

20562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

2

1 ej.

14



REGULACION TRADUCCIONAL DE LA SINTE-
SIS DE PROTEINAS POR EL FACTOR DE ELON-
GACION 1 EN CEREBRO DE ROEDORES

EJEMPLAR UNICO

TESIS CON
FALLA DE ORICTM

ROCIO VARGAS SANDERS

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

BIOQUIMICA

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A MIS PADRES

Mi sincero agradecimiento
al Dr. Mario Castañeda M.
bajo cuya dirección se
realizó este trabajo.

Agradezco a todas aquellas
personal que de alguna ma-
nera colaboraron en el de-
sarrollo del mismo-

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología del Desarrollo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INTRODUCCION

Se han hecho una serie de estudios dirigidos al entendimiento de mecanismos regulatorios durante la diferenciación y crecimiento cerebral, y se ha observado que en el desarrollo posnatal de mamíferos hay una serie de cambios histológicos significativos que incluyen división y movimiento celular de neuronas y células gliales así como eventos bioquímicos (Waelsch y Lajtha, 1961).

Uno de los cambios bioquímicos que se llevan a cabo durante el desarrollo posnatal de la corteza cerebral, cerebelo y demás áreas basales, es la disminución en la velocidad de síntesis de proteínas totales pudiéndose medir ésta en varios niveles de complejidad: in vivo, en rebanadas de tejido, en suspensiones celulares y en sistemas libres de células (para revisión, véase a Johnson, 1976). Otro de los cambios observados en macromoléculas es la disminución de la síntesis de RNA (Adams, 1966, Johnson, 1967; Barra et al., 1972; Gilbert, 1978). Aunque actualmente la evidencia indica que la disminución de la síntesis de proteínas es principalmente el resultado de cambios en los mecanismos intracelulares, la naturaleza de dichas modificaciones no ha sido resuelta.

En estudios dirigidos a determinar el o los factores involucrados en la disminución de síntesis proteica cerebral, se ha

lucrados en la disminución de síntesis proteica cerebral, se ha probado si los diferentes componentes del sistema de síntesis - de proteínas in vitro esten involucrados en la disminución. Se ha demostrado que la actividad general de las fracciones pH 5.0 que contienen principalmente tRNA y aminoacil-tRNA sintetasas - no se modifica (Murthy y Rappoport, 1965; Johnson y Beltyschko, 1969; Gilbert, 1978); con excepción de variaciones en algunos - RNAs de transferencia (tRNA) (Barra et al., 1972). La disminu- ción en la síntesis de proteínas es también independiente del - RNA mensajero (mRNA) presente en la célula (Johnson y Beltysch- ko, 1969) ya que este decremento persite en un sistema de incor- poración de aminoácidos cuando se utilizan como mensajero sinté- tico ácido poliuridílico (Poli-U), así también si se agrega ami- noacil-tRNA (aa-tRNA) exógeno. Estos estudios sugieren la exist- encia de un proceso de regulación de la síntesis de proteínas a nivel de la traducción en un punto diferente a los ya proba- dos.

En consecuencia, la atención se ha enfocado sobre la ac- tividad de ribosomas y de otros factores enzimáticos de la ma- quinaría ribosomal de síntesis de proteínas. Aunque existen al- gunos datos sobre el proceso de iniciación en cerebro (Gilbert, 1974; Dwyer y Wasterlain, 1980), el papel de los factores de - iniciación en este cambio dependiente de la edad no ha sido es-

En general cuando se observan los datos acumulados en ratón y rata estos son semejantes, pero la velocidad de disminución de la actividad de síntesis proteica cerebral difiere en dos puntos: (i) en el ratón, el cambio aparece desde el periodo prenatal y continúa (excepto por una pequeña meseta intermedia que se presenta antes del nacimiento), siguiendo una aparente curva exponencial que comienza a estabilizarse hacia el final del 15 día posnatal (Lerner y Johnson, 1970; Gilbert y Johnson, 1974); y (ii) en la rata posnatal empieza a alcanzar el nivel del adulto cerca del día 40 después de nacido (Yamagami et al., 1966).

