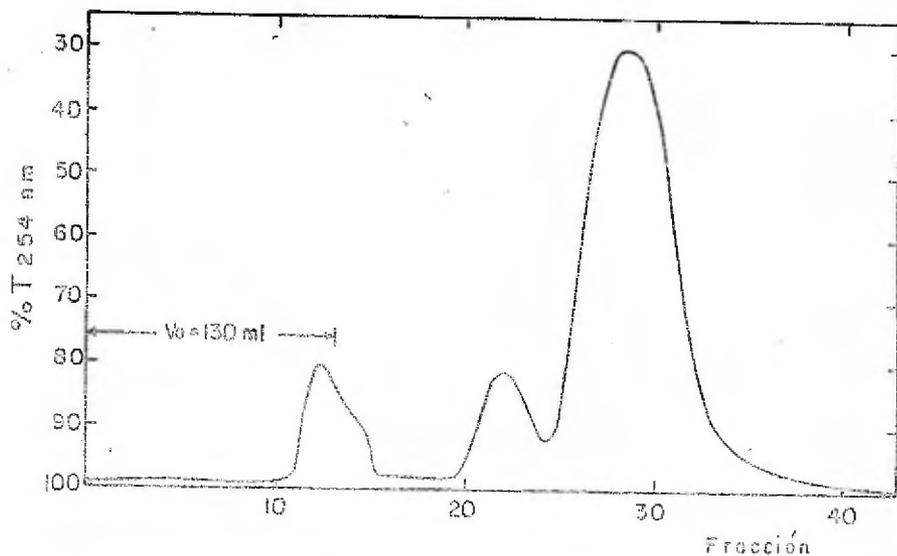


FIG. 6. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE 4000 DE UNO DE HIERVO DE RATA ESTIMULADA CON HIERVO, AISLADO POR EL METODO A. Se cromatografiaron 5.21 mg de *MW-1* en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. — (pág. 39)

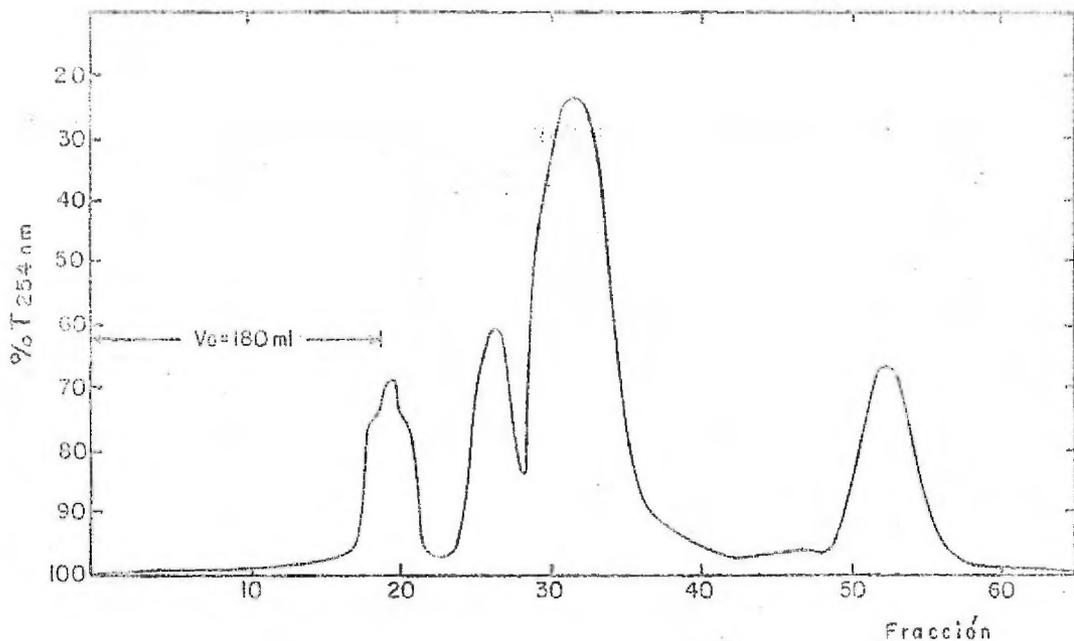


FIG. 7. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL AISLADO POR EL METODO B. Se cromatografiaron 12,94 mg de -- ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 39)

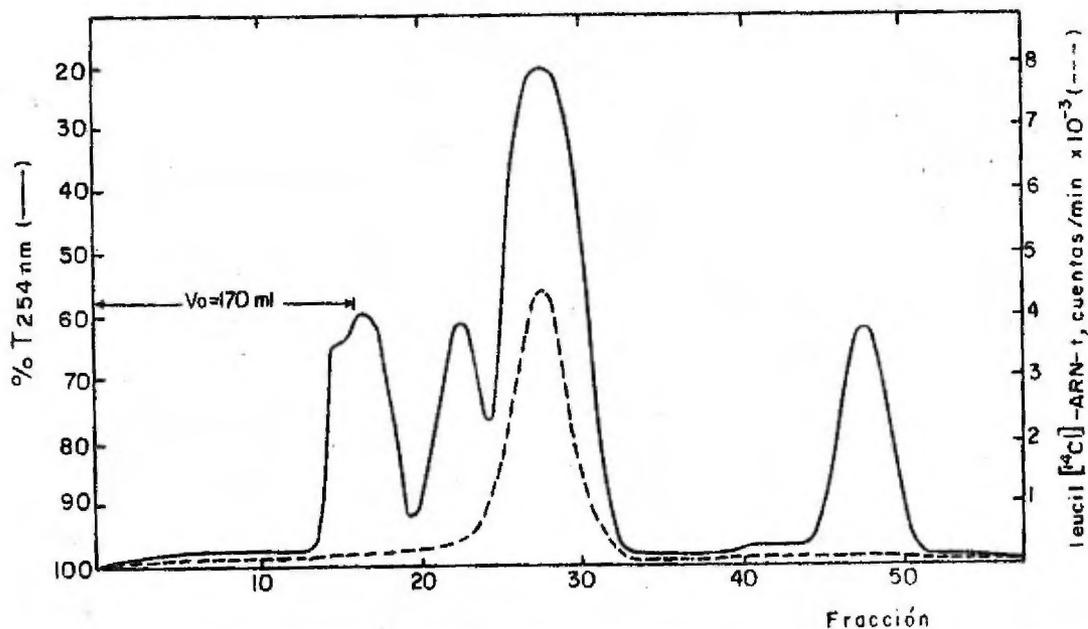


FIG. 8. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE MIN-E DE HIBRIDACION A RATA NORMAL, AISLADO POR EL METODO B. Se cromatografiaron 15.0 ml de --- ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 10). La capacidad aceptora de L-leucina-<sup>14</sup>C de las fracciones eluidas de la columna, fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. (15a, 19)

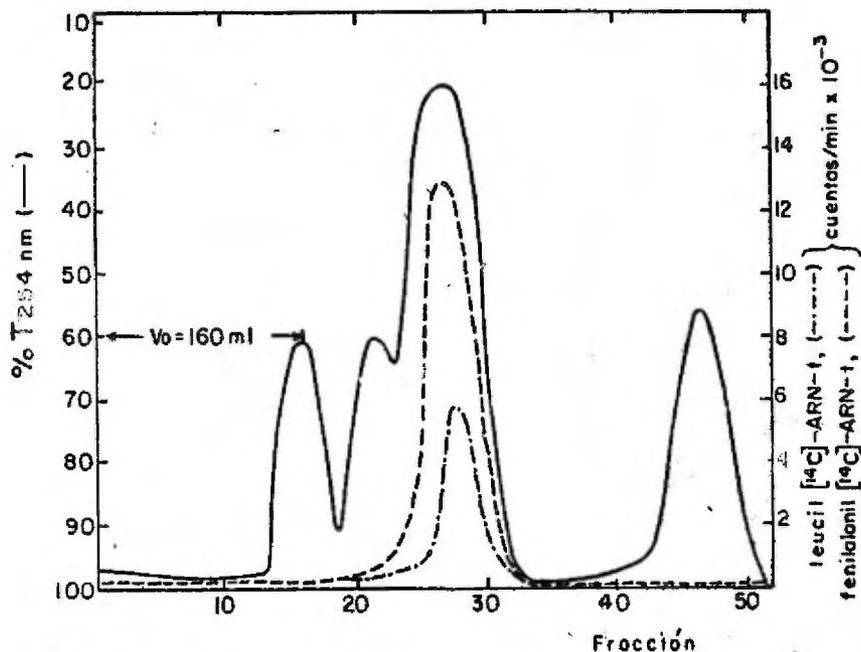


FIG. 9. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ARN-t DE HIGAJA DE RATA NORMAL, AISLADO POR EL METODO B. Se cromatografiaron 20.4 mg de --- ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág.39). La capacidad aceptora de L-leucina-<sup>14</sup>C y de L-fenilalanina-<sup>14</sup>C de las fracciones eluidas de la columna, fue determinada como se indica en Materiales y Métodos (pág. 27).

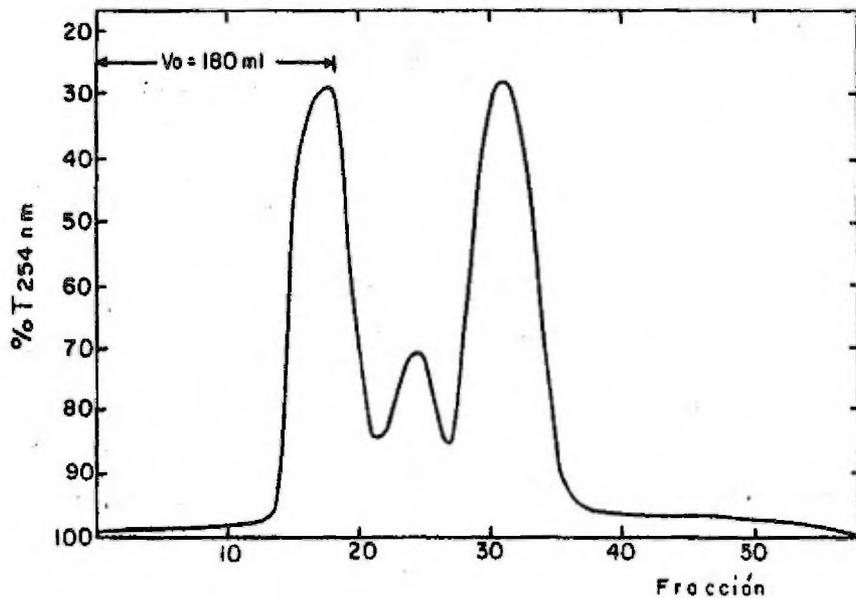


FIG. 10. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ARN-t DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO; AISLADO POR EL METODO B. Se cromatografía con aproximadamente 10 mg de ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 39).

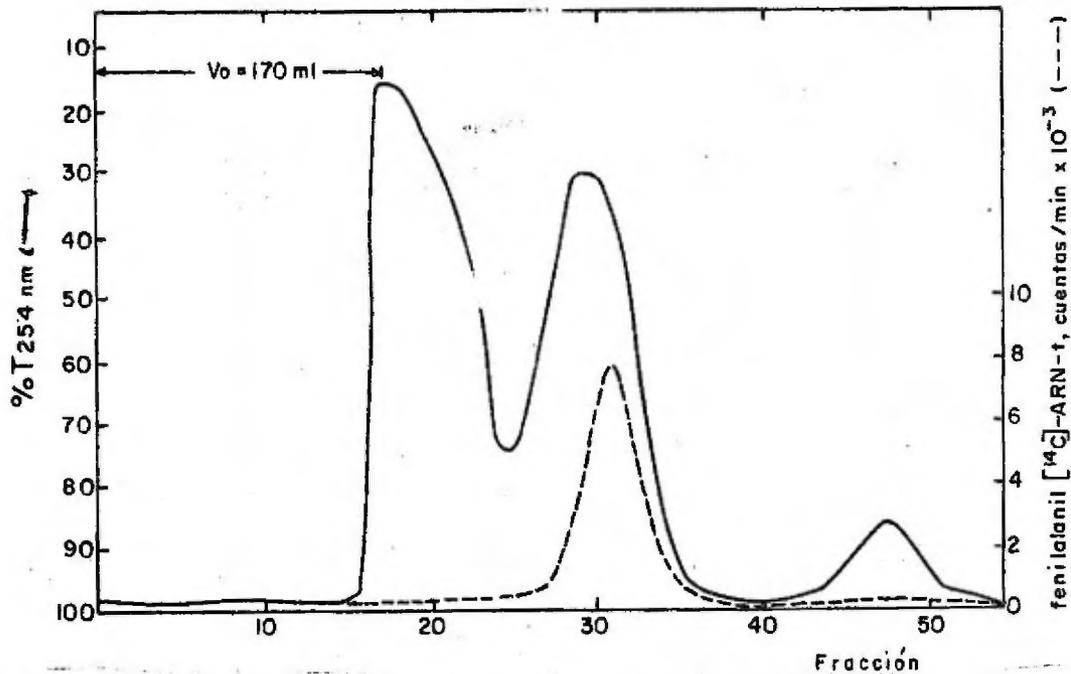


FIG. 11. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ARN-t DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO, AISLADO POR EL METODO B. Se cromatografía ron aproximadamente 15 mg de ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 39). La capacidad aceptora de l-fenilalanina-<sup>14</sup>C de las fracciones eluidas de la columna, fue determinada como se indica en Materiales y Métodos (pág. 27).

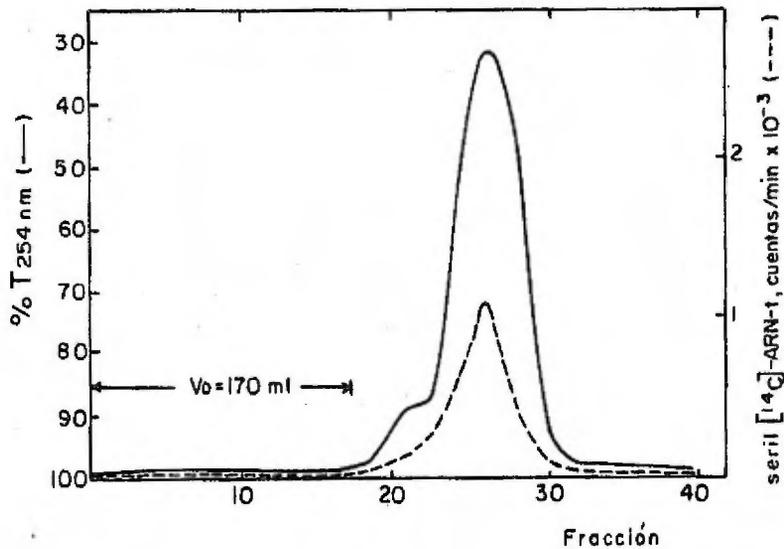


FIG. 12. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G100 DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL, AISLADO POR EL METODO C. Se cromatografiaron 10.0 mg de ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (pág. 39). La capacidad aceptora de L-Serina-<sup>14</sup>C de las fracciones eluidas de la columna, fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. (pág. 27).

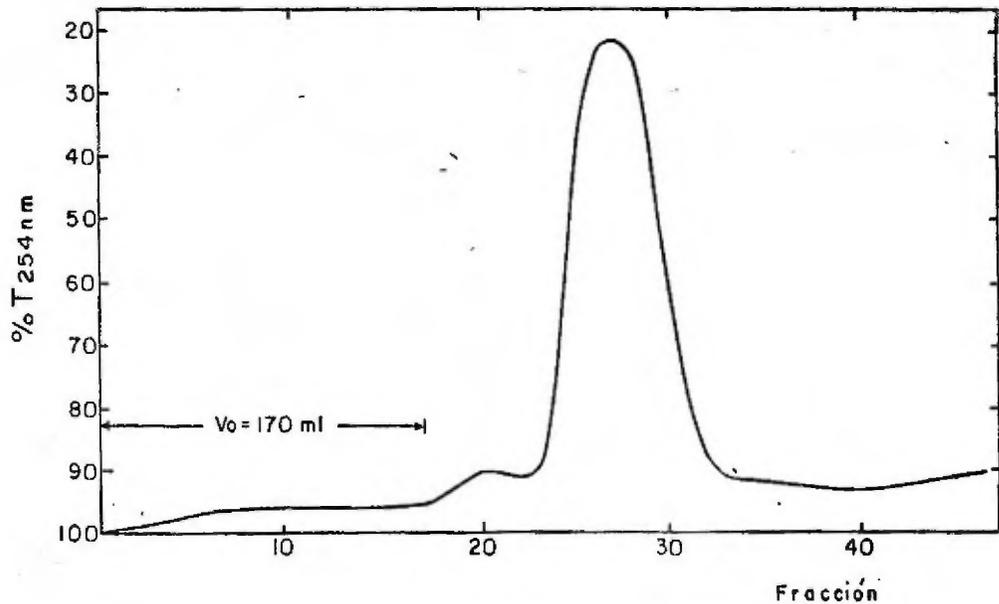


FIG. 13. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX 6100 DE ARN-t DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO, AISLADO POR EL METODO C. Se cromatografiaron 10.0 mg de ARN-t en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. (pág. 39).

mensiones 2.5 x 90 cm, es de 15 mg.

c. Cromatografía del ARN-t aislado por el método C.

El análisis cromatográfico de las preparaciones de ARN-t de animales normales y de animales estimulados con hierro, muestra una contaminación única con el material, que al igual que en los dos casos anteriores, eluye justo antes del ARN-t. La contaminación de este material en ambas preparaciones no asciende a más del 7%, (Figs. 12, 13).

Los autores de la técnica reportan que su preparación de ARN-t se encuentra totalmente libre de cualquier impureza (23). Ello se puede deber a que sólo analizan 1 mg -- del material aislado, y en el presente trabajo se cromatografía 10 mg del material aislado.

El contaminante no incorpora aminoácidos radiactivos, descartando con ello la posibilidad de que sea ARN-t dimerizado (65, 66).

Los resultados de las pruebas cromatográficas de los ARN-t aislados por los diferentes métodos, están resumidos en la Tabla 5.

C. CAPACIDAD ACEPTORA DE LAS PREPARACIONES DE ARN-t.

La desproteínización de los homogeneizados de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, se realiza con fenol en los tres métodos de aislamiento de ARN-t.

Existe evidencia del efecto dañino que puede tener el fenol sobre el ARN (67). Asimismo se sabe que en general los agentes desnaturizantes de proteínas, ejercen este mismo efecto sobre los ácidos nucleicos, particularmente sobre-

TABLA 5 .

ANALISIS CROMATOGRAFICO EN SEPHADEX G100 DEL ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO, AISLADO POR LOS METODOS A, B Y C.

<u>METODO</u>	<u>% ARN-t</u>		<u>% ARN 5S</u>		<u>% ARN LIGERO</u>		<u>% ARN PESADO</u>	
	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>
A	73.00	76.64	6.70	10.92	14.16	2.10	5.73	9.63
B	52.96	- <sup>a</sup>	15.48	- <sup>a</sup>	19.75 <sup>b</sup>	-	14.72	- <sup>a</sup>
C	93.00	96.60	6.15	3.40	-	-	-	-

- a. No es posible determinar los porcentajes correspondientes, debido a la contaminación de las preparaciones con hierro.
- b. Notar que el ARN ligero que contamina esta preparación no es el mismo que el - que contamina la preparación de ARN-t aislado por el método :

los ARN-t (68, 87), con excepción del dodecil-sulfato de sodio, cuya interacción con dichas macromoléculas es mínima debido a su carga negativa (69).

Los datos de la Tabla 6, ponen de manifiesto el efecto dañino que tiene el fenol sobre las estructuras secundaria y terciaria del ARN-t, estructuras que determinan la actividad biológica de dicho material.

El ARN-t aislado por los métodos A y B (métodos que involucran tres extracciones fenólicas), tiene una capacidad aceptora menor, tanto para el caso de la leucina como para el caso de la serina, en relación a la capacidad del ARN-t aislado por el método C (método que involucra un solo paso de extracción con fenol).

Debe señalarse que las condiciones de aminoacilación son óptimas para cada aminoácido.

Las incorporaciones logradas por las preparaciones de animales estimulados con hierro son similares a las de animales normales. Este hecho se estudia con detalle más adelante.

## 2. AISLAMIENTO DE LA FRACCION pH 5.0 DE HIGADO DE RATA.

### A. TIEMPO OPTIMO DE PRECIPITACION.

El sobrenadante de la centrifugación a 270000xg (prom.), obtenido de los hígados de 6 ratas, fue dividido en tres partes iguales. Cada una fue precipitada con ácido acético 1N, añadido lentamente y con agitación constante, con el fin de evitar la desnaturalización local de las enzimas.

El precipitado de cada una de las muestras fue re-

TABLA 6.

COMPARACION DE LA INCORPORACION DE L-LEUCINA-<sup>14</sup>C Y DE L-SERINA-<sup>14</sup>C A LAS PREPARACIONES DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO, AISLADAS POR LOS METODOS A, B Y C.

<u>METODO</u>	<u>LEUCIL-<sup>[14</sup>C]-ARN-t</u>		<u>SERIL-<sup>[14</sup>C]-ARN-t</u>	
	pmolas/A260		pmolas/A260	
	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>	<u>NORM.</u>	<u>EST.</u>
A	31.25	29.48	-	89.29
B	47.30	-	79.60	-
C	97.02	99.96	110.88	127.68

INCORPORACION TEORICA MAXIMA DE L-LEUCINA Y DE L-SERINA A PREPARACIONES CRUDAS DE ARN-t: (Estos valores no son absolutos):

LEUCIL-ARN-t: 100-120 pmolas/A260

SERIL-ARN-t: 80 pmolas/A260

L-leucina-<sup>14</sup>C, 260 mC/mmola; L-serina-<sup>14</sup>C, 128 mC/mmola.

cuperado a los 0, 30 y 60 minutos después de ajustar el pH a 5.0, respectivamente, procesándosele como se indica en la — sección de Materiales y Métodos, (pág. 23).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

La cantidad de material precipitado a los diferentes tiempos, no varía significativamente. Por otro lado, la calidad de la preparación enzimática obtenida a los 0 minutos, es notablemente superior a la de las muestras precipitadas durante 30 y 60 minutos, respectivamente.