Este fenómeno de la disminución de la velocidad de síntesis de proteínas no parece deberse a la modulación traduccional de alguna proteína en particular, o de un grupo reducido de proteínas, pero sí al total de la síntesis de proteínas. Por tanto, decidí estudiar las actividades de factores inespecíficos a los diferentes mRNAs. Los factores de elongación de eucariotes 1 y 2 (eEF-1 y eEF-2) no distinguen entre los mRNAs, no reconocen el aa-tRNA iniciador, y se les encuentra unidos a los ribosomas y principalmente en la fracción sobrenadante a pH 5. Tales características sugieren una posible intervención de estos factores en la disminución de síntesis de proteínas --

5

tudiado y el campo permanece abierto. En los experimentos efectuados con ribosomas de cerebro de ratón joven y adulto purificados con desoxicolato, Tritón X-100 ó 1.0M K^+ , a los que se agregaron poli-U y fracciones pH 5 homólogas para incorporar fenilalanina, las actividades de los ribosomas de ambas edades fueron muy semejantes (Gilbert, 1978 y 1980). La actividad de la unión de poli-U a ribosomas de cerebro de ratón joven y adulto, realizada como en el experimento anteriormente mencionado, a 10 mM Mg^{2+} , también fue muy similar (Lerner y Johnson, 1971).

La respuesta que dieron los ribosomas de cerebro de ratón joven y adulto a factores posmitocondriales de cerebro de ratón joven (Chou et al., 1971), medida como la estimulación de la unión de fenilalanil-tRNA (phe-tRNA), no demostró una diferencia significativa entre ambos tipos de ribosomas. Además, no se han encontrado divergencias en las propiedades físico-químicas de ribosomas aislados del tejido cerebral de ratones recién nacidos y adultos (Johnson, 1973). Estos hechos parecen indicar que los ribosomas de cerebro de ratón joven y adulto son equivalentes con respecto a su velocidad de síntesis de proteínas. No obstante, cada vez que se usa la fracción sobrenadante posmitocondrial homóloga se observa el decremento dependiente de la edad antes mencionada (Lerner y Johnson, 1970); Gilbert y Johnson, 1974; Gilbert, 1978 y 1980).

que dependen de la edad objetivo del presente.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran los experimentos realizados durante el desarrollo posnatal de cerebro de ratón y rata, sobre la actividad de eEF-1, que a través de la formación del complejo ternario aa-tRNA. eEF1·GTP, cataliza la reacción de la unión del aa-tRNA al sitio aceptor del complejo ribosomal (Weissbach et al., 1973).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y METODOS

Material

GTP [^3H] (10 Ci/mmola) y Fenilalanil-tRNA (393 Ci/mol) fueron adquiridos de New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts. Piruvato cinasa (EC. 2.7.1.40), fosfoenolpiruvato, ácido polilúridílico, N-etilmalúrida, puromicina, GTP y ATP, se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri. Las Sepharosa 4-B y Sephadex G-200, de Pharmacia Fine Chemicals, México.

Metodos:

Preparación del Factor de Elongación 1 de Cerebro.

El factor de elongación 1 de cerebro (bEF-1) fue aislado del cerebro de ratones albinos Swiss y de ratas Wistar de diferentes edades. Para cada edad se utilizaron entre 50 y 100 animales; éstos fueron decapitados y sus cerebros se colocaron a 4°C en una solución amortiguadora formada de: Tris-HCl 0.05M (pH 7.4); KCl 50mM acetato de magnesio, 3mM y sacarosa 1% (P/u). Los tejidos de diferentes edades fueron procesados en paralelo para experimentos comparativos. Los cerebros fueron homogenizados en un tubo tipo Potter-Elvehjem y centrifugados a 15,000 x g por 45 min

a 4°C. El sobrenadante posmitocondrial (S_1) fue centrifugado a 100,000 x g por 120 min a 4°C. Después de ajustar a pH 6.5 con ácido acético 1M, las 3/4 partes superiores del sobrenadante (S_2) fueron fraccionadas con sulfato de amonio entre 40 y 70%. La fracción obtenida se filtró por una columna (1.5 x 30 cm) de Sephadex G-200 y 4-B como describen McKeehan y Hardesty (1969). La columna fue eluída con una velocidad de 0.8 ml/min colectando fracciones de 1.5 ml las cuales fueron ensayadas para determinación de proteínas (Lowry et al., 1951) y actividad de bEF-1, como se describe en el siguiente párrafo. Duplicados de las mismas columnas fueron utilizadas para experimentos comparativos. Las fracciones de sulfato de amonio y los picos de actividad de la columna, previo tratamiento con N-etilmaleimida 0.010M, para inactivar el factor de elongación 2 (bEF-2) (McKeehan y Hardesty, 1969; Gilbert y Johnson, 1972), fueron utilizados como fuentes de bEF-1.

Ensayo Enzimático del Enlace de AA-tRNA.

La actividad de bEF-1 fue medida por medio de dos métodos: la formación del complejo ternario aa-tRNA-eEF-1-GTP, y la unión del aa-tRNA a ribosomas. Las actividades específicas relativas obtenidas por ambos ensayos fueron comparables, y los resultados se expresan en cualesquiera de las dos formas.

A) La formación del complejo ternario consta de dos pasos: la formación del complejo eEF-1·GTP, seguido por el ensamble del complejo aa-tRNA·eEF-1·GTP. Este último complejo, a diferencia del primero, no es retenido en el filtro de nitrocelulosa (Moon y Weissbach, 1972). Las mezclas de reacción, con un volumen final de 0.2 ml y conteniendo Tris-HCl 50mM (pH 7.4); NH_4Cl , 50mM, acetato de magnesio 10mM, fosfoenol-pirúvico 3mM; piruvato cinasa 10 ug; GTP- ^3H (0.5 uc) 0.003mM y cantidades variables de la preparación de bEF-1, fueron incubados por 5 min a 37°C. La reacción fué detenida con la adición de 3 ml de una solución amortiguadora de lavado conteniendo Tris-HCl 10mM (pH 7.4); NH_4Cl 10mM y acetato de magnesio 10mM; la mezcla fue filtrada a través de un filtro de nitrocelulosa (25 mm de diámetro y 0.45 u del tamaño del poro; Millipore, Bedford, Massachusetts). La radioactividad del filtro, indica la cantidad de GTP- ^3H que se ha unido a bEF-1 y a otras proteínas fue contada en un aparato de centelleo líquido (Marck II, Nuclear Chicago) con una eficiencia de 40%. Para medir la formación del complejo ternario, se preparó una segunda mezcla de reacción como la anteriormente descrita. Después de la incubación a 37°C, los tubos fueron colocados en hielo y se agregaron 150 pmolas de aa-tRNA y se incubaron durante 2 min a 0°C. La mezcla de reacción fue lavada, y filtrada y los filtros fueron contados como se describió arriba. La radioactividad retenida en el segundo -

filtro es restada de la primera; la diferencia, después de una corrección del control al tiempo cero, representa la cantidad de GTP- ^3H unido al complejo ternario. La actividad específica ha sido expresada en cpm/mg de proteína.

B) Unión del aa-tRNA a Ribosoma. La estimulación de la unión del aa-tRNA a ribosomas por bEF-1 fue estimada mediante el proceso descrito por Weissbach et al, (1973). Las mezclas de reacción, en un volumen final de 0.05 ml conteniendo Tris-HCl 10mM (pH 7.4); NH_4Cl 60mM, acetato de magnesio 5mM; GTP 0.2mM; 0.05 ug poli-U, 15 pmolas de phe-tRNA- ^{14}C , ribosomas 1.0 unidad A260 y cantidades variables de las preparaciones de bEF-1, fueron incubados a 37°C durante 1 min. La reacción fue detenida por la adición de 2 ml de la solución amortiguadora de lavado. La radiactividad fue contada con una eficacia de 96%. La actividad específica es expresada en pmolas de phe-tRNA- ^{14}C unidos a ribosomas/mg proteína.

Ensayo de Polimerización.