Ha quedado establecido como tiempo óptimo de precipitación el tiempo cero, ya que el contacto prolongado con el ácido acético no aumenta mucho la cantidad de muestra precipitada, pero el daño que sufre con un tiempo de precipitación prolongado es notable.

El precipitado debe ser recuperado tan pronto se — ajusta el pH del sobrenadante de la fracción postmicrosomal a 5.0.

#### B. RENDIMIENTO DE LA FRACCION pH 5.0

En la Tabla 8, se muestran los rendimientos de la fracción pH 5.0, obtenida en el tiempo de precipitación óptimo.

#### C. NIVELES ENDOGENOS DE ATP Y ARN-t EN LA FRACCION — pH 5.0

Para los fines de este trabajo se puede considerar que las preparaciones enzimáticas obtenidas a pH 5.0, se encuentran virtualmente libres de ATP y ARN-t endógenos.

Las incorporaciones tanto de leucina como de seri-

TABLA 7 .

COMPARACION DEL RENDIMIENTO Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA  
DE LA REACCION pH 5.0 A DIFERENTES TIEMPOS DE PRECIPITA-  
CION.

	0 min.	30 min.	60 min.
<u>PRECIPITADO</u>			
<u>TOTAL<sup>a</sup> (mg).</u>	11.09	13.44	13.50
<u>ACTIVIDAD</u>			
<u>ENZIMATICA<sup>b</sup> (%).</u>	100.0	68.3	54.2

a. Medido por el método de Lowry (58).

b. Medida como la capacidad de aminoacilar ARN-t con L-leucina.

TABLA 8

RENDIMIENTO DE LA FRACCION pH 5.0 DE HIGADO DE RATA.

<u>EXPERIMENTO</u>	<u>g HIGADO</u>	<u>mg FRACCION pH 5.0</u>	<u>mg/g</u>
1	32.1	95.6	2.98
2	32.1	77.4	2.41
3	71.1	123.2	1.73
4	45.2	108.0	2.39
5	28.7	43.4	1.51
6	36.4	48.8	1.41
PROMEDIO	-	-	2.07

En todos los casos la fracción pH 5.0 fue obtenida en el tiempo óptimo de precipitación.

na, en sistemas de aminoacilación óptimos, pero desprovistos de ATP y ARN-t exógenos, no alcanzan ni al 1% de las incorporaciones obtenidas en sistemas completos de aminoacilación.

#### D. ACTIVIDAD RIBONUCLEOLITICA EN LA FRACCION pH 5.0

Para alcanzar un sistema óptimo de aminoacilación, es un requisito indispensable que las aminoacil-ARN-t-sintasas se encuentren libres de toda actividad ribonucleolítica.

La gráfica de la Fig. 14, muestra que las fracciones pH 5.0, empleadas como fuente de las aminoacil-ARN-t-sintasas, no tienen actividad ribonucleolítica.

#### E. ESTABILIDAD DE LA FRACCION pH 5.0

Las fracciones pH 5.0 concentradas, protegidas con 2-mercaptoetanol a una concentración de 0.01M y con glicerol al 50% y almacenadas a  $-20^{\circ}$ , permanecen estables durante 5 meses, perdiendo su actividad bruscamente al sexto mes.

Durante su aislamiento la fracción pH 5.0 es estable. El sobrenadante de la centrifugación a los 14500xg (ver métodos, pág. 23) puede mantenerse 4 horas en hielo antes de continuar su procesamiento, sin daño alguno para la preparación enzimática finalmente obtenida.

### 3. OPTIMIZACION DE LOS SISTEMAS DE AMINOACILACION CON L-LEUCINA - $^{14}C$ Y CON L-SERINA - $^{14}C$ .

La meta de la optimización de cualquier sistema de aminoacilación, es alcanzar el nivel teórico máximo de incorporación (ver Materiales y Métodos, pág. 46).

La incorporación teórica máxima de un aminoácido -

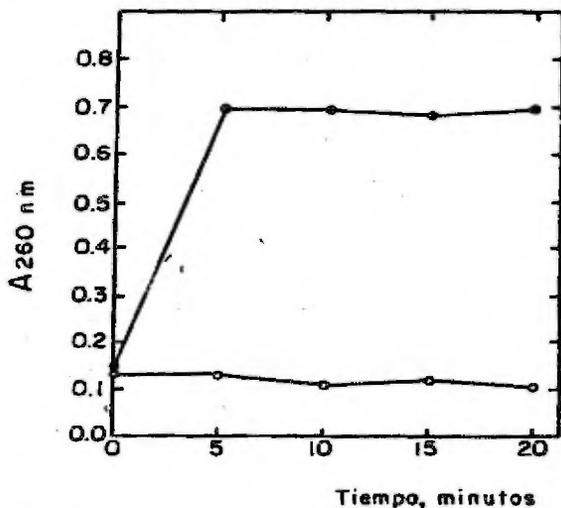


FIG. 14. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEOLITICA DE LA FRACCION S.0. Se incubaron a 37°, 0.276 mg de ARN<sup>+</sup>t más 0.45 mg de la fracción S.0 con (▲-▲-) y sin (○-○-) 7,8 ug de ribonucleasa pancreática bovina (Miles). Los sistemas se aforaron a 250 ul con agua desionizada. Se tomaron alicuotas de 50 ul a los tiempos indicados en la gráfica. La reacción se paró con ácido tricloroacético al 10%. Las muestras fueron centrifugadas a 1350xg. Se tomaron alicuotas de 50 ul del sobrenadante de cada una de ellas, se aforaron a 1 ml con agua desionizada y se determinó su absorbencia a 260 nm. Se graficaron los resultados sin restarles las absorbencias de los blancos correspondientes: 1.30 (▲-▲-) y 1.13 (○-○-).

en una preparación cruda de ARN-t, sería la 80ava parte de la incorporación total esperada ( $20 \text{ pmolas/A}_{260}$ ), si todas las especies se cargaran con su aminoácido correspondiente, y si dicho aminoácido fuese reconocido por una sola especie.

La mayoría de los aminoácidos reaccionan con dos o más especies de ARN-t. Consecuentemente la incorporación teórica máxima será proporcional al número de isoceptores de un aminoácido en particular.

La incorporación teórica máxima de una preparación de una especie de ARN-t equivale a  $1615 \text{ pmolas/A}_{260}$ . El alcanzar esta cifra experimentalmente, implica conocer las condiciones óptimas de aminoacilación y tener una preparación 100% pura de la especie en cuestión.

En este trabajo se han optimizado las condiciones de aminoacilación de preparaciones crudas de ARN-t con L-leucina- $^{14}\text{C}$  y con L-serina- $^{14}\text{C}$ . Las condiciones óptimas para la incorporación de L-serina- $^{14}\text{C}$  han sido exitosamente extrapoladas a la aminoacilación de especies de ARN-t<sup>Ser</sup> parcialmente purificadas.

Como metas de la optimización de los sistemas de incorporación de L-leucina- $^{14}\text{C}$  y de L-serina- $^{14}\text{C}$ , se han tomado los valores de  $100-120 \text{ pmolas/A}_{260}$  y de  $80 \text{ pmolas/A}_{260}$ , respectivamente, de acuerdo al número de isoceptores para cada aminoácido y en relación al número total de isoceptores de la célula de mamífero. De las 80 especies de ARN-t presentes en la célula de mamífero, hay 5 ó 6 para la L-leucina y 4 para L-serina.

A. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMINOACILACION CON  
L-LEUCINA-<sup>14</sup>C.

Previamente a la optimización de las concentraciones de los componentes del sistema de incorporación, fue necesario reducir el volumen del mismo de 500 ul a 100 ul y posteriormente a 50 ul. Ello permitió trabajar con concentraciones más altas del material radiactivo e impidió la desnaturalización por dilución de la preparación enzimática. -- Hay quienes evitan la desnaturalización de las enzimas incrementando la concentración proteínica del medio de incubación adicionando albúmina (70).

Las condiciones de reacción del nivel basal de incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C, de las cuales se partió en las pruebas de optimización, se muestran en la Tabla 9.

Las modificaciones hechas al sistema basal, que condujeron a un sistema optimizado de incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C, se muestran a continuación en una serie de gráficas, Figs. 15-26.

Una vez modificada una variable hasta encontrar su concentración óptima, ésta permanece constante en los ensayos que le siguen, a menos que se indique lo contrario.

Los resultados de estas pruebas se resumen en la Tabla 10.

TABLA 9 .CONDICIONES DE REACCION DEL NIVEL BASAL DE INCORPORACION DE L-LEUCINA-<sup>14</sup>C.

<u>COMPONENTE</u>	<u>CONCENTRACION</u>
Tris- HCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	20.8 mM <sup>a</sup>
ATP	0.5 mM
ARN-t <sup>b</sup>	0.31 mg/ml
L-leucina- <sup>14</sup> C	1.52 nm/ml
Fracción pH 5.0	4.88 mg/ml
Vol. final	100 $\mu$ l <sup>c</sup>

El sistema se incubó 15 minutos a 37°.

El producto se recuperó como se indica en Materiales y Métodos (pág. 27).

- 0.8 mM es la concentración de la sal en la preparación enzimática.
- ARN-t aislado por el método A.
- Volumen al cual se afora con agua.

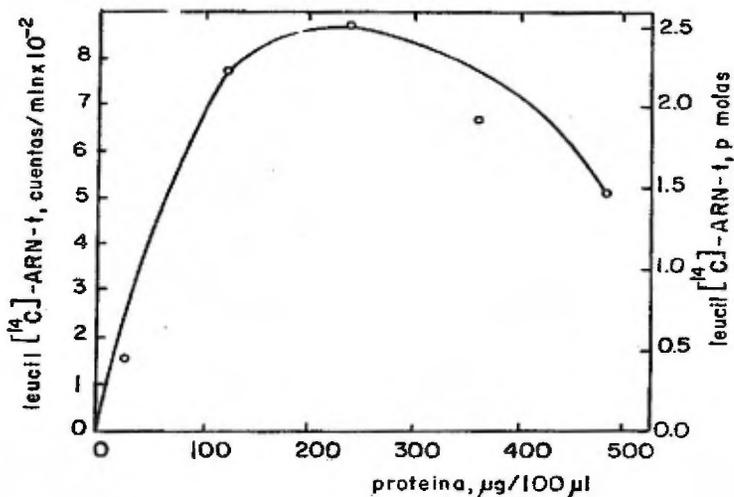


FIG. 15. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA FRACCION pH 5.0 SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C. Se aminoaciló una preparación cruda de ARN-t (método A) en las condiciones basales de reacción descritas en la Tabla 9, con cantidades variables de la fracción pH 5.0: 24.4, 122.0, 244.0, 360.0 y 488.0 ug/sistema. El producto se recuperó en la forma indicada en Materiales y Métodos. RESULTADO: Concentración óptima de la fracción pH 5.0: 2.44 mg/ml. (A todos los valores de ésta y las gráficas subsiguientes, les fue restado el valor de fondo de prueba).

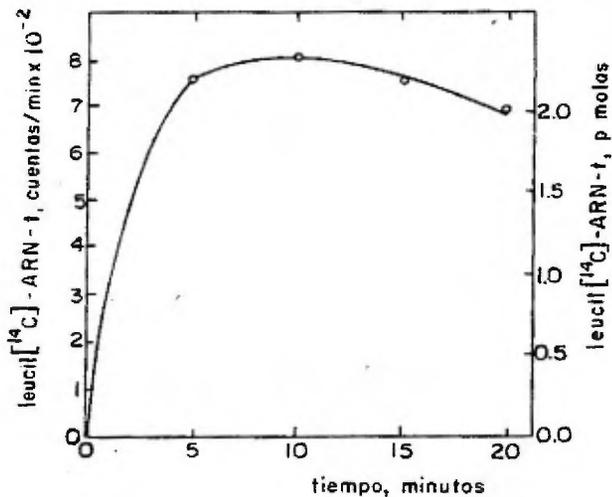


FIG. 16. EFECTO DE LA VARIACION DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA AMINOCILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C (I). Las condiciones de aminocilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 15, variando en este caso el tiempo de incubación: 0, 5, 10, 15 y 20 minutos. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Tiempo óptimo de incubación: 10 minutos.

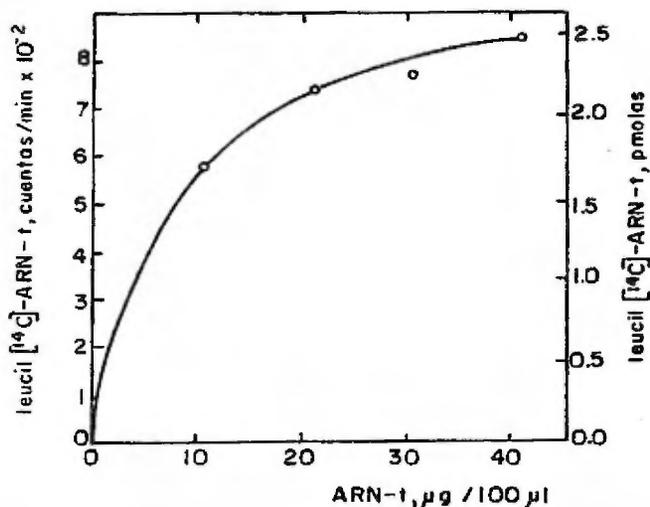


FIG. 17. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL ARN-t SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C. Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la Fig. 16, variando en este caso la concentración del ARN-t: 10.4, 20.8, 31.1 y 41.5 ug/sig. ma. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima del ARN-t: 0.415 mg/ml.

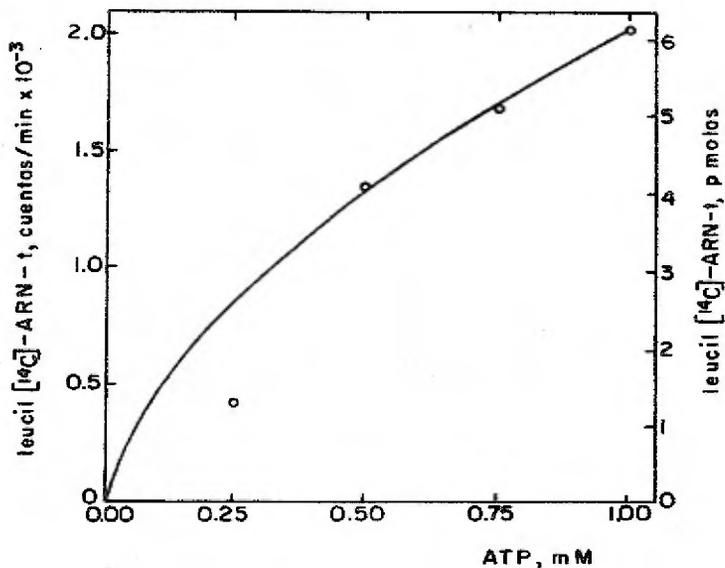


FIG. 18 . EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL ATP SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C. Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig.-17, variando en este caso la concentración del ATP: 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mM. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Con concentración óptima del ATP: 1,00 mM.

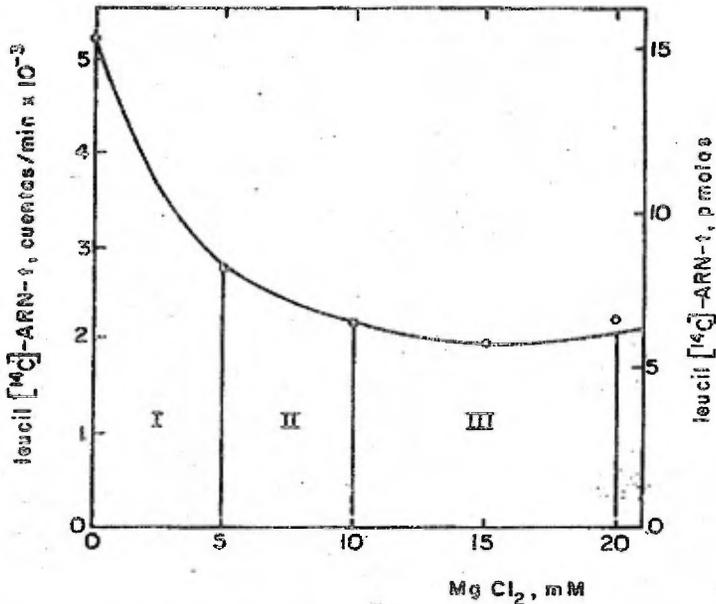


FIG. 19 EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL  $MgCl_2$  SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA- $^{14}C$ . Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 18, variando en este caso la concentración del  $MgCl_2$ : 0, 5, 10, 15 y 20 mM. Independientemente de esta variación, todas las muestras contienen 0,8 mM de  $MgCl_2$ , debido a su presencia en la preparación enzimática. El producto se recupera en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima del  $MgCl$  : 0,8 mM. (Las fases I, II y III se explican en el texto).

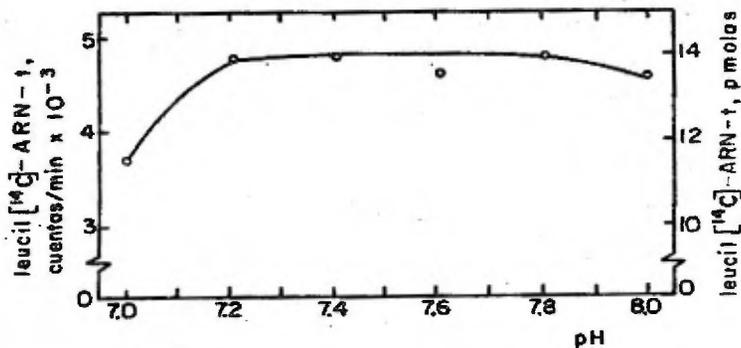


FIG. 20. EFECTO DE LA VARIACION DEL pH SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C (I). Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 19, variando en este caso el pH de la reacción en un rango de 7.0 a 8.0. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: rango de pH óptimo: 7.2. - 7.8.



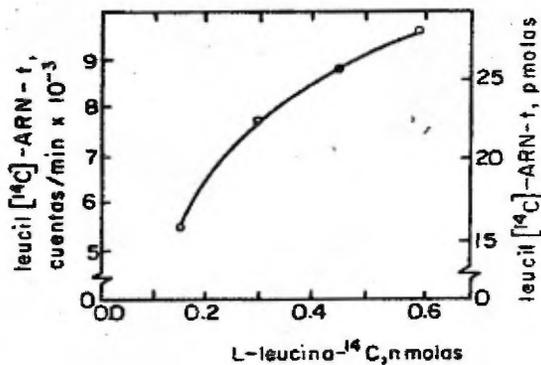


FIG 21. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA L-LEUCINA <sup>14</sup>C SOBRE LA AMINOCILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA <sup>14</sup>C. Las condiciones de aminocilación fueron las descritas en la Fig. 20, variando en este caso la concentración de la L-leucina-<sup>14</sup>C: 0.15, 0.30, 0.46 y 0.61 nm/sistema. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima de la L-leucina <sup>14</sup>C: 6.1 nm/ml.

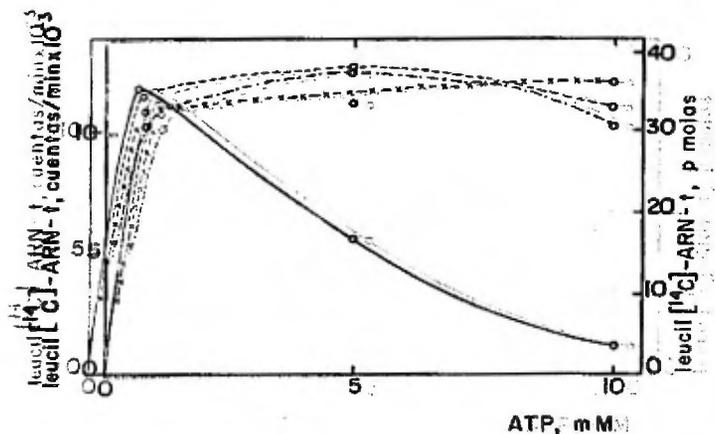


FIG. 22. EFECTO DE LA VARIACION DE LAS CONCENTRACIONES DE  $MgCl_2$  Y DE ATP, Y DE LA RELACION  $Mg^{+2}/ATP$  SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON LEUCINA- $^{14}C$ . Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 21, variando en este caso las concentraciones del  $MgCl_2$  0.0 (—), 2.5 (---x---), 5.0 (—) y 10.0 (---) mM. Todas las muestras contenían 0.8 mM de  $MgCl_2$ , debido a su presencia en la fracción pH 5.0. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentraciones óptimas:  $MgCl_2$ , 3.3 mM; ATP, 5.0 mM. Relación  $Mg^{+2}/ATP$  óptima: 0.66.

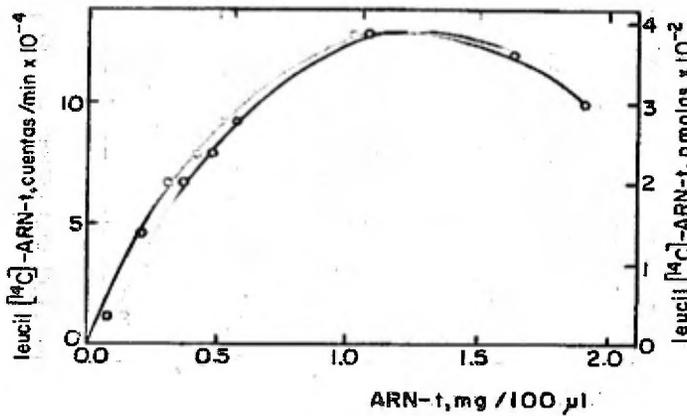


FIG. 23. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL ARN-t, POR ARRIBA DEL VALOR OPTIMO, SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C. Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 22, variando en este caso la concentración del ARN-t, por arriba del valor óptimo: 0.083, 0.208, 0.311, 0.415, 0.518, 1.036, 1.620 y 1.890 mg/sistema.