La síntesis polipeptídica fue medida por la incorporación del aminoácido del aa-tRNA, como material insoluble en ácido tricloroacético (TCA) caliente, utilizando la fracción sobrenadante de pH 5 preparada (como se describe en el siguiente párrafo) co-

mo fuente de bEF-1 y bEF-2. Las mezclas de reacción, con un volumen total de 0.1 ml y conteniendo Tris-HCl 50mM (pH 7.4), -NH₄Cl 80mM; acetato de magnesio 5mM; GTP 0.2mM; fosfoenol pirúvico 10mM; piruvato cinasa 15 ug; poli-U 100 ug; phe-tRNA (¹⁴C) 200 pmolas; ribosomas 1.0 unidad A₂₆₀ y cantidades variables de la fracción sobrenadante pH 5, fueron incubadas a 37°C durante 30 min. La reacción fue detenida agregando 0.2 ml de TCA 10% (P/v) frío. Después de 30 min a 0°C, se agregan 3 ml de TCA 5% y los tubos se incubaron a 90°C durante 15 min. Después de enfriarse las soluciones fueron filtradas como se mencionó antes, utilizando TCA al 5% como solución de lavado. Se hicieron las correcciones con los controles y las actividades fueron expresadas como picomolas de phe-tRNA incorporados a péptidos.

Fracción Sobrenadante pH 5.0.

El sobrenadante S₂, obtenido como previamente se describió, fue ajustado a pH 5.2 con ácido acético 1N. La suspensión fue centrifugada a 20,000 x g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se llevó a pH 7.4 con KOH 0.3M. Se agregó glicerol a una concentración final de 20% (V/V) y la fracción pH 5 fue guardada a -70°C.

Preparación de Ribosomas.

Los ribosomas de cerebro fueron purificados por centrifugación diferencial y tratamiento con desoxicalato de sodio - 0.5% (p/v), sacarosa 1.9M, puromicina y KCl 0.5M como describe Weissbach et al. (1973). Las preparaciones ribosomales mostraron muy pequeña actividad en la unión de phe-tRNA y la polimerización de fenilalanina, en ausencia de poli-U o de los factores de elongación. Después de la purificación, los ribosomas jóvenes y viejos mostraron actividades semejantes en los ensayos de unión y polimerización. En todos los experimentos abajo descritos, se utilizaron ribosomas de animales adultos.

Preparación de AA-tRNA.

El tRNA de hígado de rata fue preparado y aminoacilado con una mezcla de aminoácidos, utilizando un aminoácido marcado como guía, siguiendo el proceso descrito por Moldave (1963).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

La actividad de bEF-1 fue medida en el sobrenadante crudo S_2 , en la fracción de sulfato de amonio y en las fracciones de la columna de Sephadex G-200-Sepharosa 4B. Los valores obtenidos con el uso de S_2 variaron considerablemente, pero los obtenidos con las dos últimas fracciones mostraron buena reproducibilidad. Los resultados obtenidos con la fracción de sulfato de amonio mostraron que la actividad específica de bEF-1 disminuye con respecto a la edad en ambos sistemas, ratón y rata (Fig. 1). Resultados similares se encontraron cuando la actividad fue expresada por gramo de tejido húmedo o por cerebro. La actividad decayó de manera exponencial, llegando al valor de la asíntota alrededor de los 20 y 60 días de nacimiento en ratón y rata, respectivamente. El modelo de exponencial de primer orden se ajustó bien a los datos. El último valor de cada grupo fue excluido para poder obtener el mejor ajuste por medio de mínimos cuadrados (Fig. 1, inserto). La vida media de la actividad fue también calculada y se obtuvieron valores de 6.6 y 30 días en ratón y rata, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