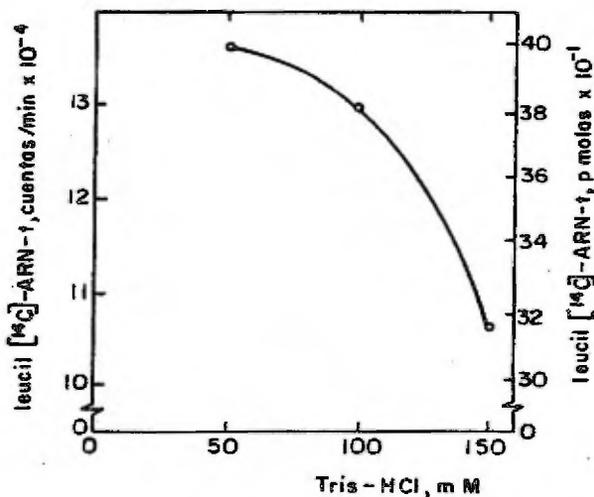


FIG. 24. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL TRIS-HCl SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA- $^{14}\text{C}$ . Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 23, variando en este caso la concentración del Tris-HCl: 50, 100 y 150 mM. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima del Tris-HCl: 50 mM.

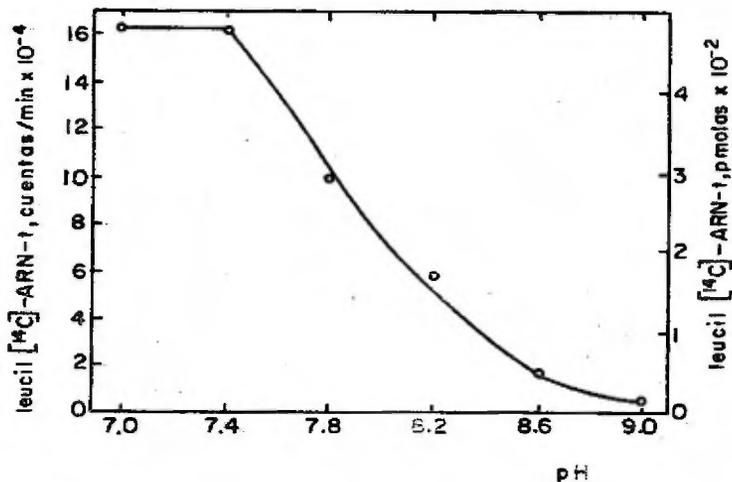


FIG. 25. EFECTO DE LA VARIACION DEL pH SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C (II). Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 24, variando en este caso el pH en un rango de 7.0 a 9.0. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Rango de pH óptimo: 7.0 - 7.4.

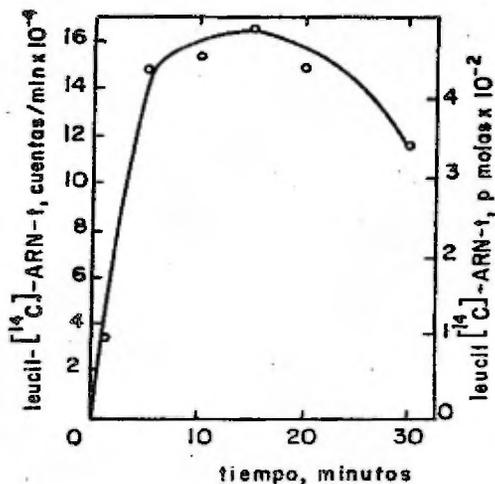


FIG. 25. EFECTO DE LA VARIACION DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-LEUCINA- $^{14}\text{C}$ . (II). Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig.25, - variando en este caso el tiempo de incubación: 0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 - minutos. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Tiempo óptimo de incubación: 15 minutos.

TABLA 10.

ENSAYOS PARA LA OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE LA AMINOACILACION CON L-LEUCINA-<sup>14</sup>C.

<u>MODIFICACION</u>	<u>NIVELO OPTIMO</u>	<u>LEUCINA-<sup>14</sup>C-ARN-t</u> cpm pmolas/A250		<u>FIG.</u>
1. Ninguna	nivel basal	846	3.34	-
2. Enzima	2.44 mg/ml	874	3.45	15
3. Tiempo	10 min.	802	3.17	16
4. ARN-t	0.415 mg/ml	890	2.50	17
5. ATP	1 mM	2051	6.29	18
6. MgCl <sub>2</sub>	0.3 mM	5265	15.60	19
7. pH	7.4	4743	14.00	20
8. L-leucina- <sup>14</sup> C	6.4 nm/ml	9558	28.40	21
9. MgCl <sub>2</sub> /ATP	0.66	11243	33.30	22
<hr/>				
10. ARN-t	10.26 mg/ml	129810	15.40	23
11. Tris-HCl	50 mM	136223	15.10	24
12. pH	7.0	163581	19.35	25
13. Tiempo	15 min.	163871	19.40	26

Todos los ensayos fueron realizados con L-leucina-<sup>14</sup>C, -- 260 mC/mmola, con la misma preparación enzimática y con ARN-t aislado por el método A.

Una vez modificada una variable, ésta permanece constante en el siguiente ensayo.

A todos los resultados se les ha restado el valor de fondo de la prueba.

B. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMINOACILACION CON  
L-SERINA-<sup>14</sup>C.

En las pruebas de optimización de las condiciones de aminoacilación con L-serina-<sup>14</sup>C, se partió del conocimiento de la relación  $Mg^{+2}/ATP$  óptima, tomada del valor óptimo reportado por Novelli (71) para sistemas de incorporación de tejidos de rata y de ratón.

Fueron estudiados los efectos de la variación de los siguientes parámetros:

- a. pH
- b. Concentración de la L-serina-<sup>14</sup>C.
- c. Concentración de la fracción pH 5.0

No se estimó pertinente optimizar la concentración del ARN-t, ya que este componente es la variable en determinaciones posteriores.

Los resultados de las pruebas de optimización se presentan a continuación en una serie de gráficas Figs.27-29. Las condiciones de reacción se especifican en las leyendas de las figuras correspondientes.

En la tabla 11, se resumen dichos resultados.

C. IMPORTANCIA DEL ESTADO FUNCIONAL DEL ARN-t EN LOS EN-  
SAYOS OPTIMOS DE AMINOACILACION.

Los resultados de la optimización de la aminoacilación con L-leucina muestran niveles de incorporación altos y reproducibles, pero lejanos de la incorporación teórica máxima.

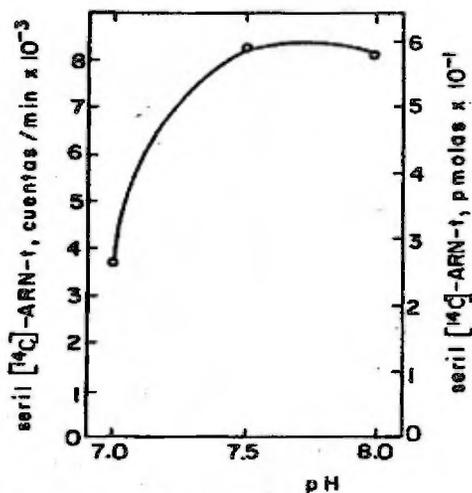


FIG. 27. EFECTO DE LA VARIACION DEL pH SOBRE LA AMINACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-SERINA-<sup>14</sup>C. Se aminoaciló una preparación cruda de ARN-t (m<sub>g</sub> todo A) en las siguientes condiciones de reacción: MgCl<sub>2</sub>, 15 mM; ATP, 5 mM; L-serina-<sup>14</sup>C, 10 mM/ml; ARN-t 3.14 mg/ml y fracción pH 5.0, 1.3 mg/ml, variando el — pH; fosfato de potasio, 50 mM, pH 7.0; Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5 y 8.0, aforo con agua desionizada a 50 ul. Se incubó 15 minutos a 37°. El producto se recuperó en la forma indicada en Materiales y Métodos. RESULTADO: pH óptimo: Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5. Una vez modificada una variable hasta encontrar su concentración óptima, ésta permanece constante en los ensayos que le siguen. (A todos los valores de es ta y las gráficas subsiguientes, les fue restado el valor de fondo de la prueba).

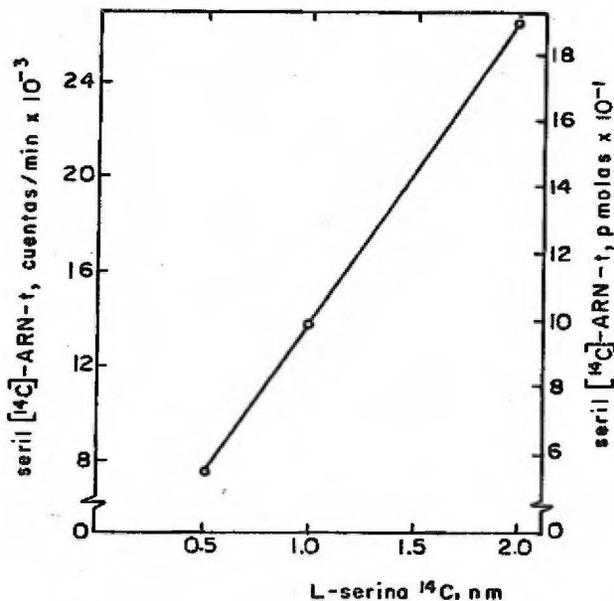


FIG. 28. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA L-SERINA- $^{14}\text{C}$  SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-SERINA- $^{14}\text{C}$ . Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 27, variando en este caso la concentración de la L-serina- $^{14}\text{C}$ : 0,5, 1,0 y 2,0 nm/sistema. El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima de la L-serina- $^{14}\text{C}$ : 40 nm/ml.

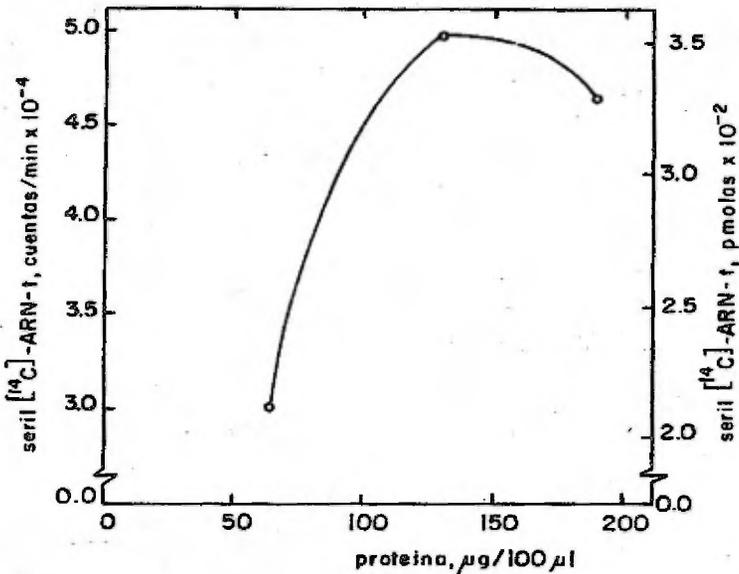


FIG. 29. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA FRACCION pH 5.0 SOBRE LA AMINOACILACION DE UNA PREPARACION CRUDA DE ARN-t CON L-SERINA- $^{14}\text{C}$ . Las condiciones de aminoacilación fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 28, variando en este caso la concentración de la fracción pH 5.0: 65, 130, y 195  $\mu\text{g}/\text{sistema}$ . El producto se recuperó en la forma acostumbrada. RESULTADO: Concentración óptima de la fracción pH 5.0: 2.6  $\text{mg}/\text{ml}$ .

TABLA 11.

ENSAYOS PARA LA OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMINOACILACION CON L-SERINA-<sup>14</sup>C.

<u>MODIFICACION</u>	<u>NIVEL OPTIMO</u>	<u>SERIE-<sup>14</sup>C-ARN-t</u>		<u>FIG.</u>
		<u>cpm</u>	<u>pmolas/<math>\lambda</math><sub>260</sub></u>	
1. pH	7.5	8220	15.52	27
2. L-serina- <sup>14</sup> C	40.0 nm/ml	26616	68.27	28
3. Enzima	2.6 mg/ml	49757	94.08	29

Todos los ensayos fueron realizados con L-serina-<sup>14</sup>C 128 mC/mmola; con la misma preparación enzimática y con ARN-t aislado por el método A.

Una vez modificada una variable ésta permanece constante en el siguiente ensayo.

A todos los resultados se les ha restado el valor de fondo de la prueba.

No es este el caso para el sistema con L-serina, - cuyo nivel de incorporación rebasa, inclusive, el nivel teórico (ver Tabla 6).

Suponiendo las condiciones de aminoacilación con L-leucina como óptimas, se atribuyó la ineficiencia de la incorporación al estado funcional del ARN-t.

El ARN-t aislado a través de métodos en los cuales la desproteínización se realiza con agentes desnaturizantes como el fenol, se denomina ARN-t convencional. El estado funcional o la actividad biológica de las preparaciones convencionales depende del tiempo de contacto del material ribonucleico con el agente desnaturizante. Entre mayor sea el tiempo de contacto, mayor será el daño al ARN-t y, en consecuencia, menor será su actividad biológica.

Con esta evidencia en mente, se han comparado las incorporaciones de L-leucina-<sup>14</sup>C y de L-serina-<sup>14</sup>C a las tres preparaciones de ARN-t convencional aisladas en este trabajo (ver Tabla 6). Las condiciones de aminoacilación son óptimas para todas las pruebas.

Para la L-leucina-<sup>14</sup>C, los niveles de incorporación de las preparaciones A y B son mucho menores al de la preparación C. Esta discrepancia en la incorporación no se presenta en el caso de la L-serina-<sup>14</sup>C, aunque la incorporación del aminoácido en la preparación C es mayor.

En relación a la incorporación teórica máxima de la L-leucina-<sup>14</sup>C, las preparaciones A y B sólo incorporan un 30 y un 50% respectivamente del valor esperado. En cambio la incorporación en el caso C representa el máximo esperado.

Las incorporaciones de la L-serina-<sup>14</sup>C son máximas para los casos A y B, y en el caso C inclusive rebasan el valor teórico.

Estos resultados ponen de manifiesto el daño sufrido por las especies de ARN-t de leucina durante el aislamiento de las preparaciones por los métodos A y B, que involucran varias extracciones con fenol. Aparentemente los isoaceptores de serina son más resistentes a la acción desnaturalizante del fenol.

4. COMPARACION DE LA INCORPORACION DE DIVERSOS L-AMINOACIDOS-<sup>14</sup>C A PREPARACIONES CRUDAS DE ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.

Se compararon las incorporaciones de la L-serina -<sup>14</sup>C, la L-leucina-<sup>14</sup>C, la L-valina-<sup>14</sup>C y la L-lisina-<sup>14</sup>C a diversas preparaciones crudas de ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, aisladas todas ellas por el método C.

A. COMPARACION DE LA INCORPORACION DE L-LEUCINA-<sup>14</sup>C Y DE L-SERINA-<sup>14</sup>C A ARN-t NO DESACILADO Y DESACILADO PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.

La determinación de la capacidad aceptora de las preparaciones de ARN-t se hizo en las condiciones óptimas de aminoacilación, descritas en Materiales y Métodos (pág. 26), omitiendo únicamente la mezcla de aminoácidos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 12.

No se manifiestan cambios importantes en las incorporaciones de ninguno de los aminoácidos a preparaciones de animal normal y de animal estimulado, ni entre las preparaciones no desaciladas y desaciladas.

La relación entre la capacidad aceptora de las preparaciones no desaciladas y desaciladas de ARN-t de hígado de rata con L-serina- $^{14}\text{C}$  y L-Leucina- $^{14}\text{C}$ , se indican en la Tabla 13. Los resultados ponen de manifiesto que las condiciones de desacilación no dañan apreciablemente la estructura del ARN-t, de tal manera que éste no pierde su actividad biológica.

B. COMPARACION DE LA INCORPORACION DE ALGUNOS L-AMINOACIDOS- $^{14}\text{C}$  A PREPARACIONES CRUDAS DE ARN-t DESACILADO DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.

Las aminoacilaciones de las preparaciones con L-serina- $^{14}\text{C}$ , L-leucina- $^{14}\text{C}$ , L-valina- $^{14}\text{C}$  y L-lisina- $^{14}\text{C}$ , fueron hechas en las condiciones óptimas de reacción como se señala en Materiales y Métodos (pág. 26).

Como lo indican los datos de la Tabla 14, no hay cambios apreciables en las incorporaciones para ninguno de los aminoácidos. Los mismos datos se encuentran gratificados en las Figs. 30-33

5. PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO DEL ARN-t DE SERINA DE HIGADO DE RATA NORMAL, POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE BD-CELULOSA.

A. PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO I.

En una columna de BD-celulosa de 1.5 x 26 cm. (Ma-

TABLA 12.

INCORPORACION DE L-SERINA-<sup>14</sup>C Y DE L-LEUCINA-<sup>14</sup>C A ARN-t<sup>a</sup>  
NO DESACILADO Y DESACILADO, PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA  
NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.

<u>RATA:</u> <u>ARN-t:</u>	<u>NORMAL</u>			<u>ESTIMULADA</u>		
	<u>NO DESACILADO</u>			<u>NO DESACILADO</u>		
	pmolas	µg	pmolas/µg	pmolas	µg	pmolas/µg
<u>AMINOACIDO</u>						
L-serina- <sup>14</sup> C	40.4	15.0	2.69	41.5	12.5	3.32
	84.0	30.0	2.80	73.5	25.0	2.94
	146.0	60.0	2.43	144.3	50.0	2.87
		prom.	2.64		prom.	3.04
L-leucina- <sup>14</sup> C	35.0	15.0	2.33	30.0	12.5	2.40
	67.4	30.0	2.46	60.2	25.0	2.41
	128.0	60.0	2.13	116.0	50.0	2.32
		prom.	2.31		prom.	2.38

<u>RATA:</u> <u>ARN-t:</u>	<u>NORMAL</u>			<u>ESTIMULADA</u>		
	<u>DESACILADO</u>			<u>DESACILADO</u>		
	pmolas	µg	pmolas/µg	pmolas	µg	pmolas/µg
<u>AMINOACIDO</u>						
L-serina- <sup>14</sup> C	40.0	13.8	2.90	42.0	14.3	2.95
	93.1	27.6	3.37	97.0	28.5	3.40
	176.5	55.2	3.20	182.0	57.0	3.19
		prom.	3.16		prom.	3.15
L-leucina- <sup>14</sup> C	29.1	13.8	2.11	28.3	14.3	1.99
	78.2	27.6	2.83	74.1	28.5	2.60
	149.0	55.2	2.70	141.0	57.0	2.47
		prom.	2.55		prom.	2.35

- a. ARN-t aislado por el método C y aminoacilado en las condiciones óptimas de reacción (Materiales y Métodos, pág. 26), sin la mezcla de aminoácidos. L-serina-<sup>14</sup>C, 126.0 mC/mmola; L-leucina-<sup>14</sup>C, 262.0 mC/mmola.

TABLA 13.

RELACION ENTRE LA CAPACIDAD ACEPTORA DE PREPARACIONES CRUDAS NO DESACILADAS Y DESACILADAS DE ARN-t DE HIGADO DE RATA.

<u>AMINOACIDO</u>	<u>PREPARACIONES DE ANIMAL</u>		<u>PREPARACIONES DE ANIMAL</u>	
	<u>NORMAL</u>		<u>ESTIMULADO</u>	
	<u>pmolas/<math>\mu</math>g ARN-t desacil.</u>	<u>pmolas/<math>\mu</math>t ARN-t no desacil.</u>	<u>pmolas/<math>\mu</math>g ARN-t desacil.</u>	<u>pmolas/<math>\mu</math>t ARN-t no desacil.</u>
L-serina- <sup>14</sup> C	1.08		0.89	
	1.20		1.16	
	1.32		1.11	
	prom. 1.20		prom. 1.04	
L-leucina- <sup>14</sup> C	0.90		0.83	
	1.15		1.08	
	1.27		1.07	
	prom. 1.10		prom. 0.99	

a. Las preparaciones crudas de ARN-t fueron aisladas por el método C. Su capacidad aceptora se determinó en las condiciones óptimas de aminoacilación, descritas en Materiales y Métodos (pág. 26), sin la mezcla de aminoácidos.

L-serina-<sup>14</sup>C, 128.0 mC/mmola; L-leucina-<sup>14</sup>C, 262.0 mC/mmola.

TABLA 14 .

INCORPORACION DE ALGUNOS L-AMINOACIDOS-<sup>14</sup>C A PREPARACIONES CRUDAS DE ARN-t DESACIADO DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO.<sup>a</sup>

<u>AMINOACIDO</u>	pmolas	µg	pmolas/µg	pmolas	µg	pmolas/µg
L-serina- <sup>14</sup> C	35.4	13.8	2.57	39.0	14.3	2.74
	92.5	27.6	3.35	94.2	28.5	3.31
	175.0	55.2	3.17	178.0	57.0	3.12
	prom.		3.03		prom.	3.06
L-leucina- <sup>14</sup> C	27.6	13.8	2.00	26.3	14.3	1.85
	55.7	27.6	2.02	53.7	28.5	1.88
	115.6	55.2	2.09	105.0	57.0	1.84
	prom.		2.03		prom.	1.86
L-valina- <sup>14</sup> C	26.0	13.8	1.88	25.8	14.3	1.81
	29.6	27.6	1.07	29.0	28.5	1.02
	31.2	55.2	0.57	29.3	57.0	0.51
	prom.		-		prom.	-
L-lisina- <sup>14</sup> C	18.6	13.8	1.35	18.2	14.3	1.28
	33.2	27.6	1.20	33.6	28.5	1.18
	61.8	55.2	1.12	63.7	57.0	1.12
	prom.		1.22		prom.	1.20

- a. Las preparaciones crudas de ARN-t fueron aisladas por el método C. Su capacidad aceptora se ensayó en las condiciones óptimas de aminoacilación, descritas en Materiales y Métodos (pág.26 ). Actividad específica (mc/mmola) L-serina-<sup>14</sup>C, 128.0; L-leucina<sup>14</sup>C, 262.0; L-valina-<sup>14</sup>C, 208.5; L-lisina-<sup>14</sup>C, 260.0. Estos datos están graficados en las figuras 30, 31, 32 y 33.