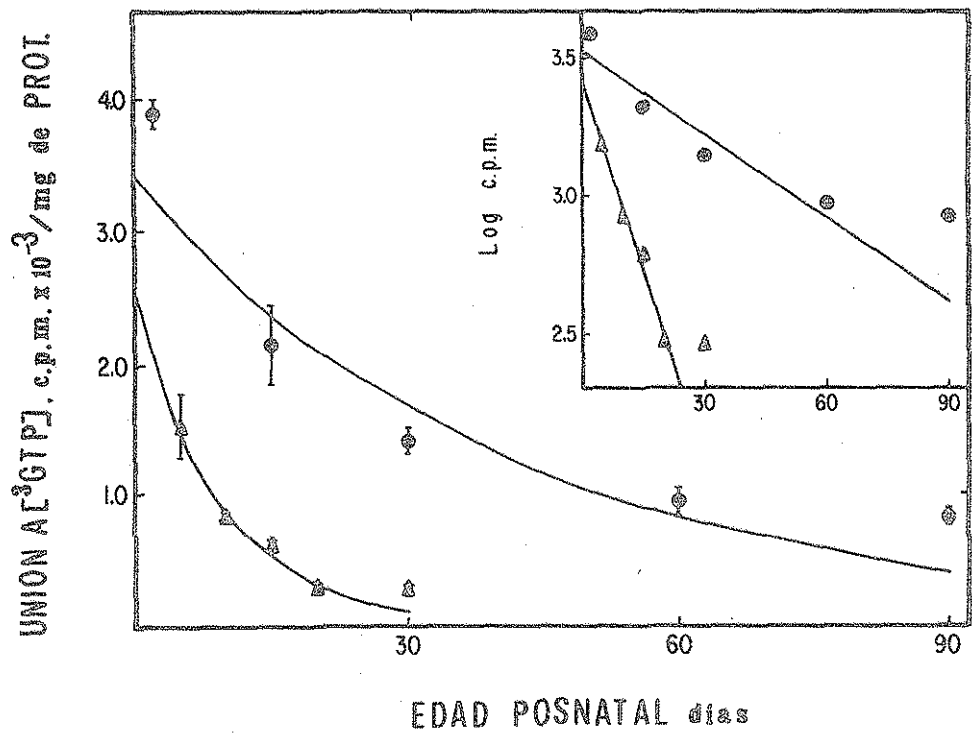


Fig. 1. Variación en la actividad de bEF-1, dependiente de la edad posnatal, en fracciones de sulfato de amonio preparadas de cerebros de ratón (▲) y de rata (●). Los puntos representan la media ± E. S. para 4-6 experimentos independientes. Curvas teóricas: $y_{RATON} = 2,541 e^{-0.10458X}$; $y_{RATA} = 3.372 e^{-0.02311X}$. Inserto: gráfica semilogarítmica de la actividad media en función de la edad. La regresión lineal fue obtenida por el método de cuadrados mínimos: $y_{RATON} = 3.405 - 0.0454X$ ($r = 0.9907$); $y_{RATA} = 3.528 - 0.01X$ ($r = 0.9771$). El último punto en cada grupo de datos fue excluido de los cálculos.

Se ha observado que existen múltiples formas de eEF-1; en cerebro de ternera las hay entre 50,000 y más de 1×10^6 de peso molecular (Moon, et al, 1973). Así también se ha observado que durante el envejecimiento de un nemátodo (Bolla y Brot, - - 1975) y el desarrollo de Artemia salina (Slobin y Moller, 1975) hay una disminución en la relación entre la forma pesada (eEF-1_A) y ligera (eEF-1_L) de la enzima. Con estos datos, se decidió estudiar cambios semejantes en el cerebro de roedores. Se tomaron las fracciones de sulfato de amonio, con cantidades equivalentes de proteína, de animales de diferentes edades y se fraccionaron en el gel de Sephadex G-200 y Sepharosa 4-B. Los perfiles de elución están representados en la Fig. 2 y muestran que las preparaciones de cerebro de rata contiene múltiples formas de bEF-1: bEF-1_H, bEF-1_L y variedades de formas intermedias - - (bEF-1_I). La forma pesada estuvo presente en el cerebro joven - pero prácticamente ausente en el cerebro adulto. Además, lbEF-1_L que está presente hasta el día 15, no se le encontró en los días alrededor del 30 (Fig. 2,B), mientras que bEF-1_H parece ser lenta y secuencialmente transformada a formas más pequeñas intermedias, bEF-1_I, que a los 90 días fueron eluidas en la posición de bEF-1_L joven (Fig. 2,D).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