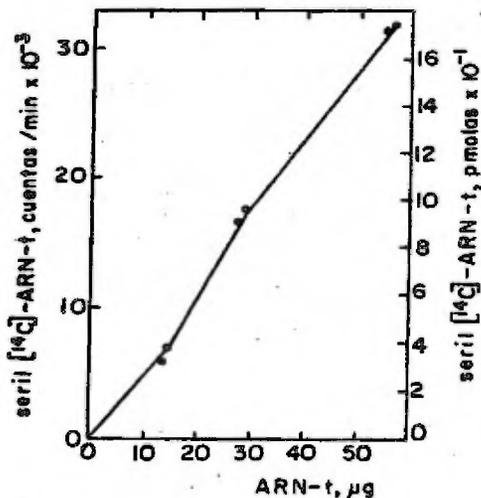


FIG. 30. INCORPORACION DE L-SERINA- $^{14}\text{C}$  A ARN-t (C) DESACILADO PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO. Se determinó la capacidad aceptora de preparaciones crudas y desacliladas de ARN-t aisladas por el método C, provenientes de hígado de rata normal (○-○-○) y de hígado de rata estimulada con hierro (●-●-●). Las condiciones de reacción fueron las óptimas y se describen en Materiales y Métodos (pág. 26). Estos datos aparecen en la Tabla 14.

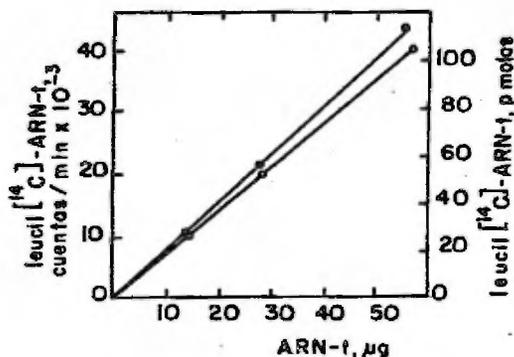


Fig. 31. INCORPORACION DE L-LEUCINA- $^{14}\text{C}$  A ARN-t (c) DESACILADO PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO. Se determinó la capacidad aceptora de preparaciones crudas y desaciladas de ARN-t aisladas por el método C, provenientes de hígado de rata normal (○-○-○) y de hígado de rata estimulada con hierro (●-●-●). Las condiciones de reacción fueron las óptimas y se describen en Materiales y Métodos (pág. 26). Estos datos aparecen en la Table 14.

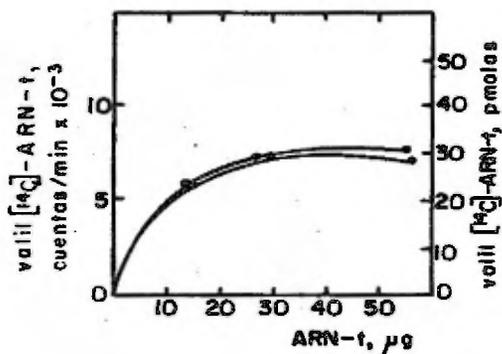


FIG. 32. INCORPORACION DE L-VALINA- $^{14}\text{C}$  A ARN-t (c) DESACILADO PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO. Se determinó la capacidad aceptora de preparaciones crudas y desaciladas de ARN-t aisladas por el método C, provenientes de hígado de rata normal (○-○-○) y de hígado de rata estimulada con hierro (△-△-△). Las condiciones de reacción fueron las óptimas y se describen en Materiales y Métodos (pág. 26). Estos datos aparecen en la Table 14.

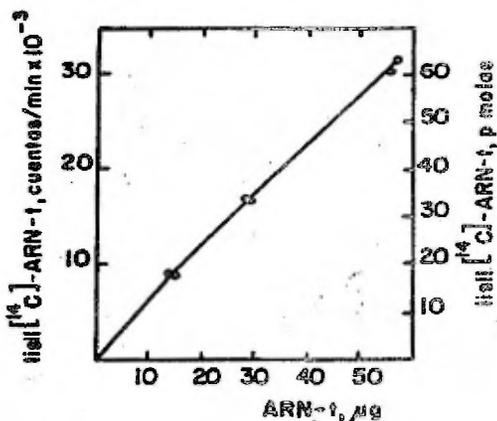


FIG. 33 INCORPORACION DE L-LISINA-<sup>14</sup>C A ARN-t (C) DESACILADO PROVENIENTE DE HIGADO DE RATA NORMAL Y DE HIGADO DE RATA ESTIMULADA CON HIERRO. Se determinó la capacidad aceptora de preparaciones crudas y desacyladas de ARN-t aisladas por el método C, provenientes de hígado de rata normal (o-o-o), y de hígado de rata estimulada con hierro (•-•-•). Las condiciones de reacción fueron las óptimas y se describen en Materiales y Métodos (pág. 26). Estos datos aparecen en la Tabla 14.

teriales y Métodos, pág. 34), fueron cromatografiados 100 mg de una preparación cruda de ARN-t, aislada por el método C.

Se buscó purificar y fraccionar el ARN-t de serina en un mismo proceso cromatográfico, aprovechando su comportamiento particular en BD-celulosa. La afinidad del ARN-t de serina por la BD-celulosa depende del  $Mg^{+2}$ . En ausencia de este metal el ARN-t de serina se fija a la celulosa benzoilada, en presencia del  $Mg^{+2}$  dicho ARN-t se desprende. En cambio, la mayoría de las especies de ARN-t no se fijan a la BD-celulosa en ausencia de  $Mg^{+2}$ .

Como se aprecia en el perfil de elución del ARN-t a través de la columna de BD-celulosa, y en la capacidad - aceptora de L-serina- $^{14}C$  de las fracciones eluidas, se tuvo buen éxito en la purificación del ARN-t de serina, pero no así en su fraccionamiento, (Fig. 34).

En la primera etapa del proceso cromatográfico, la etapa de purificación, se eliminan la mayoría de las especies de ARN-t. La capacidad aceptora de L-serina- $^{14}C$  de las fracciones correspondientes es virtualmente nula, con excepción de la fracción 90 que muestra cierta contaminación.

En las etapas intermedias entre la purificación y el fraccionamiento, es necesario equilibrar la columna con diferentes soluciones amortiguadoras que ahora contiene  $Mg^{+2}$ , con el fin de ajustar las condiciones del sistema para el fraccionamiento del material aún fijo a la columna. Durante este ajuste de las condiciones de cromatografía, no hay pérdidas apreciables de ARN-t de serina como lo muestran el perfil de elución de las fracciones que eluyen en esta fase, así como su falta de capacidad aceptora de L-serina- $^{14}C$ .

El fraccionamiento parcial logrado en la última etapa de este proceso cromatográfico, muestra una resolución

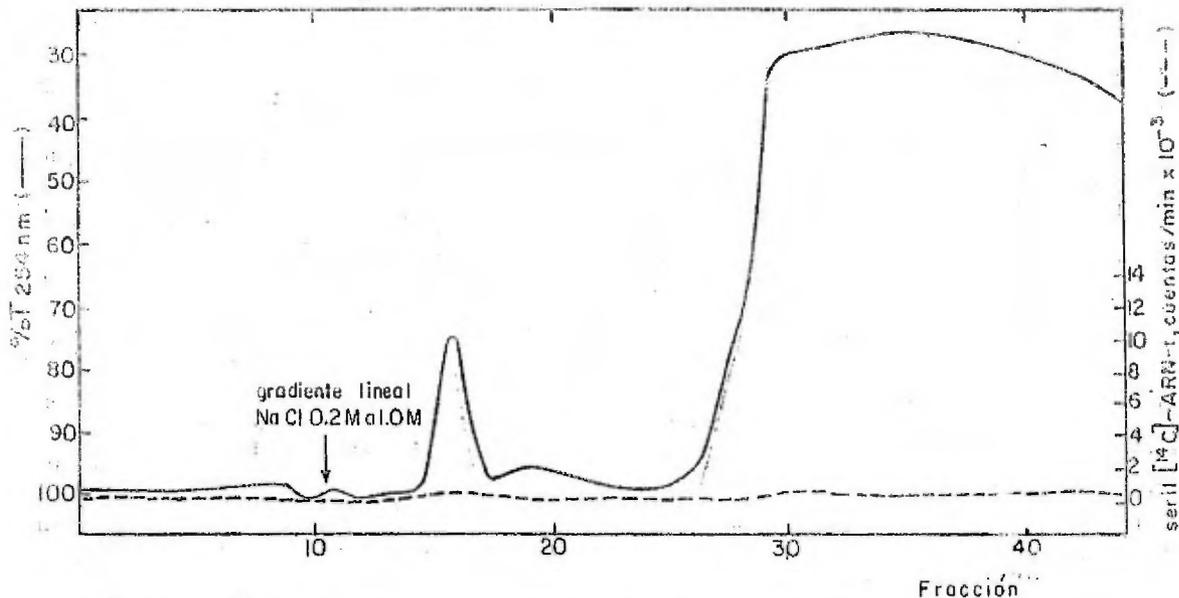
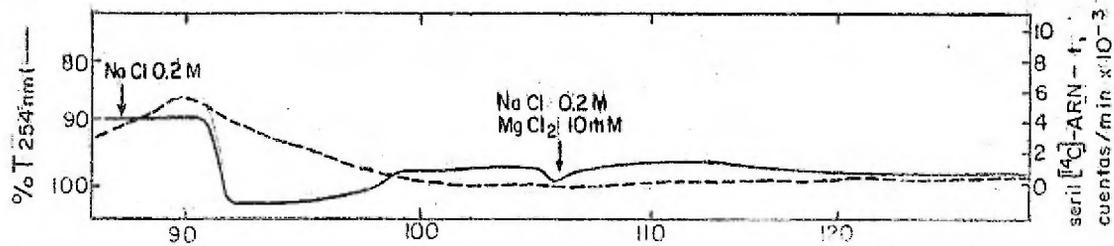
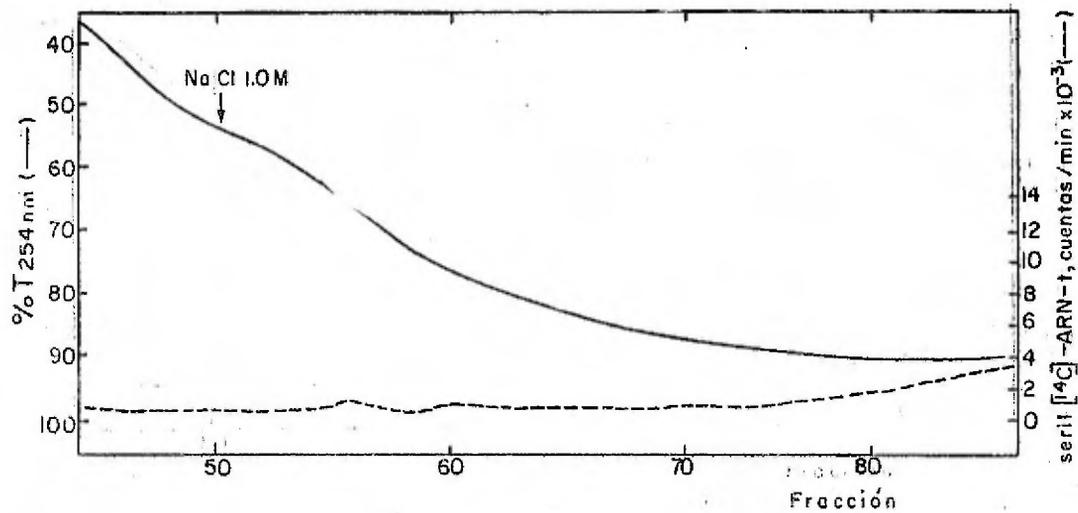
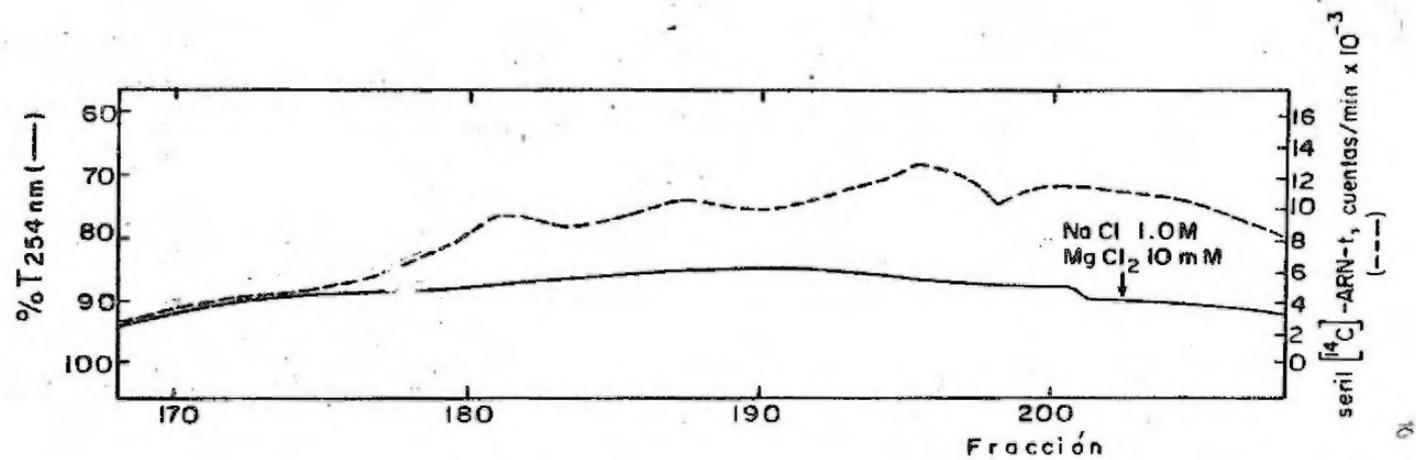
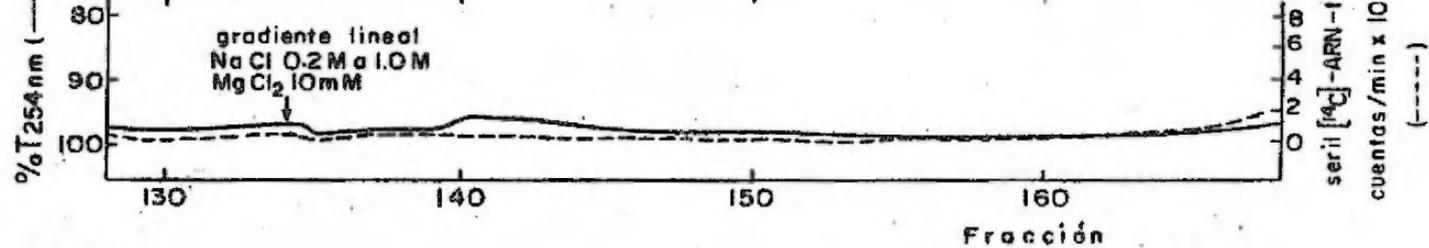
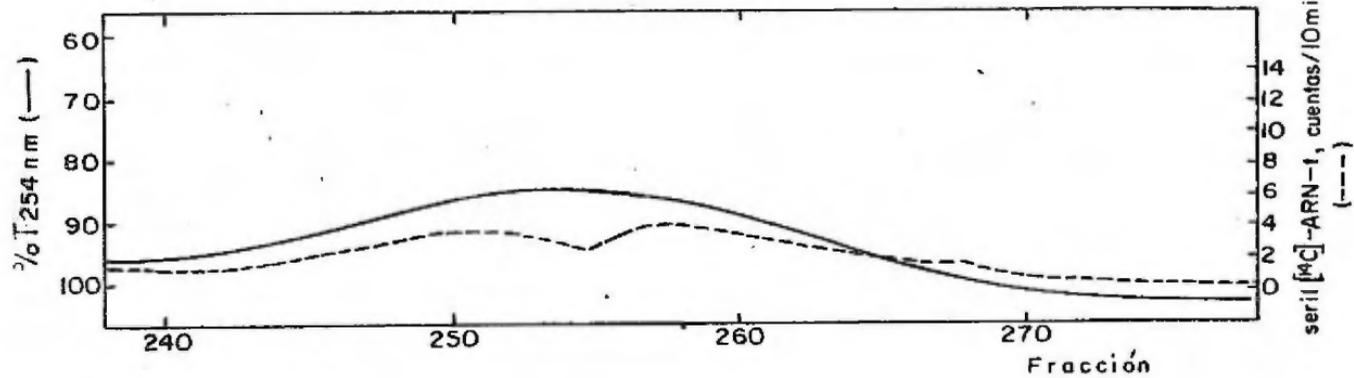
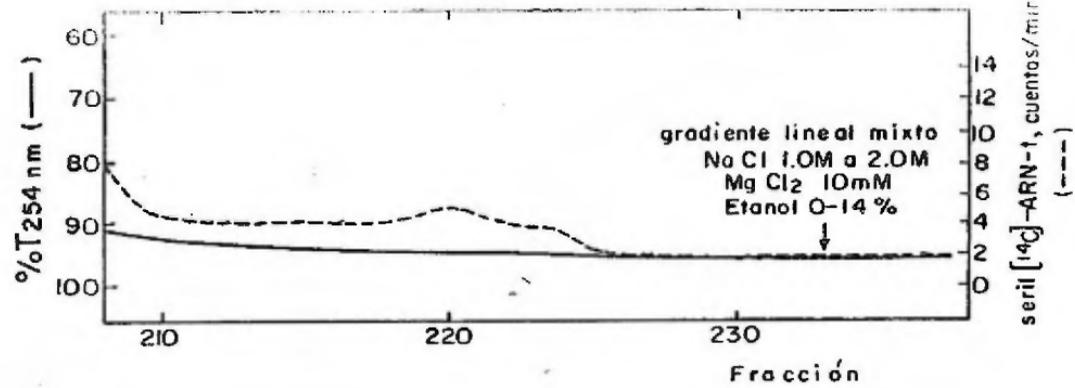


FIG. 34. PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO I EN COLUMNA DE BO-CELULOSA DEL ARN-t DE HIGADO DE RATA NORMAL. Se cromatografiaron 100 mg de una preparac.ón cruda de ARN-t de hígado de rata normal, aislada por el método C. Las condiciones del proceso se describen en Materiales y Métodos (pág. 34). La capacidad aceptora de L-serina<sup>14</sup>C de las fracciones eluidas (---), se determinó como se indica en Materiales y Métodos (pág. 28). Su actividad específica y grado de pureza se muestran en la Tabla 15.







muy baja. La absorbencia de las fracciones eluidas durante esta etapa, se traduce en dos bandas extensas de elución,

La primera de ellas muestra una alta capacidad — aceptora de L-serina- $^{14}\text{C}$ , encontrándose en esta sección fracciones con una actividad específica de 626 a 982 pmolas/ $A_{260}$ , correspondientes a un grado de pureza del orden de un 38,5 a 60,7%, respectivamente (Tabla 15).

La segunda banda tiene un nivel de incorporación — menor, siendo la máxima actividad específica de 390 pmolas/ $A_{260}$ , equivalente a un 26,6% de pureza. (Tabla 15).

Hay evidencias que permiten sospechar que las especies contaminantes en ambas bandas sean:  $\text{ARN-t}^{\text{Tir}}$ ,  $\text{ARN-t}^{\text{Trp}}$ ,  $\text{ARN-t}^{\text{Fen}}$  y  $\text{ARN-t}^{\text{Leu}}$  (72).

## B: FRACCIONAMIENTO II.

La baja resolución del fraccionamiento I, hizo evidente la necesidad de modificar las condiciones cromatográficas, para lograr un buen fraccionamiento. Las condiciones empleadas con tal fin, se describen en Materiales y Métodos — (Pág. 37).

Se sometieron a un segundo fraccionamiento, también en columna de BD-celulosa, de dimensiones 1,5 x 26 cm, — 2,8 mg de ARN-t de serina parcialmente fraccionado, correspondientes exclusivamente a la primera banda de elución con capacidad aceptora de L-serina- $^{14}\text{C}$  (Fig. 35)

TABLA 15.

CAPACIDAD ACEPTORA Y GRADO DE PUREZA DE LAS FRACCIONES  
UNIDAD DE LA COLUMNA DE BD-CELULOZA DURANTE LA PURIFI-  
CACION Y EL FRACCIONAMIENTO I.ª

<u>FRACCION<sup>b</sup></u>	<u>SERIL-<sup>14</sup>C-ARN-t</u> pmolas/A <sub>260</sub>	<u>% PUREZA<sup>c</sup></u>
60	25	1.5
90	486	30.0
151	982	60.7
187	865	53.6
195	955	59.7
199	781	48.4
201	794	49.1
207	848	52.5
215	626	38.5
227	512	31.6
253	390	26.6
257	311	19.2
255	199	12.3

- a. La purificación y el fraccionamiento I se hicieron en la forma descrita en Materiales y Métodos (pág. 34). Se usaron 100 mg de ARN-t aislado por el método C. La capacidad aceptora de las fracciones se determinó como se indica en Materiales y Métodos (pág. 28).
- b. Ver las gráficas de la figura 34.
- c. 1615 pmolas/A<sub>260</sub> equivalen a un 100% de pureza.

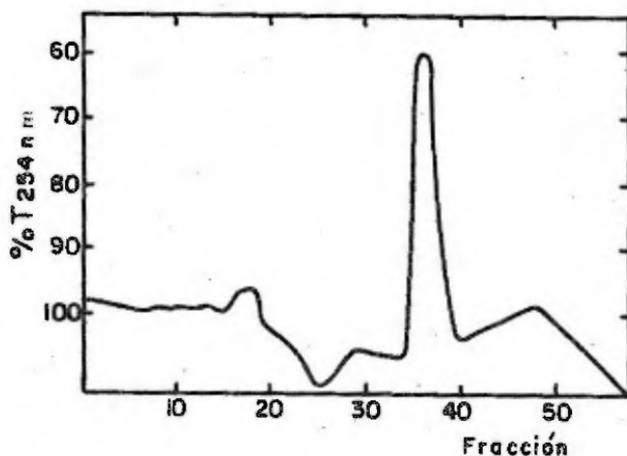


FIG. 35. FRACCIONAMIENTO II EN COLUMNA DE BD-CELULOSA DEL ARN-t DE SERINA DE HIGADO DE RATA NORMAL PARCIALMENTE FRACCIONADO. Fueron sometidos a un segundo fraccionamiento en columna de BD-celulosa de dimensiones 1,5 x 25 cm., 2,6 mg de ARN-t parcialmente fraccionados, correspondientes exclusivamente a la primera banda de elución con capacidad aceptora de L-serina-<sup>14</sup>C (Purificación y Fraccionamiento I, Fig. 34). Las condiciones del fraccionamiento II aparecen en Materiales y Métodos (pág. 37). La capacidad aceptora de L-Serina-<sup>14</sup>C de estas fracciones así como su grado de pureza se muestran en la Tabla 16.

TABLA 16.  
CAPACIDAD ACEPTORA DE L-SERINA-<sup>14</sup>C Y GRADO DE PUREZA DE  
ALGUNAS FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA DE ED-CELULOSA  
DURANTE EL FRACCIONAMIENTO II.<sup>a</sup>

<u>FRACCION<sup>b</sup></u>	<u>SERIL(<sup>14</sup>C)-ARN-t</u> pmolas/A <sub>260</sub>	<u>% PUREZA<sup>c</sup></u>
36	645	39.5
42	924	57.1
45	1150	71.3
49	1160	71.9
53	105	6.9

- a. El fraccionamiento II se hizo en la forma descrita en Materiales y Métodos (pág. 37). Se usaron 2.8 mg de ARN-t parcialmente fraccionado y purificado, aislado por el método C. La capacidad aceptora de las fracciones se determinó como se indica en Materiales y Métodos (pág. 28).
- b. Ver la gráfica de la figura 35.
- c. 1615 pmolas/A<sub>260</sub> equivalen a 100% de pureza.

Como se aprecia en la Fig. 35, la resolución de la cromatografía es notablemente superior a la del caso anterior. En algunos de los casos la actividad específica y el grado de pureza de las fracciones son mayores en un 10% a los valores obtenidos en el caso del fraccionamiento I (Tabla 16).

## IV

DISCUSION

Este estudio involucró el aislamiento a gran escala del ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, la preparación de aminoacil-ARN-t sinte tasas de hígado de rata normal y la optimización de las condiciones de aminoacilación con L-leucina-<sup>14</sup>C y con L-serina-<sup>14</sup>C. (La estimulación con hierro se ha hecho con el complejo hierro dextran, debido a su toxicidad prácticamente nula, aunque se pueden emplear otros compuestos como el citrato férrico (1). El hierro administrado en forma libre es altamente tóxico).

Con esta base metodológica fueron comparadas las -incorporaciones de la L-serina-<sup>14</sup>C a preparaciones de ARN-t de hígado de rata normal y de rata estimulada. También se purificó y fraccionó el ARN-t de serina.

Se estudiaron tres métodos de aislamiento de ARN-t. Los métodos A y B mostraron ser inadecuados para el aisla- miento a gran escala, debido a las limitaciones prácticas de los mismos, como son las múltiples extracciones fenólicas y el manejo de volúmenes demasiado grandes para las posibili- dades del laboratorio. En este sentido el método C no presen

tó dificultades. Empleando esta técnica se procesaron generalmente lotes de hígado del orden de los 500 g.

No fue sólo éste el motivo de haber descartado los métodos A y B. El criterio que normó esta decisión se basó en otros hechos experimentales, que se discuten a continuación.

El rendimiento del ARN-t por el método C es 46% mayor que el de cualquiera de los otros métodos (A ó B), aunque es menor al obtenido por los autores de la técnica en su comunicación original. Aparentemente el rendimiento máximo alcanzable de ARN-t de hígado de mamífero, es de aproximadamente 0.45 mg de ARN-t de tejido húmedo. (Tabla 17).

Es pertinente señalar que las modificaciones de las técnicas de aislamiento a gran escala de ARN-t de bacteria o de levadura, no son generales para cualquier órgano de mamífero. Así, el método diseñado para el aislamiento de ARN-t de hígado de res (24), tuvo un rendimiento 10 veces menor cuando se la empleó en el aislamiento del ARN-t de hígado de conejo (25).

La pureza de las preparaciones de ARN-t aisladas por los métodos A, B y C, fue analizada por cromatografía en columnas de Sephadex G100, (Figs. 5-13). Las diferentes preparaciones muestran una contaminación que eluye justo antes del ARN-t. La posición de elución de este material en una columna de Sephadex de dimensiones iguales a las empleadas en este trabajo, es similar a la del ARN-t dimerizado (65, 66), ARN-t desnaturalizado (64) y ARN 5S (62, 63).

Los dímeros de ARN-t tienen una capacidad de incorporación similar al monómero correspondiente (65, 66). Se determinó la capacidad aceptora de las fracciones que contenían dicha contaminación, sin encontrar incorporación de ninguno de los aminoácidos empleados (L-serina-<sup>14</sup>C, L-leucina-<sup>14</sup>C y L-fenilalanina-<sup>14</sup>C, Figs. 8, 9, 11, 12). Consecuentemen-

TABLA 17.  
COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS DE ARN-t DE HIGADO DE  
ANIMALES ALZADOS POR EXPERIMENTOS DISTINTOS.

<u>FUENTE</u>	<u>RENDIMIENTO</u>	<u>REF.</u>
	mg/ g de tejido húmedo	
Hígado de rata	0.45	23
Hígado de rata	0.37	esta tesis
Hígado de res	0.37	24
Hígado de conejo	0.40	25
Hígado de ternera	0.19	39

te, es muy poco probable que este material sea ARN-t dimerizado.

El ARN-t biológicamente inactivo eluye justo antes del ARN-t activo en las columnas de Sephadex G100 de dimensiones  $2,5 \times 100$  cm (64). Ello se debe a que la forma inactiva posee una estructura más extendida o asimétrica. El ARN-5S tiene una posición de elución en columnas de Sephadex que coincide con el ARN-t desnaturalizado, así como con el material que contamina las preparaciones de ARN-t obtenidas por los métodos A, B y C.

No se ha identificado este material ni como ARN-t desnaturalizado, no como ARN 5S, por lo que podría tratarse de cualquiera de ellos. La identificación del material puede realizarse digiriéndolo primero con ribonucleasa  $T_2$  y luego analizando el hidrolizado por cromatografía en capa delgada bidimensional (73).

La identificación de la pseudouridina en el hidrolizado, bastaría para asegurar que el material es ARN-t (desnaturalizado), puesto que el ARN 5S no contiene este nucleósido (60).

La presencia de una variedad de componentes menores ha sido considerada como una de las características típicas del ARN-t. En casi todas las especies de ARN-t existe - por lo menos una pseudouridina que ocurre en la secuencia -GT/C del asa próxima al extremo  $3'$  (-CCA), (74).

El ARN-t obtenido por los métodos A y B, tiene una contaminación con un material que eluye en el volumen vacío. Lo más probable es que se trate de ARN-r como contaminante principal, pudiendo contener además restos de ADN.

La contaminación del ARN-t con ADN debe evitarse - desde el principio de la extracción. Con esta preocupación - en mente, se han introducido las modificaciones pertinentes-

a la técnica de extracción.

Una técnica efectiva para la separación del ADN de las preparaciones de ARN-t, se basa en el uso del fenol caliente (75). Tres extracciones repetidas, de tres minutos cada una, en un baño a 60°, separa el 95% del ADN, que queda suspendido en el fenol.

También se ha observado que si el pH empleado durante la extracción del ARN-t se mantiene alrededor de 5, no se produce la contaminación con ADN. A valores de pH mayores de 5.5, son considerables las cantidades de ADN que se extraen junto con el ARN (76).

La contaminación con ADN de las preparaciones de ARN-t aisladas por los métodos B y C, ha sido virtualmente eliminada desde el principio de la extracción, homogeneizando el tejido en una solución amortiguadora con sacarosa 0.3M. En el método A el ADN se separó de las preparaciones por precipitación fraccionada con isopropanol.

El complejo hierro-dextran de las preparaciones de ARN-t de hígado de rata estimulada, obtenidas por el método B, se separa del material 4S eluyendo en el volumen vacío, fijado al material contaminante de alto peso molecular. No se sabe la naturaleza de su interacción con el material pesado con el cual coeluye. Es posible que el complejo hierro-dextrán se adsorba a la superficie de las moléculas de peso molecular elevado.

En el caso de los métodos A y C, el complejo hierro-dextrán se separa durante la precipitación fraccionada con isopropanol.

Las preparaciones de ARN-t aisladas por el método B presentan un fenómeno curioso. Aquéllas preparadas a partir de hígados de ratas normales, muestran una contaminación

con material de peso molecular bajo. A igual concentración - de ARN-t de hígado de rata estimulada con hierro, esta conminación desaparece (Figs. 7, 10). Este material ha sido analizado por precipitación con ácido tricloroacético al 10%, - así como por diálisis. Se muestra parcialmente sensible a ambas pruebas, indicando que es una mezcla de oligonucleótidos y quizás mononucleótidos, de diferentes pesos moleculares. - Existe interés en ahondar en la naturaleza de este fenómeno.

Por lo que toca a la capacidad aceptora de las diferentes preparaciones de ARN-t, ésta mostró ser superior en el caso del ARN-t obtenido por el método C, que en el caso - del ARN-t obtenido por cualquiera de los otros dos métodos. - Esto fue cierto tanto para las incorporaciones de L-leucina-<sup>14</sup>C como de L-serina-<sup>14</sup>C (Tabla 6.)

Suspechamos que la razón de la baja capacidad aceptora de las preparaciones de ARN-t obtenidas por los métodos A y B, se deba a que fueron sometidas a varias extracciones - con fenol, agente desproteinizante que se sabe puede dañar - al ARN (67). El ARN-t obtenido por el método C, que involu - cra una sola extracción fenólica, muestra una actividad espe - cífica para la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C 2.8 veces ma - yor que la del ARN-t aislado por el método A.

La mayoría de las técnicas de aislamiento de ARN-t emplean agentes desnaturalizantes para la desproteización - de los homogeneizados, como el fenol. Debido al daño que in - fieren estos agentes sobre las preparaciones de ARN-t, se - han desarrollado métodos en los cuales la desproteización - se realiza por adsorción de las proteínas y ribosomas a un - material inerte, como lo es el ácido silícico (77), o bien, - con un agente desnaturalizante como el dodecil-sulfato de so - dio, cuya interacción con los ácidos nucleicos es mínima, de - bido a la carga negativa de la molécula (69). El dodecil-sul - fato de sodio también tiene la ventaja de ser un inhibidor -

potente de las nucleasas.

Uno de los posibles daños que puede sufrir el ARN-t durante su aislamiento, es la pérdida de la secuencia terminal -CCA. Son tres los hechos experimentales que hacen suponer que la secuencia terminal de los ARN-t aislados por el método C permanece intacta durante el proceso de aislamiento:

i. Las incorporaciones de L-leucina-<sup>14</sup>C, L-serina-<sup>14</sup>C L-valina-<sup>14</sup>C y L-lisina-<sup>14</sup>C, se acercan los máximos teóricos esperados;

ii. Se aísla N-acetil-seril-ARN-t a partir de estas preparaciones. (15).

iii. El ARN-t aislado por la técnica original no incorpora CTP radiactivo (23).

La aminoacilación de las fracciones eluidas de las columnas de Sephadex y BD-celulosa, fueron realizadas en presencia de CTP, en previsión de un posible daño a la molécula de ARN-t durante su análisis cromatográfico. La concentración de CTP empleada es de 0.5 mM. Se tiene evidencia de que concentraciones altas de este nucleótido inhiben la aminoacilación (45). Las enzimas que catalizan la incorporación de los nucleótidos CTP y ATP al extremo terminal ARN-t, están presentes en la fracción pH 5,0; fuente de las aminoacil-ARN-t-sintetasas (78).

Durante el aislamiento del ARN-t se desea reducir al máximo, y si es posible eliminar totalmente, la actividad de ribonucleasa. Con tal fin ha resultado muy efectivo el uso de la bentonita (79,80,81). Este compuesto es un silicato de aluminio que posee propiedades de intercambio catiónico (80). Adsorbe a la ribonucleasa permitiendo su eliminación por centrifugación.

La actividad de ribonucleasa también se puede eli-

minar mediante el carbón activado (79). Este método tiene la desventaja de mostrar pérdidas del ARN-t por fijación al carbón (79).

El polivinilsulfato es otro inhibidor de la ribonucleasa (81).

Las tres etapas básicas del aislamiento de la fracción pH 5.0, fuente de las aminoacil-ARN-t-sintetasas de hígado de rata normal fueron:

- i. precipitación a pH 5.0
- ii. tratamiento con DEAE-celulosa
- iii. concentración por ultrafiltración

El ajuste del pH a 5.0 del sobrenadante postribosómico mantenido en un baño de hielo, fue hecho con exactitud, empleando un potenciómetro calibrado con un amortiguador previamente enfriado a 4° y de un pH de 4.0. No existe uniformidad respecto al pH óptimo de precipitación de la fracción pH 5.0. Algunos ajustan el pH del sobrenadante postribosómico a 5.15 (82) y otros a 5.20 (83).

Una vez precipitada la fracción pH 5.0, debe ser recuperada de inmediato. Se ha visto que la actividad enzimática de las preparaciones decrece rápidamente en función del tiempo de contacto con el ácido acético 1N (Tabla 7). El promedio del rendimiento del método es de 2.07 mg de proteína/g de hígado húmedo.

El objeto del tratamiento de la fracción pH 5.0, con DEAE-celulosa, resuspendida en el amortiguador ajustado a pH 7.6, es eliminar el ARN-t de la preparación enzimática, el cual también precipita a pH 5.0

Por otra parte en el curso del aislamiento de la fracción pH 5.0, se elimina el ATP.

Los controles de las aminoacilaciones, desprovistos en un caso de ARN-t y en otro de ATP, incorporan menos del 1% de la incorporación total obtenida en condiciones óptimas de reacción. Ello demuestra que las preparaciones enzimáticas no contienen cantidades apreciables de cualquiera de estos dos compuestos, que pudieran interferir con las cuantificaciones.

Las preparaciones pH 5.0 no mostraron actividad --ribonucleolítica (Fig. 14). Evidentemente la presencia de esta actividad causaría una reducción notable en los rendimientos de las aminoacilaciones.

Las aminoacil-ARN-t-sintetasas son enzimas lábiles. La concentración de enzima por unidad de volumen, es un factor importante en su estabilización. Las preparaciones almacenadas a concentraciones bajas, pierden rápidamente su actividad, a pesar de estar protegidas con 2-mercaptoetanol y glicerol. Ello motivó que las fracciones enzimáticas fueran concentradas por ultrafiltración (84). La técnica es eficiente. Se caracteriza por su rapidez y facilidad de manejo, así como por ser un método totalmente inocuo, que no altera la actividad enzimática de las preparaciones.

A partir de la ultrafiltración, las aminoacil-ARN-t-sintetasas deben protegerse con 2-mercaptoetanol, 0.01M. -- Una vez concentradas, son almacenadas en 50% de glicerol, a  $-20^{\circ}$ , permaneciendo estables durante 5 meses, al cabo de los cuales decae su actividad bruscamente.

La protección de la fracción pH 5.0 con 2-mercaptoetanol se debe a que la mayoría de las aminoacil-ARN-t-sintetasas muestran una disminución notable en su actividad catalítica en presencia de reactivos que se combinan con los grupos sulfhidrilo, como son el p-cloromercuribenzoato y el  $\text{HgCl}_2$ . Hasta la fecha no ha sido posible distinguir si la --

participación de los grupos -SH es directa, a nivel del mecanismo catalítico, o bien indirecta a través de un efecto sobre la conformación de la proteína (74).

Por lo que toca a las enzimas insensibles a los agentes mercuriales, la presencia de un reductor como el 2-mercaptoetanol (a concentraciones bajas) en la aminoacilación, no debe interferir con su actividad catalítica. La evidencia actual indica que el azufre contenido en las sintetetasas, se encuentra presente en la forma de grupos -SH y no constituyendo puentes disulfuro.

La presencia del 2-mercaptoetanol en las preparaciones enzimáticas empleadas en el curso de este trabajo, nunca motivó su inactivación.

El glicerol al 50% también fue empleado para preservar las preparaciones enzimáticas. El uso de este compuesto se atribuye a Muench y Berg (85).

En general, las aminoacil-ARN-t-sintetasas han sido protegidas con diferentes compuestos como son la sacarosa y la albúmina, así como con ATP y  $Mg^{+2}$  (45).

Almacenar la fracción pH 5.0 a  $-20^{\circ}$  suspendida en 50% de glicerol, evita la congelación de las muestras y la consecuente desnaturalización por congelaciones y descongelaciones repetidas.

Las aminoacil-ARN-t-sintetasas catalizan las siguientes reacciones (45):

- i. aminoacilación del ARN-t
- ii. intercambio ATP-PPi
- iii. formación del complejo enzima-ARN-t
- iiii. formación de hidroxamatos

Las condiciones óptimas para cada una de las reac-

ciones anteriores, requieren ser elucidadas con todo detenimiento. Los parámetros generalmente optimizados son: pH, fuerza iónica, concentración del aminoácido y en forma particular, las concentraciones absolutas de  $MgCl_2$  y ATP, y la relación  $Mg^{+2}/ATP$ .

Debido a la individualidad de especie de cada una de las sintetetas, no existe posibilidad de generalizar las condiciones de aminoacilación enzimática. Las condiciones óptimas de un sistema homólogo, de una especie dada, no son efectivas para la misma reacción en otra especie (Tabla 1). Inclusive, las condiciones reportadas por unos como óptimas pueden no ser las adecuadas para otros, a pesar de tratarse de la aminoacilación de ARN-t del mismo tejido con el mismo aminoácido (Tablas 18, 19). Es factible que estas diferencias residan a nivel de las preparaciones de las aminoacil-ARN-t-sintetasas y del ARN-t, aisladas a través de métodos diferentes.

Por otra parte las condiciones óptimas de aminoacilación de un sistema heterólogo son a su vez diferentes a las de un sistema homólogo. Se habla de una combinación heteróloga, cuando la aminoacil-ARN-t-sintetasa de una especie se emplea para cargar ARN-t de otra especie. Las condiciones óptimas de aminoacilación para la carga del ARN-t en un sistema homólogo, pueden ser enteramente inapropiadas e inclusive inhibitorias para la reacción con un ARN-t heterólogo (86).

Para elucidar las condiciones óptimas de reacción pueden seguirse dos enfoques:

i. Determinar las velocidades iniciales de reacción, estableciendo las  $K_m$  de los sustratos, así como la  $V_{máxima}$  de la reacción.

ii. Hallar las condiciones para la formación máxima de producto.

TABLA 18 .

CONDICIONES OPTIMAS DE AMPLIFICACION CON L-ISOLEUCINA-<sup>14</sup>C PARA PREPARACIONES DE ARN-t AISLADAS DE HIGADO DE RATON Y TERNERA.

	<u>RATA (43)</u>	<u>RATA (70)</u>	<u>RATA (+)</u>	<u>TERNERA (39)</u>
Tris-HCl, pH	50 mM, 7,6	100 mM, 7.4	50 mM, 7.0	-
Hepes, pH	-	-	-	100 mM, 8.0
Mg <sup>+2</sup>	1 mM	10 mM	3 mM	20 mM
ATP	1 mM	10 mM	5 mM	4 mM
Mg <sup>+2</sup> /ATP	1.0	1.0	0.6	5.0
GTP	0.5 mM	-	-	-
KCl	-	50 mM	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	-	5 mM
2-mercaptoetanol	-	-	-	40 mM
GSH	-	2 mM	-	-
a.a. <sup>14</sup> C	2.5 nm/ml	50 nm/ml	9.5 nm/ml	1.5 mmolas/ml
Mezcla de a.a.	50 uM, c/u	-	-	-
albúmina sérica	-	0.2 mg/ml	-	-
ARN-t	50 ug/ml	variable	1.14 mg/ml (C)	variable
enzima	0.2 mg/ml <sup>++</sup>	variable	variable <sup>+++</sup>	variable
Temperatura	21°	37°	37°	37°
tiempo	60 min.	30 min.	15 min.	30 min.
pmolas/A <sub>260</sub>	31.0	148.5	97.0	27.0

+ Valores encontrados en este trabajo. ++ Enzima semipurificada.

+++ Fracción pH 5.0, que contiene KCl 2 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM.

TABLA 19.

CONDICIONES OPTIMAS DE AMINOACILACION CON L-SERINA-<sup>14</sup>C PARA REPARACIONES  
DE ARN-t AISLADAS DE HIGADO DE RATA, Y TERNERA.

	<u>RATA (+)</u>	<u>RATA (70)</u>	<u>TERNERA (39)</u>
Tris-HCl, pH	50 mM, 7.5	100 mM, 7.4	-
Hepes, pH	-	-	100 mM, pH 8.0
Mg <sup>+2</sup>	15 mM	10 mM	10 mM
ATP	5 mM	10 mM	2 mM
Mg <sup>+2</sup> /ATP	3.0	1.0	5.0
CTP	-	-	-
KCl	-	50 mM	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	-
2-mercaptoetanol	-	-	6 mM
GSH	-	2 mM	-
a.a. <sup>14</sup> C	40.0 nm/ml	50 nm/ml	1.5 mmolas/ml
Mezcla de a.a.	-	-	-
albúmina sérica	-	0.2 mg/ml	-
ARN-t	1.14 mg/ml(C)	variable	variable
enzima	variable <sup>++</sup>	variable	variable
Temperatura	37°	37°	37°
tiempo	15 min.	30 min.	30 min.
pmolas/A <sub>260</sub>	110.9	167.0	63.0

+ Valores encontrados en este trabajo.

++ Fracción pH 5.0, que contiene KCl 2.5 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM

El primer caso da una idea respecto a la efectividad de la enzima y en el segundo caso se establece el rendimiento máximo alcanzable para un sistema dado.

Ambos caminos pueden conducir al mismo resultado:— conocer las concentraciones óptimas de los componentes de la aminoacilación que resultan en la formación de un producto final con rendimientos que se acercan a los rendimientos máximos, teóricamente establecidos, cuyos valores de ninguna manera pueden considerarse absolutos (materiales y Métodos,— pág. 46).

El curso de las pruebas de optimización realizadas en este trabajo se han basado en el segundo de los enfoques— anteriormente señalados.

En el curso de los ensayos de optimización de las reacciones de aminoacilación con L-leucina- $^{14}\text{C}$  y L-serina- $^{14}\text{C}$ , las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y ATP, así como la relación  $\text{Mg}^{+2}/\text{ATP}$ , mostraron una influencia básica en dicha reacción.