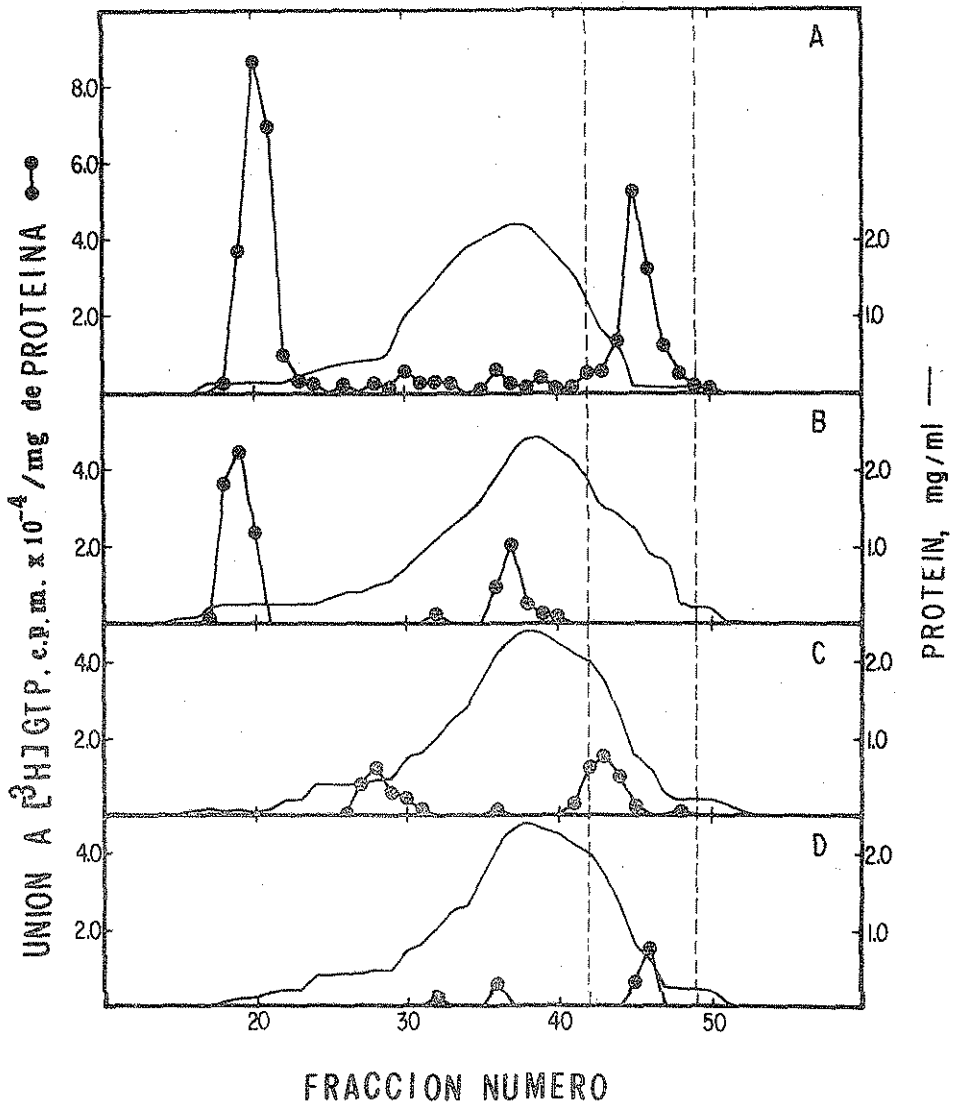


Fig. 2. Variación de las formas de bEF-1 en relación a la edad. Gráfica de perfiles de elución ($N = 6$) de la actividad de bEF-1 (O) y de cantidad de proteína (—) en preparaciones de sulfato de amonio de rata (50 mg de proteína) obtenidas en los días posnatales 15 (A), 30 (B), 60 (C) y 90 (D) (ver Métodos). Aliquotas de cada fracción (20 μ l) fueron tomadas para las determinaciones de la actividad del factor enzimático y para contenido de proteína. bEF-1_H eluyó en las fracciones 17-23; una variedad de formas bEF-1_L en las 24-41; y bEF-1_L en las 42-49.

En preparaciones de cerebro de ratón (N = 5) los datos fueron semejantes, aunque los patrones enzimáticos estuvieron corridos hacia edades más tempranas. El patrón de la Fig. 2,B apareció hacia el día 15. En ambos animales también la estabilidad del factor enzimático, medida por el rendimiento de las filtraciones en gel e inactivación por temperatura de iguales fracciones de la columna, no mostró diferencias en las diferentes edades. Debido a la semejanza de los resultados se presentarán solamente los obtenidos con rata.