Hasta la fecha no se sabe con certeza el papel que juega el  $\text{Mg}^{+2}$  en la aminoacilación. Como toda reacción enzimática en la que está involucrado el ATP, la participación del  $\text{Mg}^{+2}$  en las reacciones catalizadas por las aminoacil-ARN-t-sintetasas, es indispensable. Las concentraciones de dicho metal en las reacciones son determinadas por los requerimientos específicos de la enzima o del ARN-t dados.

Existe actualmente la creencia de que el  $\text{Mg}^{+2}$  ayuda a la unión del ATP con la enzima, disipando la carga negativa concentrada en el estado de transición (87).

El magnesio ejerce una influencia decisiva sobre la conformación del ARN-t. Es muy posible que el reconocimiento del ARN-t por la enzima dependa en gran parte de su configuración espacial. Se ha reportado el aislamiento de

ARN-t en estados de diferente actividad biológica (64). Aparentemente esta diferencia puede deberse a una alteración en el contenido del metal divalente. La técnica empleada en la renaturalización del ARN-t y su transformación en una entidad con actividad biológica involucra la incorporación de  $Mg^{+2}$ . El uso de algún otro metal divalente como el  $Co^{+2}$ , el  $Ca^{+2}$  o el  $Mn^{+2}$ , da por resultado una renaturalización parcial (88). Sin embargo, Ishida y Sueoka (89) han reportado la renaturalización del ARN-t en un medio libre de  $Mg^{+2}$ .

Se sospecha que el magnesio refuerza la estructura secundaria del ARN-t, protegiendo a la molécula de la acción de las nucleasas (90) y causando también un incremento en la  $T_m$  (temperatura de fusión) (90).

La estructura biológicamente activa del ARN-t es determinada por la interrelación de las condiciones ambientales de temperatura y fuerza iónica, con todas las interacciones intramoleculares dictadas por la secuencia primaria de los nucleótidos de la macromolécula (91).

Existe evidencia contradictoria acerca del papel que tiene el  $Mg^{+2}$  en la esterificación del ARN-t a partir del aminoacil-adenilato.

No parecen existir diferencias de opinión respecto al requerimiento de  $Mg^{+2}$  en la formación del aminoacil-adenilato, primer intermediario en la reacción de aminoacilación—según el mecanismo secuencial (92).

La mayoría de las sintetetasas pueden transferir el aminoacil-adenilato al ARN-t homólogo en ausencia de  $Mg^{+2}$  (90). Las excepciones reportadas son la transferencia del complejo enzima-seril-adenilato de levadura (93) y el complejo enzima-treonil-adenilato de rata (94). En el caso del complejo enzima-treonil-adenilato, se argumenta que el requerimiento absoluto del  $Mg^{+2}$  en la reacción de transferencia in-

dica que el  $Mg^{+2}$  no está unido al complejo enzima-treonil-adenilato.

Zimmerman y Robison (95) sugieren que la aparente oposición de las conclusiones concernientes al requerimiento de  $Mg^{+2}$  en la reacción de esterificación, es consecuencia de las diferencias en las condiciones de reacción. Ellos reportan el mismo grado de formación del fenilalanil-ARN-t de levadura de pan en las siguientes condiciones de reacción:

- i. Tris-acetato 10 mM, pH 7.2 en presencia de  $Mg^{+2}$  20 mM, ó
- ii. Citrato o cacodilato de sodio 50 mM pH 6.2, ó - succinato de sodio 50 mM pH 6.1, en ausencia de  $Mg^{+2}$ .

Esta suposición es muy factible, ya que Norris y Berg (96) emplean el cacodilato de sodio 50 mM, pH 7.0 - - (sin  $Mg^{+2}$ ) en la reacción de esterificación, mientras que Allende, et al. (94) y Bluestein, et al. (93), usan Tris-HCl 80 mM pH 8.0 y 10 mM, pH 7.0, (con  $Mg^{+2}$ ), respectivamente. Aparentemente los aniones citrato, succinato y cacodilato sustituyen al  $Mg^{+2}$  en la reacción de esterificación.

El papel del aminoacil-adenilato en la aminoacilación no se ha establecido contundentemente. Hele y Barber (97) reportan la formación del lisil-ARN-t a través de dos mecanismos. Uno de ellos involucra la formación del aminoacil-adenilato, cuya transferencia al ARN-t es inhibida en presencia de  $Mg^{+2}$  y estimulada en presencia de  $NH_4^+$ . En cambio, cuando la aminoacilación se realiza en presencia del complejo enzima-ATP o ATP, lisina y ARN-t, la reacción es estimulada con  $Mg^{+2}$  e inhibida por el ión  $NH_4^+$ .

El primer tipo de reacción corresponde a un mecanismo secuencial y el segundo a uno concertado (87).

Pastuszyn y Loftfield (98), señalan que el mecanis

mo de la aminoacilación *in vitro* es secuencial, mientras que *in vivo* postulan un mecanismo concertado.

Por lo que toca a la sustitución en la aminoacilación del  $Mg^{+2}$  por otros cationes divalentes, ya sean éstos - inorgánicos:  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , y  $Cu^{+2}$ , u orgánicos: poliaminas como la espermina, espermidina y putrescina, la reducción en la incorporación hace evidente la especificidad del  $Mg^{+2}$  en la reacción.

No es posible generalizar los efectos de la sustitución del  $Mg^{+2}$  por otros cationes, debido a que sólo son algunos los sistemas que han sido sometidos a investigación.

El papel del ATP en la reacción de aminoacilación es evidente. Constituye la fuente energética del sistema. Activa al aminoácido formando o no un complejo altamente reactivo, el aminoacil-adenilato (mecanismo secuencial o concertado, respectivamente).

Su presencia en la reacción es virtualmente insustituible. El ADP, GTP, CTP, UTP, dCTP y dTTP no reemplazan - al ATP. Se tiene evidencia de que el dATP inhibe la reacción de intercambio ATP:PPi, pero sí es efectivo en la reacción - de la esterificación (90).

Las concentraciones óptimas de  $Mg^{+2}$  y ATP se encuentran íntimamente ligadas. Las razones de esta interrelación aún no han sido firmemente establecidas. Es posible que gran parte de la interdependencia se deba a la formación de complejos  $Mg-ATP$  que sean estables y activos.

A este respecto Cole y Schimmel (99) presentan evidencia de la formación de complejos entre el magnesio y el - ATP. Relacionando valores teóricos con resultados obtenidos experimentalmente, han establecido que los complejos activos en la reacción de intercambio ATP-PPi son  $MgP_2O_7^{-2}$  y  $MgATP^{-2}$ .

Tanto las especies iónicas  $\text{ATP}^{-4}$ ,  $\text{HATP}^{-3}$ ,  $\text{NaATP}^{-3}$ ,  $\text{HP}_2\text{O}_7^{-3}$  y  $\text{NaP}_2\text{O}_7^{-3}$ , presentes en el medio de la reacción en concentraciones apreciables, así como aquellas presentes en concentraciones muy reducidas, como son  $\text{MgHATP}^{-1}$ ,  $\text{MgHP}_2\text{O}_7^{-1}$  y  $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ , no ejercen influencia en la reacción.

A concentraciones altas de  $\text{Mg}^{+2}$ , Cole y Schimmel - encuentran un decremento en la velocidad de reacción debido a la desaparición de la especie activa  $\text{MgP}_2\text{O}_7^{-2}$  y la formación del complejo inactivo  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

La formación de complejos entre el  $\text{Mg}^{+2}$  y el ATP - parece tener una aceptación general (100).

Lo que resulta sorprendente es la gama de relaciones  $\text{Mg}^{+2}/\text{ATP}$  que han sido descritas como óptimas para diferentes enzimas de diferentes especies (Tabla 20).

Aparentemente, el metal juega un papel adicional - en la catálisis de la activación del aminoácido. Mehler y Chakraborty (74), sospechan que el efecto primario del magnesio es sobre la estructura y actividad de la enzima. Hasta la fecha no ha sido posible aislar un complejo estable formado entre la enzima y el  $\text{Mg}^{+2}$ .

La relación  $\text{Mg}^{+2}/\text{ATP}$  óptima depende de las concentraciones absolutas de los reactivos (Fig. 22).

En la Fig. 19, se observa que a una concentración constante de ATP de 1mM, concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{+2}$  - inhiben la aminoacilación de una preparación cruda de ARN-t (A) con L-leucina- $^{14}\text{C}$ .

La máxima incorporación ocurre cuando la relación de las concentraciones entre el  $\text{Mg}^{+2}$  y el ATP equivale a 1. Con un incremento de  $\text{Mg}^{+2}$  de 0 a 5 mM (sobre el nivel de magnesio presente en la preparación enzimática), se observa-

TABLA 20

RELACIONES<sup>+</sup> Mg<sup>+2</sup>/ATP ÓPTIMAS PARA LA AMINOACILACION DE  
DETERMINADOS SISTEMAS.

<u>ORGANISMO</u>	<u>SUBSTRATO</u>	<u>Mg<sup>+2</sup>/ATP</u>	<u>REF.</u>
E. coli	L-leucina	10	90
"	L-prolina	30	"
E. coli	L-glutamato	15	"
"	L-glutamina	2	"
Levadura	L-serina	1.5-2.5	"
Rata o ratón	L-leucina	0.8	71
"	L-glutamato	1.5	"
"	L-metionina	2.0	"
"	L-prolina	"	"
"	L-treonina	"	"
"	L-glutamina	"	"
"	L-arginina	3.0	"
"	L-histidina	"	"
"	L-triptofano	"	"
"	L-serina	"	"
"	L-valina	"	"
"	L-asparagina	"	"
"	L-alanina	5.0	"
"	L-aspartato	"	"
"	L-isoleucina	"	"
"	L-lisina	"	"
"	L-fenilalanina	"	"

+ Unas son óptimas para la reacción de intercambio - ATP-PPi; otras son óptimas para las aminoacilaciones.

++ La relación Mg<sup>+2</sup>/ATP es óptima para varios tejidos de estos organismos.

un decremento casi lineal en la incorporación de la L-leucina- $^{14}\text{C}$  (Fase I).

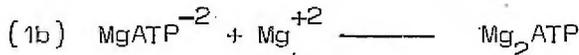
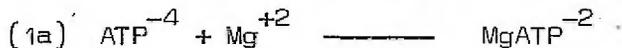
A concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  de 5 a 10 mM (Fase II), el decremento en la incorporación no es tan brusco como lo es en la Fase I. La pendiente de la curva de inhibición en la Fase II es mucho menor.

A partir de una concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  de 10 mM, el nivel de incorporación de la L-leucina- $^{14}\text{C}$  se mantiene constante (Fase III).

Como posible explicación del fenómeno anterior, se puede postular la existencia de especies inactivas de  $\text{Mg}^{+2}$  y ATP, cuya variación en concentración afectan favorable o desfavorablemente la aminoacilación.

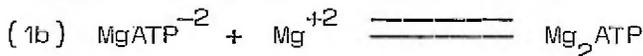
La especie activa del ATP en la aminoacilación es el complejo iónico  $\text{MgATP}^{-2}$  (91).

En la Fase I el incremento en la concentración del  $\text{Mg}^{+2}$  favorece el equilibrio de la reacción (1b) hacia la formación de la especie hipotética  $\text{Mg}_2\text{ATP}$ .



El complejo  $\text{Mg}_2\text{ATP}$  sería inactivo en la aminoacilación.

El grado de inhibición en la Fase II, es un reflejo de la importancia, adquirida con el tiempo, de la reacción (1b) en sentido inverso:



A medida que crece la concentración de la especie-

inactiva  $Mg_2ATP$ , con el incremento en la concentración de  $Mg^{+2}$ , el grado de disociación de dicha especie va cobrando importancia.

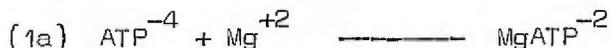
En la Fase III, la reacción (1b), alcanza el equilibrio. Este depende exclusivamente de la concentración del ATP. Ya que la concentración del ATP en el medio de la reacción es fija, la incorporación de L-leucina- $^{14}C$  se mantiene constante y del orden de  $6.02 \text{ pmolas/A}_{260}$ , independientemente de incrementos en la concentración del  $Mg^{+2}$ .

Suponiendo la existencia de ciertas especies inactivas de  $Mg^{+2}$  y ATP, también se pueden explicar los resultados que aparecen graficados en la Fig. 22.

Cuando la concentración de  $Mg^{+2}$  es de 0.8 mM, el incremento en la concentración del ATP produce una inhibición marcada en la incorporación de la L-leucina- $^{14}C$  a la preparación cruda de ARN-t (A).

El fenómeno tiene dos explicaciones posibles. Una de las funciones atribuidas a la especie  $MgATP^{-2}$ , es la de reducir la carga negativa del ATP al interaccionar éste con la aminoacil-ARN-t-sintetasa. A concentraciones limitantes de  $Mg^{+2}$  el exceso de ATP no sólo es inefectivo en la reacción de aminoacilación con la L-leucina- $^{14}C$ , sino que parece ejercer un efecto inhibitorio, por dilución de la especie activa. El incremento en la concentración del ATP, causa una dilución de la especie activa ( $MgATP^{-2}$ ) tal, que las posibilidades de una interacción efectiva de dicha especie con la enzima son mínimas.

El fenómeno también puede explicarse en función de la formación de un complejo hipotético entre un átomo de  $Mg^{+2}$  y dos moléculas de ATP:



En forma análoga a su participación en la formación de ribosomas a partir de subunidades, el magnesio podría servir de puente entre dos moléculas de ATP (reacción 1c).

Conforme crece la concentración del ATP, éste atraería la especie activa  $\text{MgATP}^{-2}$  para formar el complejo  $\text{MgATP}_2^{-6}$  que sería inactivo en la aminoacilación.

Como lo muestran las otras gráficas de la Fig. 22. un incremento en la concentración del metal divalente, estabiliza al sistema.

Aparentemente la relación  $\text{Mg}^{+2}/\text{ATP}$  por sí sola no es determinante en la aminoacilación. Igualmente importantes son las concentraciones absolutas del  $\text{Mg}^{+2}$  y del ATP.

La relación  $\text{Mg}^{+2}/\text{ATP}$  óptima, compara favorablemente con el valor reportado por Yang y Novelli (71).

Un componente importante de considerar en la optimización de las condiciones de aminoacilación, es el amortiguador empleado en el sistema.

La importancia de seleccionar el amortiguador adecuado y de optimizar su concentración y pH en la reacción de aminoacilación, reside en el hecho de que los amortiguadores no son necesariamente compuestos que sólo mantienen el pH de la mezcla de reacción. En la aminoacilación, tanto de un sistema homólogo (101) como de uno heterólogo (101), manifiestan una interacción cuya naturaleza aún no ha sido elucidada.

En el presente trabajo se optimizaron la concentración y el pH del amortiguador Tris-HCl, para las aminoacilaciones de las preparaciones crudas de ARN-t de L-leucina-<sup>14</sup>C

y L-serina- $^{14}\text{C}$ . Los valores óptimos fueron: 50 mM, pH 7.0, y 50 mM, pH 7.5, respectivamente. Estos últimos parecen ser — los adecuados para las aminoacilaciones de la mayoría de los aminoácidos (71). Es por ello que fueron empleados en las aminoacilaciones con L-valina- $^{14}\text{C}$  y L-lisina- $^{14}\text{C}$ .

Los amortiguadores comúnmente empleados en las aminoacilaciones son, en orden de frecuencia: Tris-HCl, cacodilato de sodio, fosfato de potasio y Hepes.

En la selección del amortiguador, debe tenerse en mente, que los aniones con propiedades quelantes son extraordinariamente inhibitorios.

Concentraciones del orden de 20 mM de fosfato, ésteres de fosfato o citrato, pueden inhibir la reacción de esterificación en un 50%, aproximadamente. Se ha observado que el efecto inhibitorio es más pronunciado en el caso de sistemas heterólogos que en el de sistemas homólogos, (45).

Es poco probable que la inhibición causada por los compuestos nucleofílicos anteriormente citados, se deba exclusivamente a un efecto sobre la fuerza iónica del medio, ya que nucleófilos no aniónicos, como el imidazol o la o-fenantrolina (45), ejercen un efecto similar.

Es posible que este fenómeno de inhibición pueda atribuirse a la existencia, en las aminoacil-ARN-t-sintetasas, de un centro enzimático catiónico, sensible a la desactivación en presencia de iones quelantes.

Por su parte la acción de bases monofuncionales sobre la aminoacilación (45), así como la formación de hidroxamatos (45), es de estimulación. Algunas de las bases que muestran esta propiedad son: la hidroxilamina, el amonio, el Tris y la colidina.

En el transcurso de las pruebas de optimización se encontró que un sistema de aminoacilación óptimo es muy sensible a cambios de pH en un rango de 7.0 a 9.0 (Fig. 25). En cambio, en condiciones de aminoacilación subóptimas el sistema es muy poco sensible a cambios de pH (Fig. 20).

Es factible suponer que la insensibilidad observada en el caso del sistema de aminoacilación subóptimo, fuese el resultado de una limitación artificial del nivel de incorporación, por no encontrarse los sustratos de la reacción en concentraciones saturantes. Esta sospecha es justificada en base al hecho, de que una vez optimizadas las concentraciones de la L-leucina-<sup>14</sup>C y del ARN-t, se manifiesta la sensibilidad del sistema al pH.

Como se señaló anteriormente la optimización de la concentración de los sustratos es fundamental para alcanzar un nivel de incorporación eficiente.

Las concentraciones óptimas de L-leucina-<sup>14</sup>C y de L-serina-<sup>14</sup>C fueron: 10 nm/ml y 40 nm/ml, respectivamente.

El valor óptimo de la concentración del ARN-t en la aminoacilación con L-leucina-<sup>14</sup>C fue de 0.415 mg/ml para preparaciones aisladas por el método A, y de 1.14 mg/ml para las preparaciones aisladas por el método C.

Incrementos en la concentración del ARN-t (A), por arriba del valor óptimo, causan incrementos aparentes en la incorporación. Sin embargo, la relación de las picomolas incorporadas por  $A_{260}$  se reduce notablemente (Tabla 10). Ello indica que cuando las concentraciones de ARN-t exceden el valor óptimo, hay una reducción paralela en la eficiencia del sistema.

En la Fig. 23 se muestra el efecto de la variación de la concentración del ARN-t por arriba del valor óptimo so

bre la aminoacilación de una preparación cruda con L-leucina- $^{14}\text{C}$ . Aparentemente, la incorporación a una concentración de ARN-t de 0.083 mg/100  $\mu\text{l}$  es menor a la que se obtiene a una concentración de 1.036 mg/100  $\mu\text{l}$ , equivaliendo estas incorporaciones a 65.6 y 380 pmolas de leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARN-t, respectivamente. Sin embargo, la relación de pmolas/ $A_{260}$  equivale a 33.2 en el primer caso y 16.6 en el segundo. Estos valores ponen de manifiesto la reducción en la eficiencia del sistema.

Es la relación de las picomolas por  $A_{260}$ , la que determina el grado de optimización y la eficiencia de un sistema de aminoacilación.

Consecuentemente, un incremento en la concentración del ARN-t por arriba de su valor óptimo, requiere de un incremento proporcional en los demás componentes del sistema, para mantener la eficiencia del mismo. Ello debe tenerse en mente cuando se extrapolan las condiciones óptimas de reacción de micro-aminoacilaciones a sistemas de incorporación a gran escala.

El sistema de aminoacilación con L-leucina- $^{14}\text{C}$  mostró una mayor sensibilidad al tiempo de incubación, una vez alcanzadas las condiciones óptimas de reacción (Figs. 16,26), decayendo la incorporación a partir de los 15 minutos de incubación.

Se ha descartado la posibilidad de que este fenómeno se deba a la destrucción del producto de la reacción - por una posible actividad rebonucleolítica de la fracción - pH 5.0. La evidencia experimental adquirida (Fig. 14) muestra que las preparaciones enzimáticas no contienen nucleasas.

El incremento de la sensibilidad con el tiempo de incubación del sistema de aminoacilación con L-leucina- $^{14}\text{C}$ , puede deberse a la acumulación del PPI (45).

El PPI puede estar invirtiendo la reacción de formación del leucil-adenilato, reduciendo la cantidad del intermediario disponible para la reacción con el ARN-t<sup>Leu</sup>.

También es posible que el PPI ejerza un efecto directo sobre el sitio activo de la enzima, puesto que incluso se ha observado que dicho nucleófilo inhibe la reacción de intercambio, (45).

Otra explicación del fenómeno podría ser la que dan Shearn y Horowitz (29). Ellos han obtenido una cinética de incorporación similar a la de la Fig. 26, para los casos de la incorporación de alanina, metionina, glutamina y glutamato a una preparación cruda de ARN-t de *Neurospora crassa*. Han encontrado que en el caso de la alanina, la pérdida del producto se debe a la inestabilidad de la unión aminoacilo. En el caso de la incorporación de la metionina de la glutamina y del glutamato, dicha pérdida se debe a una falta de ATP en la fase tardía de la reacción, puesto que en la fase temprana ocurre una hidrólisis del exceso de ATP. Añadiendo fosfoenolpiruvato al medio de incubación, estabilizan el sistema manteniendo un nivel adecuado de ATP.

En las pruebas de optimización de las condiciones de reacción de la aminoacilación, debe tenerse en mente que la incorporación experimental máxima de un aminoácido dado a una preparación cruda de ARN-t depende de dos factores:

- i. El número de isoaceptores de dicho aminoácido.
- ii. El efecto sobre la velocidad de reacción de cada uno de los isoaceptores en las condiciones óptimas de reacción empleadas.

En la determinación de la incorporación teórica máxima, no se considera la velocidad de reacción individual de cada uno de los isoaceptores de un aminoácido dado, que se sabe pueden variar (29). Los parámetros involucrados en el

cálculo son (Materiales y Métodos, págs. 46, 47):

i. El número total de isoaceptores conocidos, que en el caso de la célula de mamífero equivale aproximadamente a 80. (60).

ii. El número de especies acilables por el aminoácido en cuestión, que en la mayoría de los casos es mayor de 1 (Tabla 21).

iii. El peso molecular aproximado del ARN-t. Este puede variar ligeramente, según la fuente de obtención. El valor promedio generalmente empleado, independientemente de la fuente de obtención de la preparación del ARN-t, es de 26000 daltons (60).

Aún no se conoce con certeza el significado de la multiplicidad o heterogeneidad de las especies de ARN-t (60). Es probable que sea la consecuencia de la existencia de múltiples codones para el mismo aminoácido (degeneración del código genético) o se deba a modificaciones en alguna otra región de la molécula del ARN-t distinta a la del anticodón (redundancia) (60).

Establecer la existencia de más de una especie de ARN-t para un aminoácido dado, implica estar seguro de que la multiplicidad que se observa no es un mero artificio. Entre otras cosas, podría ser que una de las especies, que aparentemente es un isoceptor más, en realidad sólo sea un precursor de una especie de ARN-t en fase de maduración.

En este trabajo fueron optimizadas las condiciones de aminoacilación de las preparaciones crudas de ARN-t de hígado de rata con L-leucina- $^{14}\text{C}$  y L-serina- $^{14}\text{C}$ . En las condiciones óptimas de reacción la incorporación de la L-leucina- $^{14}\text{C}$  resultó muy cercana a la máxima teóricamente determinada, y la de la L-serina- $^{14}\text{C}$ , inclusive rebasó dicho valor -

TABLA 21 .

ISOCACETICOS DE DIFERENTES AMINOCIDOS EN VARIOS ORGANIS-  
MOS.

<u>AMINOCIDO</u>	<u>ORGANISMO</u>	<u>NUMERO DE</u> <u>ISOCACETICOS</u>	<u>TECNICA DE</u> <u>FRACCIONAMIENTO</u>	<u>REF.</u>
Alanina	rata	4	fase reversa	71
Arginina	"	4	"	"
Aspartato	"	2	"	"
Glicina	"	2	"	"
Leucina	"	6	"	"
Fenilalanina	"	2	"	"
Lisina	" (hígado)	2	"	114
Valina	"	2	hidroxiapatita	
Leucina	levadura	2	"	
Valina	"	2	distribución a contracorriente	
Alanina	"	1	"	"
Fenilalanina	"	1	"	"
Alanina	E. coli	2	DEAE-Sephadex	
Glutamato	ratón (hígado)	4	fase reversa	119
Histidina	" (cerebro)	2	"	"
Fenilalanina	" (hígado)	2	"	"
Serina	" "	3	"	"
Leucina	" "	5	"	"
Tirosina	" "	3	"	"
Leucina	E. coli	5	técnicas mixtas	113, 115
Leucina	"	5	ED-celulosa	55
Fenilalanina	E. coli	4	MASA	30

(Tabla 6). Ello hace pensar que las condiciones de reacción-empleadas son seguramente las óptimas o se encuentran muy - cercanas a ellas. Las incorporaciones óptimas de L-leucina- $^{14}\text{C}$ , L-serina- $^{14}\text{C}$ , L-valina- $^{14}\text{C}$  y L-lisina- $^{14}\text{C}$  a la preparación cruda de ARN-t aislada por el método C, son comparables a aquéllas obtenidas por Shearn y Horowitz (29) a preparaciones crudas de ARN-t de Neurospora crasa (Tabla 22).

No se conoce la relación que guardan las condiciones óptimas de un sistema de aminoacilación in vitro con las existentes in vivo. Es muy probable que in vivo las condiciones sean óptimas para ciertos aminoácidos y subóptimas para otros, dependiendo de los requerimientos de la síntesis de - proteínas de un organismo dado.

En condiciones óptimas de aminoacilación, se determinó la capacidad de incorporación de L-serina- $^{14}\text{C}$ , L-leucina- $^{14}\text{C}$ , L-valina- $^{14}\text{C}$  y L-lisina- $^{14}\text{C}$ , a preparaciones crudas y desaciladas de ARN-t, aisladas de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro. Las preparaciones - no mostraron diferencias en su capacidad aceptora de ninguno de los aminoácidos, en el rango de concentración de ARN-t estudiado, (Tabla 14 y Figs. 30, 33).

La desacilación de las preparaciones de ARN-t aparentemente no alteró su conformación. La actividad biológica de las preparaciones antes y después de su desesterificación es similar (Tablas 12 y 13).

El hecho de que la capacidad de aminoacilación con L-serina- $^{14}\text{C}$  de las preparaciones de ARN-t de animal normal y de animal estimulado sea prácticamente igual, indica que - la inducción de la ferritina en presencia del hierro no es - acompañada de un incremento neto en el nivel del ARN-t de serina.

Aunando esta observación al hecho de que la actino

TABLA 22 .

COMPARACION DE LA INCORPORACION DE ALGUNOS L-AMINOACIDOS-  
14S A PREPARACIONES PURAS DE ARN-t DE HIGADO DE RATA Y  
DE NEUROSPORA CRASSA.

	<u>HIGADO DE RATA<sup>a</sup></u>	<u>NEUROSPORA CRASSA<sup>b</sup></u>
	pmolas/A <sub>250</sub>	pmolas/A <sub>250</sub>
<u>AMINOACIDO</u>		
L-leucina	97.0	115.0
L-serina	110.9	123.0
L-valina	77.8	115.0
L-lisina	50.8	42.8

- a. Datos obtenidos en este trabajo. ARN-t aislado por el método C; aminoacilaciones realizadas en las condiciones óptimas de incorporación (Materiales y Métodos, pág. 26 ).
- b. Datos obtenidos por Shearn y Horowitz ( 29 ).

micina D no inhibe la estimulación de la síntesis de la ferritina en presencia del hierro (3,8); se puede reafirmar - que la regulación de este sistema no es transcripcional.

Como se indicó en la introducción, es muy factible que la regulación sea a nivel post-transcripcional, específicamente a nivel de la iniciación.

En la posibilidad de que el mecanismo de regulación de la síntesis de la ferritina involucre al ARN-t de serina, se puede plantear la siguiente hipótesis:

Si la síntesis de la ferritina se inicia con el aminoácido modificado N-acetil-serina (trabajo en desarrollo (102) ), debe estar involucrado el N-acetil-seril-ARN-t, como ARN-t iniciador. Un incremento en el nivel de esta especie, podría acelerar la síntesis de la proteína.

Ya se ha demostrado que no hay un aumento apreciable en el ARN-t de serina en las preparaciones aisladas de hígado de rata estimulada con hierro, en relación a su nivel en las preparaciones de hígado de rata normal.

Consecuentemente, un incremento en el N-acetil-seril-ARN-t, sólo puede tenerse a expensas de una de las tres especies restantes de ARN-t de serina (se conocen 4 especies de ARN-t de serina en el hígado de la rata (16) Tabla 23).

Es posible que el hierro promueva la transformación de una especie en otra acetilable, transformándose la primera por la acción de una enzima modificante, quizá una metilasa, cuya actividad se estimule en presencia del metal.

Para descubrir un cambio de esta naturaleza se requiere de una técnica por medio de la cual sea posible purificar y fraccionar al ARN-t de serina. Con tal fin se ha montado una técnica cromatográfica en BD-celulosa. Hasta la fe-

cha sólo se ha logrado purificar y fraccionar el ARN-t de serina del hígado de rata normal. (Tablas 15 y 16; Figs. 34 y-35). La comparación de los perfiles de elución del fraccionamiento de ARN-t de serina de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, podría revelar si existe o no un cambio como el que se propone.

En la purificación y fraccionamiento en BD-celulosa del ARN-t de serina de hígado de rata normal, ciertos parámetros mostraron una influencia decisiva en la técnica cromatográfica.

La purificación inicial del ARN-t de serina se realizó entre 2 y 4°, en ausencia de  $Mg^{+2}$ , empleando un gradiente lineal de NaCl de 0.2M a 1.0M disuelto en un amortiguador de acetato de sodio 0.05M, pH 4.5 (Materiales y Métodos, — pág. 34). En estas condiciones se logra separar la mayoría de las especies de ARN-t, del ARN-t de serina, el cual permanece fijo a la DEAE-celulosa benzoilada. (Fig. 34).

Se intentó fraccionar el ARN-t en las mismas condiciones de temperatura y pH, lo cual resultó poco exitoso — (Fraccionamiento I) (Fig. 34). Se emplearon dos gradientes lineales con  $MgCl_2$ , 10 mM, uno de NaCl 0.2M a 1.0M, seguido de otro mixto de NaCl de 1.0M a 2.0M, y etanol de 0 a 14%, — ambos gradientes disueltos en el amortiguador de acetato de sodio 0.05M. (Materiales y Métodos, pág. 35)

Con el fin de mejorar la resolución del fraccionamiento del ARN-t de serina, fueron modificadas las condiciones cromatográficas en la siguiente forma (55): El fraccionamiento II del material en la primera banda de elución con capacidad aceptora de L-serina- $^{14}C$  (Fig. 34), se realizó a temperatura ambiente. Se empleó un gradiente lineal de NaCl de 0.2M a 1.2M, disuelto en un amortiguador de Tris-HCl 0.01M, — pH 7.5, en presencia de  $MgCl_2$  10 mM. El incremento en la re-

TABLA 23 .

ISOACEPTORES DE SERINA EN DIVERSOS ORGANISMOS.

<u>FUENTE</u>	<u>NUMERO DE ISOACEPTORES MULTISPECIFICIDAD</u>	<u>TECNICA DE FRACCIONAMIENTO</u>	<u>RET.</u>
Hígado de rata	4	BD-celulosa	16
" " "	4	partición, fase reversa	33
Hígado de pollo	4	BD-celulosa	16
Hígado de conejo	4	fase reversa	118
" " "	4	BD-celulosa	16
Cerebro de conejo	4	fase reversa	118
Cerebro de res	6	" "	"
Hígado de res	4	" "	"
Hígado de gallo	4	BD-celulosa	16
Riñón de res	4	fase reversa	118
E. coli	5	BD-celulosa	55
"	4	DEAE-Sephadex, fase reversa	32
Levadura de cerveza	4	BD-celulosa	116
Levadura de pan	3	" "	"
Neurospora crassa	4	MAH	29

solución, empleando estas condiciones cromatográficas, fue notable (Fig.35).

Comparando las condiciones cromatográficas de purificación y fraccionamiento, se aprecia que las variables determinantes en la cromatografía de los ARN-t en BD-celulosa son:

- i. Concentración de  $MgCl_2$ .
- ii. Temperatura.
- iii. pH.

Las estructuras secundaria y terciaria del ARN-t, son de gran importancia en el fraccionamiento de las diferentes especies de ARN-t, en BD-celulosa puesto que son las interacciones no iónicas con dicho material de las que depende la separación selectiva de las especies.

En presencia de  $MgCl_2$  a una concentración de 10 mM, la mayoría de los ARN-t no se adsorben fuertemente a la BD-celulosa. En presencia del  $Mg^{+2}$ , el ARN-t asume una conformación cerrada, quedando expuestas un número muy reducido de bases. En ausencia de  $Mg^{+2}$ , una estructura más abierta permite que un mayor número de bases estén disponibles para la interacción con el material cromatográfico.

El efecto de la temperatura es similar al que ejerce el ión  $Mg^{+2}$ . A temperaturas bajas, la estructura del ARN-t es más cerrada, semejando la situación que prevalece en presencia del  $Mg^{+2}$ .

El efecto del pH en la cromatografía en BD-celulosa sólo ha sido explorado parcialmente. A pH cercanos a la neutralidad hay menos fijación del ARN-t a la BD-celulosa. Gillam, et al. (35) han demostrado que el empleo de pH ácidos de 3,5 ó 4,0, puede ser muy útil en la separación de es-

pecies de ARN-t según su estructura primaria. Supuestamente el grupo amino de los residuos de citosilo y adenosilo, es tarían protonados en este rango de pH, incrementando su interacción con la BD-celulosa. No existe evidencia para pensar que la cromatografía a valores de pH mayores de 7.5 o me nores de 3.5 es aconsejable, menos aún si se toma en cuenta que la posibilidad de degradación del ARN-t en condiciones extremas, es mucho mayor.

Independientemente de si se logra demostrar o no un incremento en el nivel del N-acetil-seril-ARN-t en el hígado de la rata estimulada con hierro en relación a su nivel en el hígado de la rata normal, la purificación y caracterización de esta especie tienen gran importancia.

Evidentemente, el no encontrar un incremento en la concentración del N-acetil-seril-ARN-t en el sistema estimulado, pone en duda su papel en la regulación de la síntesis de la ferritina.

La demostración de la presencia inicial de N-acetil serina en los péptidos nacientes de la ferritina, sería una indicación de que el N-acetil-seril-ARN-t es un ARN-t inicia dor. Se establecería que no es una entidad que transfiere el grupo N-acetil-serina al extremo N-terminal de la ferritina, una vez sintetizada ésta, como ocurre en el caso de la arginilación de la tiroglobulina bovina (103). Aquí la entidad -arginil-ARN-t transfiere la arginina a la posición N-terminal de dicha globulina. La arginil-ARN-t-proteína transferasa es la enzima que cataliza esta reacción.

Existe evidencia que sugiere la participación de ciertos N-acetil-aminoacil-ARN-t en la iniciación de la síntesis de proteínas en organismos superiores (104). Narita et al. (105) suponen la participación del N-acetil-glicil-ARN-t en la iniciación de la síntesis de la ovoalbúmina. Liew et al. (14) han demostrado la presencia de N-acetil-seril-ARN-t

en el hígado de la rata en regeneración y le atribuyen la --  
función del ARN-t iniciador en la síntesis de las histonas -  
f<sup>2a</sup>.

Es pues factible suponer que el papel de los N-ace-  
til-aminoacil-ARN-t en la síntesis de proteínas en organis-  
mos superiores es el de un ARN-t iniciador, a semejanza del-  
N-formil-metionil-ARN-t en la de bacteria (106), cloroplasto  
(107) y mitocondria (108), cuya universalidad en la síntesis  
de proteínas en procariotes está firmemente establecida - -  
(109, 110).

En el citoplasma de los eucariotes, el metionil- -  
ARN-t no bloqueado (111) (especie formilable con la trans--  
formilasa de E. coli (112) ), parece ser un iniciador de la  
síntesis de proteínas. (109).

Aparentemente la participación, en los eucariotes,  
de los N-acetil-aminoacil-ARN-t estudiados hasta la fecha --  
(14, 105), es a nivel de la iniciación de la síntesis de - -  
ciertas proteínas (104).

## V

CONCLUSIONES.

1.- Se estableció un método de aislamiento a gran escala de ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro (método C).

Los rendimientos, equivalentes a un promedio 0.35 mg. de ARN-t por gramo de hígado húmedo, son comparables a los de los autores de la técnica en su comunicación original ( 23 ), así como a los obtenidos a través de otros métodos de aislamiento a gran escala a partir del hígado de diversos animales ( Tabla. 17 ).

Aparentemente, existe un límite en la cantidad máxima de ARN-t de hígado de mamífero aislable por los métodos actuales.

2.- El grado de pureza de las preparaciones de ARN-t aisladas por los métodos A, B y C, se determinó por cromatografía en columna de Sephadex G100 de dimensiones 2.5 x 90 cm. ( Figs. 5-13).

Las preparaciones aisladas por el método C mostraron el grado de pureza máximo, Contienen un 6% de un contaminante único, que se sospecha es ARN-t desnaturalizado (64) o ARN 5S (62,63).

La máxima cantidad de ARN que admite la columna de Sephadex G100 para la buena resolución del análisis cromatográfico, es de 15 mg. disueltos en 2 ml. de la solución amortiguadora ( Figs. 7-9).

3.- Se determinó la capacidad aceptora de L-leucina-<sup>14</sup>C y L-serina-<sup>14</sup>C de las preparaciones crudas de ARN-t-A, B y C, en las condiciones óptimas de reacción. En ambos casos el ARN-t aislado por el método C, mostró la incorporación más alta (Tabla 6).

Se sospecha que las diferencias en la capacidad aceptora de las preparaciones sea la consecuencia de las varias extracciones fenólicas a las que fueron sometidos las preparaciones A y B. Existe evidencia del efecto dañino del fenol sobre el ARN (67).

4.- Se usó la fracción pH 5.0 como fuente del aminoácil-ARN-t sintetetasas en las reacciones de incorporación de los diversos L-aminoácidos-<sup>14</sup>C a las preparaciones crudas de ARN-t.

Las fracciones pH 5.0 más activas son aquellas recuperadas tan pronto se alcanza el pH 5.0 del sobrenadante post-ribosomal, por la adición lenta y con agitación constante del ácido acético IN.

Se impide la inactivación por dilución de las soluciones enzimáticas, concentrándolas por ultrafiltraciones. Esta técnica se caracteriza por ser totalmente inocua, así como por su rapidez.

La fracción pH 5.0 no tiene actividad ribonucleolítica (Fig. 14 ).

Los niveles de ATP y ARN-t endógenos en la preparación enzimática son despreciables.

La fracción pH 5.0 debe almacenarse a  $-20^{\circ}$  en presencia del 2-mercaptoetanol 10mM y de glicerol al 50%, - - condiciones en las que permanece estable por 5 meses.

5.- Se optimizaron las condiciones de aminoacilación de las preparaciones crudas de ARN-t con L-leucina-<sup>14</sup>C y con L-serina-<sup>14</sup>C.

Los parámetros que mostraron una marcada influencia sobre las aminoacilaciones fueron:

i.- Las concentraciones absolutas de  $Mg^{+2}$  y ATP, así como la relación de  $Mg^{+2}/ATP$ . (Figs. 18,19,22).

ii.- La actividad biológica del ARN-t convencional. (Tabla 6).

6.- El grado de optimización de las condiciones de aminoacilación para un aminoácido, puede determinarse - en forma aproximada, conociendo el valor de la incorporación teórica máxima. Este valor depende del número total - de isoaceptores presentes en las células (se conocen aproximadamente 80 especies en la célula de mamífero) del número de isoaceptores del aminoácido en cuestión y del peso molecular aproximado del ARN-t.

La incorporación máxima teórica de un aminoácido a una especie de ARN-t en una preparación cruda de ARN-t - de hígado de rata es de 20 pmolas/ $A_{260}$ . La incorporación - máxima de un aminoácido a una preparación pura de una especie aislada de hígado de rata es de 1615 pmolas/ $A_{260}$ .

En las condiciones óptimas de reacción, la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a las preparaciones de ARN-t aisladas por el método C es muy cercano al valor teórico, y las de L-serina-<sup>14</sup>C, L-valina-<sup>14</sup>C y L-lisina-<sup>14</sup>C inclusive lo rebasan.

Debe hacerse hincapié en que los valores teóricos no son valores absolutos.

7.- El incremento en la concentración del ARN-t por arriba de su valor óptimo, requiere de un incremento proporcional en los demás componentes del sistema, para mantener la eficiencia del mismo. Ello debe tenerse en mente cuando se extrapolan las condiciones óptimas de la reacción de micro-aminoacilaciones a sistemas de incorporación a gran escala.

Es la relación de las picomolas del aminoácido dado incorporadas por A<sub>260</sub>, la que determinará el grado de optimización y la eficiencia de un sistema de aminoacilación.

8.- Empleando las condiciones óptimas de reacción fueron comparadas las incorporaciones de L-leucina-<sup>14</sup>C, L-serina-<sup>14</sup>C, L-valina-<sup>14</sup>C y L-lisina-<sup>14</sup>C a preparaciones crudas y desaciladas de ARN-t de hígado de rata normal y de hígado de rata estimulada con hierro, aisladas por el método C.

No se observaron diferencias considerables en las incorporaciones de ninguno de dichos aminoácidos a las preparaciones de ARN-t (Tabla 14).

9.- Las condiciones de la reacción de desesterificación de las preparaciones de ARN-t no dañan apreciablemente la conformación del ARN-t (Tablas 12, 13).

10.- Empleando la cromatografía en BD-celulosa se logró purificar y fraccionar el ARN-t de serina, obteniendo una fracción con un 72% de pureza (Tabla 16 )

Las condiciones cromatográficas fueron determinantes. La purificación del ARN-t de serina se realizó entre -2 y 4°, en ausencia de  $Mg^{+2}$ , empleando un gradiente de NaCl de 0.2M a 1.0M, disuelto en un amortiguador de acetato de -sodio 0.05 M, pH 4.5.

El fraccionamiento de una fracción del ARN-t de -serina se llevó a cabo a temperatura ambiente, en presencia de  $Mg^{+2}$ , empleando un gradiente de NaCl de 0.2M a 1.2M, di-suelto en un amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 7.6.

11.- Los resultados obtenidos reafirman la hipóte-sis de que la regulación de la síntesis de la ferritina es a nivel post-transcripcional. El nivel del ARN-t de serina en el hígado de la rata normal, es prácticamente igual al ARN-t de serina en el hígado de la rata estimulada con hierro.

En el futuro se intentará dilucidar si hay cambios en los niveles de alguna de las 4 especies de ARN-t de serina en el hígado de la rata estimulada en relación a su nivel en el hígado de la rata normal. Específicamente se buscará un cambio en el nivel del N-acetil-seril-ARN-t.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Drysdale, J.W. Regulation of ferritin synthesis, in Regulatory mechanisms for protein synthesis in mammalian cells, San Pietro, A. et al. (Eds.) 431-455, Academic Press, New York (1968).
- 2.- Crichton, R.R. Ferritin: structure, synthesis and function; New Eng. J. Med. 284 1413-1422 (1971).
- 3.- Munro, H.N. and Drysdale, J.W. Role of iron in the regulation of ferritin metabolism, Fed. Proc. 29 1469-1473 (1970).
- 4.- Chu, L.L.H. and Fineberg, R.A. On the mechanism of iron induced synthesis of apoferritin in Hela cells, J. Biol. Chem. 244 3847-3854 (1969).
- 5.- Fineberg, R.A. and Greenberg, D.M. Ferritin biosynthesis II. Acceleration of synthesis by the administration of iron, J. Biol. Chem. 214 97-106 (1955).
- 6.- Redman, C.M. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver, J. Biol. Chem. 244 4308-4315 (1969).
- 7.- Fineberg, R.A. and Greenberg, D.M. Ferritin biosynthesis III. Apoferritin, the initial product J. Biol. Chem. 214 107-113 (1955).
- 8.- Millar, J.A. et. al. Effect of actinomycin D, cycloheximide, and acute blood loss on ferritin synthesis in rat liver, Biochem. J. 119 643-649 (1970).

- 9.- Vassart, G. et. al. Translational control of protein synthesis: a simulation study. *Biochim. Biophys. Acta* 247 - 471-485 (1971).
- 10.- Chuah, C.C. and Oliver, I.T. A translational control mechanism in mammalian protein synthesis modulated by - - cyclic adenosine monophosphate. Translational control of tyrosine aminotransferase synthesis in neonatal rat liver. *Biochemistry* 11 2547-2553 (1972).
- +11.- Rodríguez, J.M. y Huberman, A. Regulación de la síntesis de ferritina en el hígado normal, en las Memorias del - XXV Aniversario del Instituto Nacional de la Nutrición, Págs. 30, Octubre ( 1971 ).
- +12.- Barahona, E. y Huberman, A. Estructura primaria de la - apoferritina de hígado de rata; extremo amino. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C., - Noviembre 1-4, 1972; Hotel Real de Minas, Guanajuato, - Gto. México.
- +13.- Huberman, et. al. N. acetyl-seryl tRNA and the regulation of apoferritin biosynthesis in rat liver. Simposio Científico Mexicano Israelí, Abril 9-11, 1973, Hotel María Isabel Sheraton, México, D.F. México.
- 14.- Liew, C.C. et. al. N. acetyl-seryl tRNA and polypeptide-chain initiation during histone biosynthesis, *Nature* 226 414-417 (1970).
- +15.- Rodríguez, J.M. et. al. Modificaciones en la población - de ácidos nucleicos de transferencia del hígado de rata - relacionados con la inducción de la síntesis de la apo - ferritina. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de -

Bioquímica, A.C. Noviembre 1-4, 1972; Hotel Real de Minas, Guanajuato, Gto, México.

- 16.- Mäenpää, P.H. Chromatographic stability of codon-specific seryl-tRNA's from avian and mammalian tissues and two cases of specific variation, FEBS Letters 23 171-174 (1972)
- 17.- Mays, L.L. and Borek, E. Transfer ribonucleic acid methyltransferases during hormone-induced synthesis of phosphovitin Biochemistry 10 4612-4616 (1971).
- 18.- Zamecknick, P.C. et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 46 — 811 (1960).
- 19.- Zubay, G.J. Mol. Biol. 4 347 (1960).
- 20.- Monier, R. et. al. The preparation and some properties of a low molecular weight ribonucleic acid from baker's yeast Biochim. Biophys. Acta 43 1-8 (1960).
- 21.- Holley, R.W. Large-scale preparation of yeast soluble ribonucleic acid, Biochem. Biophys. Res. Commun. 10 186-188 - (1963).
- 22.- Delihias, N. and Staeheyin, M. The preparation of liver soluble rebonucleic acid, Biochim; Biophys. Acta 119 385-391- (1966).
- 23.- Rogg, N. et. al. Isolation of mammalian transfer RNA, Biochim. Biophys. Acta 195 13-15 (1969).
- 24.- Robison, B. and Zimmerman, T.P. A modified procedure for — large scale preparation of beef liver t-RNA. Anal. Biochem. 37 11-20 (1970).
- 25.- Igarashi, S.J. and Dufresne, M.J. Large scale preparation —

- of rabbit liver t-RNA, *Anal. Biochem.* 47 102-108 (1972)
- 26.- Staehelin, M. et. al. *Nature* 219 1363 (1968).
- 27.- Holley, R.W. et. al. Countercurrent distribution of rat liver "soluble" fraction ribonucleic acids, *PN Biochim. - Biophys. Acta* 35 272-273 (1959).
- 28.- Sueoka, N. and Yamane, T. Fractionation of aminacyl acceptor RNA on a methylated albumin column, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48 1454-1461 (1962).
- 29.- Shearn, A. and Horowitz, N.H. A study of transfer ribonucleic acid in *Neurospora*. I. The attachment of amino acids and amino acid analogs, *Biochemistry* 8 295-303 (1969).
- 30.- Stern R. et. al. Fractionation of transfer ribonucleic acid on methylated albumin-silicic acid column. II. Changes in elution profiles following modification of transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* 8 313-322 (1969).
- 31.- Wehrli, W. and Staehelin, M. Fractionation of nonpolar transfer ribonucleic acids from rat liver, yeast and *Escherichia coli* by partition chromatography, *Biochemistry* 10 1878-1885 (1971).
- 32.- Ishikura, H. and Nishimura, S. Fractionation of serine transfer ribonucleic acids from *Escherichia coli* and their coding properties, *Biochim Biophys. Acta* 155 72-81 (1968).
- 33.- Müller, P. et al. Isolation and characterization of serine transfer ribonucleic acids from rat liver, *Biochemistry* 10 1885-1890 (1971).
- 34.- Kilmers, A.D. et al. Separation of transferribonucleic acids

by reverse phase chromatography *J. Biol. Chem.* 240 -- 3979-3983 (1965).

- 35.- Gillam, I. et al. The separation of soluble ribonucleic acids on benzoylated diethylaminoethylcellulose, *Biochemistry* 6 3043-3056 (1967).
- 36.- Hoagland, M. B. and Askonas, B. A. Aspects of control of protein synthesis in normal and regenerating rat liver, I. A cytoplasmic RNA containing fraction that stimulates aminoacyl incorporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49 130 (1963).
- 37.- Strehler, B. L. et al. Evidence on a codon restriction hypothesis of cellular differentiation: multiplicity of mammalian leucyl-sRNA-specific and tissue specific deficiency in an alanyl-sRNA-synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57 1754- (1967).
- 38.- McNair, P. H. and Bernfield, M. R. Quantitative variation in serine transfer ribonucleic acid during estrogen induce phosphoprotein synthesis in rooster liver, *Biochemistry* 8 4926-4935 (1969).
- 40.- Rittler, F. et al. Two fractionation methods for transfer RNAs, *Biochim. Biophys. Acta* 277 513-522 (1972).
- 41.- Geels, J. et al. Insolation from rat liver of all aminoacyl-tRNA-synthetases by centrifugation, *Arch. Biochem. Biophys.* 144 773-774 (1971).
- 42.- Bartkowiak, S. and Pawekiewics, J. The purification of aminoacyl-tRNA-synthetases by affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 272 137-140 (1972).
- 43.- Ritter, P. O. and Busch, H. The chromatographic comparison of cytoplasmic, nuclear and nucleolar valine and leucine-

- tRNAs from Novikoff hepatoma cells and cytoplasmic tRNAs - from rat liver cells, *Physiol. Chem. and Physics* 3 411-425 (1971).
- 44.- Yegian, C.D. and Stent, G.S. Differential aminoacylation - of three species of isoleucine transfer RNA from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 39 69-71 (1969).
- 45.- Loftfield, R.B. The aminoacylation of transfer ribonucleic acid, in *Protein synthesis*, McConkey, E.H. (Ed.) 1 1-88, - Marcel Dekker, Inc. New York (1971).
- 46.- Comunicación personal del Dr. Michel Revel,
- 47.- Sein, K.T. A simple modified method for the extraction of rat liver sRNA, *Anal Biochem.* 28 65-69 (1969).
- 48.- Brunngraber, E.P. A simple procedure for the preparation - of "soluble" RNA rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 8 1-3 (1962).
- 49.- Vázquez Valdés, M.D. (Tesis Recepcional) Papel de -ácido -ribonucleico de transferencia en la regulación de la biosíntesis de proteínas. Universidad Iberoamericana. (1971).
- 50.- Delihias, N. and Stachelin, M. The preparation of rat liver-soluble ribonucleic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 119 385- - 391 (1966).
- 51.- Fink, L.M. et al. Comparative studies en mammalian and yeast phenylalanine transfer ribonucleic acids, *Biochemistry* 10 - 1873-1878 (1971).
- 52.- Fraenkel-Conrat, H. Preparation and testing of tobacco mosaic virus-RNA, in *Proc. Natl. A. Res. Cantoni, G. L. and Davies D.R.* (Eds). 1 480-487, Harper and Row Publishers, New York - (1966).

- 53.- Gillan, I.C. and Tener, G.M. The use of ED-cellulose in separatin transfer RNAs in Methods in Enzymology- Moldave, K, and Grossman, L. ( Eds.) 20 part C 55-70- Academic Press, New York (1971).
- 54.- Roy, K.L. et al. tRNA separations using benzoylated DEAE-cellulose, in Proc. Nucl. A. Res. Cantoni, G.L. and Davies, D.R. ( Eds.) 2 524-541, Harper and Row, Publishers, New York (1971).
- 55.- Roy, K.L. and Söll, D. Purification of five transfer ribonucleic acid species from Escherichia coli and - their acylation by homologous and heterologous seryl transfer ribonucleic acid synthetases, J. Biol. Chem. 245 1349-1400 (1970).
- 56.- Reiland, J. Gel. Filtration, in Methods in Enzymology Jakoby, W.B. ( Ed) 22 287-321, Academic Press, New York (1971).
- 57.- Zamecnik, P.C. and Serin, P.S. On the stability of aminoacyl sRNA to nucleophilic agents, Biochim. Biophys. Acta 91 93031, 653-655 (1964).
- 58.- Campbell, P.N. and Sargent, J.R. ( Eds.) Estimation of total protein by the method of Lowry et al. (1951) — in Techniques in protein biosynthesis 1 299-300, Academic Press, London (1967).
- 59.- Campbell, P.N. and Sargent, J.R. ( Eds) Estimation of RNA by the orcinol method of Mejbaum (1939), in Techniques in protein biosynthesis 1 301-302, Academic Press, London (1967).
- 60.- Sirlin J.L. Biology of RNA, Academic Press, New York.- (1972)<sup>o</sup>
- 61.- Burton, K. Determination of DNA concentration with di-

- phenylamine, in *Methods in Enzymology*, Grossman, L. and Moldave, K. (Eds.) 12 Part B, 163-166, Academic Press, New York (1968).
- 62.- Larsen, G.J. et al. Fractionnement par électrophorèse - sur gel de polyacrylamide des RNA de faible poids moléculaire présents dans les noyaux de cellules KB, C.R. - Acad. Sc. Paris, t 267 110-113 Serie D (1968).
- 63.- Kirtikar, D.M.W. and Kaji, A. Stimulation of phage ribonucleic acid-dependent incorporation of aminoacids by 5S robonucleic acid, *J. Biol. Chem.* 243 5345-5353 - - (1968).
- 64.- Adams, A. et al. Conformational differences between the biologically active and inactive forms of a transfer - ribonucleic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57 1684 1691 (1967).
- 65.- Loehr, J.S. and Keller, E.B. Dimers of alanine transfer RNA with acceptor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 61 1115-1122 (1968).
- 66.- Schleich, T. and Goldstein, J. Gel filtration properties of the CCD-prepared E. coli B. sRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52 744-749 (1964).
- 67.- Kirby, K.S. Isolation of nucleic acids with phenolic solvents, in *Methods in Enzymology* Grossman, L and Moldave, K. (Eds.) 12 Part. B, Academic Press, New York (1968)
- 68.- Levine, L. et al. The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for deoxyribonucleic acid, *Biochemistry* 2 168-175 (1963)
- 69.- Noll, H. and Stutz, E. The use of sodium and lithium podesyl sulfate in nucleic acid isolation, in *Methods in Enzy*

- mology, Grossman, L. and Moldave, K. ( Eds.) 12 Part B, 129-155, Academic Press, New York ( 1968).
- 70.- Beck, J.P. et al. Essais de mise en evidence d'une --  
régulation hormonale au niveau des RNA de transfert --  
II. Etude comparative des RNA de transfert de foie de  
rats normaux et hypophysectomisés, Biochim, Biophys, --  
Acta 213 68-76 ( 1970.)
- 71.- Yang, W.K. and Novelli, G.D. Analysis of isoaccepting-  
tRNA's in mammalian tissues and cells, in Methods in -  
Enzymology, Moldave, K. and Grossman, L. ( Eds.) 12 --  
Part. C, 44-55, Academic Press, New York ( 1971).
- 72.- Roy, K.L. and Söll, D. Fraccionation of Escherichia --  
coli transfer RNA on benzoylated DEAE-cellulose, S.C. -  
Biochim. Biophys. Acta 161. 572-574 ( 1968).
- 73.- Nishimura, S. Minor components in transfer RNA: their  
characterization, location and function, in Prog. Nucl.  
A. Res. Mol. Biol. Davidson, J.N. and Cohn, W.E. 12 -  
50-85, Academic Press, New York ( 1972).
- 74.- Mehler, A.H. and Chakraburty, K. Some questions about -  
the structure and activity of aminoacyl-tRNA-synthetases  
in Advances in Enzymology, Meister, A. ( Ed.) 35 443-  
504, Interscience Publishers, New York ( 1971).
- 75.- Scherrer, K. and Darnell, J.E. Sedimentation characteris-  
tics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. Biochem. --  
Biophys. Res. Commun. 7 486-490 ( 1962).
- 76.- Kishan Raj, N.B. and Narasinga Rao, M.S. Metal ion-nucleic  
acid interactions. I. A method for the fractionation of rat  
liver ribonucleic acids into transfer ribonucleic acid and  
ribosomal ribonucleic acids using  $Zn^{+2}$  as a precipitant, --  
Biochemistry 8 1277-1284 ( 1969).

- 77.- Davis, A.R. and Nierlich, D.P. Preparation of transferribonucleic acid with silicic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 150 126-129 ( 1972).
- 78.- Littauer, L.Z. and Daniel, V. tRNA<sup>p</sup>...pCpCpA pyrophosphorylase of rat liver (ATP-(GTP): RNA nucleotidyl - - transferase), in *Proc. Nucl. A. Res.* Cantoni, G.L. and Davies, D.R. ( Eds.) I 353-361, Harper and Row, Publishers, New York ( 1966).
- 79.- Brownhill, I.T. et al. The inactivation of ribonuclease during the isolation of ribonucleic acids and ribonucleoproteins from yeast, *Biochem. J.* 73 434-438 ( 1959).
- 80.- Barlow, J. and Mathias, A.P. The isolation of ribosomal RNA from mammals, in *Proc. Nucl. A. Res.* Cantoni G.L. — and Davies, D.R. ( Eds.) 1 444-454, Harper and Row, Publishers, New York ( 1966).
- 81.- Boedtker, H. Molecular weight and conformation Grossman - L. and Moldave, K. ( Eds.) 12 Part B. 429-458, Academic - Press, New York ( 1968).
- 82.- Schweet, R.S. Aminoacid activating enzymes from guinea — pig liver, in *Methods in Enzymology* 5 726-731, Academic-Press, New York ( 1962).
- 83.- Studies on the synthesis of serum albumin by ribonucleoprotein particles isolated from rat liver, *Biochem. J.* 82 448- ( 1962).
- 84.- Blatt, W.F. Ultrafiltration for enzyme concentration, in - *Methods in Enzymology* Jakoby, W.B. ( Eds.) 22 39-49, — Academic Press, New York ( 1971).
- 85.- Muench, K.H. and Berg, P. Preparation of aminoacyl-ribonucleic synthetases from *E. Coli*, in *Proc. Nucl. A. Res.* 1 375

383, Harper and Row, Publishers, New York (1966)

- 86.- Jacobson, K.B. Reaction of aminoacyl-tRNA synthetases with heterologous tRNA, in Prog. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. Davidson, J.N. and Cohn, W.E. (Eds.) 11, 461-488., Academic Press, New York (1971)
- 87.- Loftfield, R.B. and Eigner, E.A. Mechanism of action of amino acid transfer ribonucleic acid ligases, J. Biol. Chem. 244 1746-1754 (1969)
- 88.- Lindahl, T. et al. Renaturation of transfer ribonucleic through site binding of magnesium, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55 941-948 (1966)
- 89.- Ishida, T. and Sueoka, N. Elimination of magnesium ions as an absolute requirement for the native conformation of tryptophan transfer ribonucleic acid, J. Mol. Biol. 37 313-316 (1968)
- 90.- Novelli, G.D. Amino acid activation for protein synthesis, in the Ann. Rev. Biochem; Boyer, P.D. (Ed.) 36 - Part 2 449-484, Annual Reviews, Inc., California(1967).
- 91.- Loftfield, R.B. and Eigner, E.A. Ionic effects in the aminoacylation of valine transfer ribonucleic acid, J. Biol Chem. 242. 5355-5359 (1967)
- 92.- Allende, C.C. et al. The aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetases. II. Properties of an adenosine triphosphate - threonyl transfer ribonucleic acid-synthetase complex. J. Biol. Chem. 245 93-101 (1970)
- 93.- Bluestein, H.G. et al. Seryl transfer RNA synthetase from baker's yeast, J. Biol. Chem. 243 4693-4699 (1968).

- 94.- Allende, J.E. et al. The role of metalions in the formation of threonyl-soluble ribonucleic acid from threonyl-adenylate-enzyme complex, P.C. J. Biol. Chem. 240 3229 - 3232 ( 1965 )
- 95.- Zimmerman, T.P. and Robison, B. Effect of assay conditions on the magnesium requirement of the transfer reaction catalyzed by phenylalanyl-tRNA synthetase from baker's yeast - Biochem. Biophys. Res. Commun. 47 1138-1143 ( 1972 )
- 96.- Norris, A.T. and Berg, F. Mechanism of aminoacyl RNA synthesis studies with isolated aminoacyl adenylate complexes of isoleucyl-tRNA synthetase Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52 - 330-337 ( 1964 )
- 97.- Hele, P. and Barber, R. Lysyl-tRNA synthetase of Escherichia Coli B: formation and reactions of ATP enzyme and lysyl-AMP-enzyme complexes. Biochim. Biophys. Acta 258 319-331 (1972)
- 98.- Pastuszyn, A. and Loftfield, R.B. Non-participation of aminoacyl adenylates in the spermine catalyzed aminoacylation of - transfer-RNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47 775-783 - - ( 1972 )
- 99.- Cole, F.X. and Schimmel, P.R. Isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase. The role of magnesium in amino acid activation. Biochemistry 9 3143-3148 ( 1970 )
- 100.- Mehler, A.H. Factors influencing activity of amino acyl-tRNA - synthetases, in Methods in Enzymology, Moldave, K. and Gross - man, L. ( Eds. ) 22 Part C, 203-210, Academic Press, New York - ( 1971 )
- 101.- Ritter, P.O. et al. Aminoacylation of Escherichia coli valine-transfer ribonucleic acid by Neurospora crassa phenylalanyl - transfer ribonucleic acid synthetase in tris (hidroxymethyl - aminomethane hydrochloric acid and potassium cacodylate buffers J. Biol. Chem. 245 2114-2120 ( 1970 )

- + 102.- Naquid, J.M. y Huberman, A. Análisis secuencial de los péptidos nacientes de ferritina de hígado de - rata, Depto. de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición.
- 103.- Soffer, R.L. Enzymatic modification of proteins. IV. Arginylation of bovine thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 246- 1481-1484 ( 1971)
- 104.- Narita, K. The N-terminal acetyl group of proteins - and its possible implications for protein biosynthesis, in *Proteins, structure and function*, Funatsu, M. et al. ( Eds) 2 227-259 Kodansha, Ltd. Tokyo (1972) -
- 105.- Narita, K. et al. Formation of acetyl-glycyl-puromycin by the incubation of hen's oviduct minces with - puromycin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 327-332- (1969)
- 106.- Adams, J.M. and Capecchi, M.R. N-formyl-methionyl-s - RNA as the initiator of protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55 147-155 ( 1966)
- 107 - Boulter, D. et al. Biochemistry of protein synthesis - in plants, in *Biol. Rev.* 47 113-175 ( 1972)
- 108.- Smith, A.E. and Marcker, K.A. N-formyl-methionyl trans - fers RNA in mitochondria from yeast and rat liver, *J. Mol. Biol.* 38, 241-243 (1968)
- 109 - Lucas-Lenard, J. and Lipmann, F. Protein biosynthesis in the *Ann Rev. Biochem. Snell. E.E.* ( Ed.) 40 409- - 448, Annual Reviews, Inc. California (1971)
- 110.- Brestscher, M.S. Initiation and termination of polypeptide chain, in *Protein synthesis*, McConkey, E.H. (Ed.) 1 89-120, Marcel Dekker, Inc., New York ( 1971)

- 111.- Smith, A.E. and Marcker, K.A. Cytoplasmic methionine - transfer RNAs from eukaryotes, Nature 226 607-610 - - (1971)
- 112.- Raj Bhandary, U.L. and Ghosh, N.P. Studies on polynucleotides. XCI. Yeast methionine transfer ribonucleic acid; purification, properties and terminal nucleotide sequences, J. Biol. Chem. 244 1104-1113 (1969)
- 113.- Muench, K.H. and Berg, P. Fractionation of transfer ribonucleic acid by gradient partition chromatography on Sephadex columns, Biochemistry 15 970-981 (1966)
- 114.- Liu, L.P. and Ortwerth, B.J. Specificity of rat liver lysine transfer ribonucleic acid for codon recognition, Biochemistry 11 12-17 (1972)
- 115.- Holladay, D.W. et al. A general method for the separation - of isoaccepting transfer ribonucleic acids; purification - of five transfer ribonucleic acids from *Escherichia coli* - Biochem. Biophys. Acta 240 541-553 (1971).
- 116.- Kruppa, J. and Zachau, H.G. Multiplicity of serine specific transfer RNAs of brewer's and baker's yeast, Biochem. Biophys. Acta 277 499-512 (1972)
- 117.- Doctor, B.P. et al. Fractionation of yeast amino acid-acceptor ribonucleic acids by countercurrent distribution J. Biol. Chem. 236 1117-1120 (1961)
- 118.- Hatfield, D. and Portugal, F.H. Seryl-tRNA in mammalian tissues: chromatographic differences in brain and liver and a specific response to the codon UGA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67 1200-1206 (1970)

- 119.- Frazer, J.M. and Yang, W.K. Isoaccepting transfer ribo-  
nucleic acids in liver and brain of young and old BC-  
3 F, mice, Arch. Biochem. Biophys. 153 610-618 (1972)

\* Trabajo realizado gracias a un donativo otorgado por MEAD  
JOHNSON, S.A. de C.V. al Depto. de Bioquímica del Institu-  
to Nacional de la Nutrición.