Con el objeto de analizar si los cambios de la actividad de bEF-1 con respecto a la edad podían ser explicados por factores enzimáticos, se midió el nivel de actividad de preparaciones mixtas. Los resultados se muestran en la Fig. 3 donde una serie de experimentos en los que la actividad de bEF-1 fue medida por unión de phe-tRNA ^{14}C a ribosomas. Se utilizó bEF-1_H y bEF-1_I para 15, 30, 60 y 90 días, respectivamente. Además de la disminución en las velocidades y actividades totales que dependen de la edad, se observó que las mezclas (1:1) de preparaciones de 15 días con 30, 60 y 90 días dieron resultados que son simples adiciones aritméticas de los componentes. Resultados semejantes fueron obtenidos con la combinación de las otras formas de la enzima.

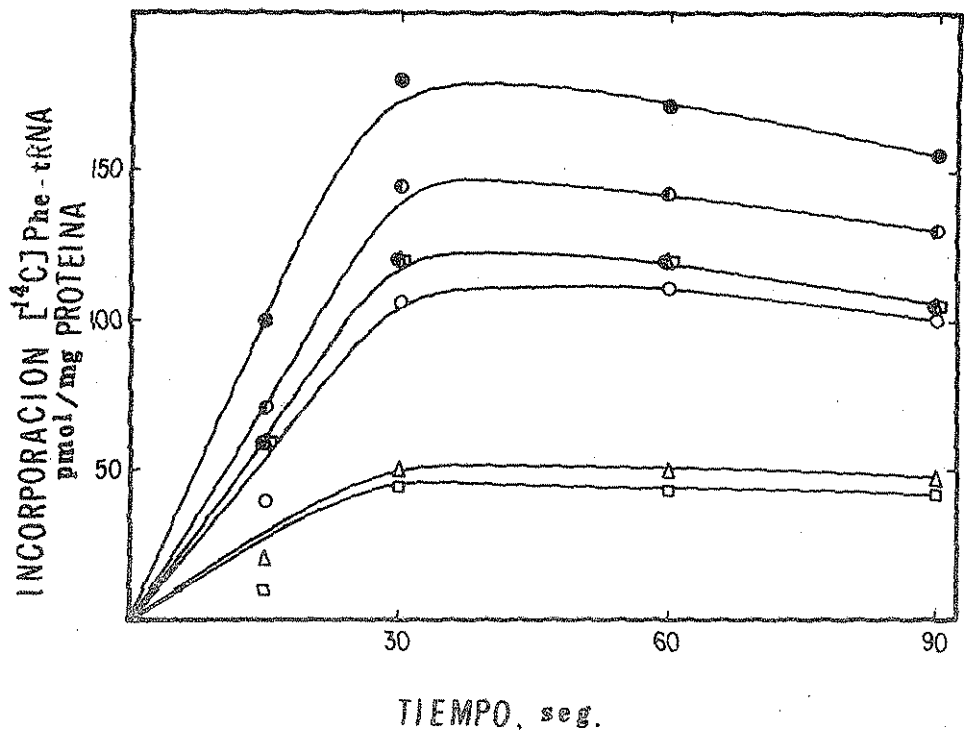


Fig. 3. Actividad de enlace de phe-tRNA de preparaciones de bEF-1, obtenidas en diferentes edades, contra tiempo. La actividad, en los días posnatales 15 (●), 30 (○), 60 (▲) y 90 (■), de preparaciones de bEF-1 de rata fue probada sola (30 ug) y en las siguientes mezclas con la preparación del día 15 (15 ug: 15 ug): día 30 (○), día 60 (●) y día 90 (●). Las fracciones 17-23, de la filtración por gel, fueron usadas para las preparaciones de los días 15 y 30; las fracciones 41-46 para los días 60 y 90.

Cuando se utilizaron cantidades limitantes del sobrenadante pH 5 de rata de varios tejidos, incluyendo cerebro, se encontró que la adición de EF-2 de hígado (1EF-2) en un sistema in vitro no modificó la incorporación de aminoácidos, pero el resultado fue positivo cuando se utilizó EF-1 de hígado (1EF-1) (Girgis y Nicholls, 1972). Con estos datos se investigó en este trabajo la capacidad de restaurar la baja actividad, que se presenta en el sistema in vitro de síntesis de proteínas de cerebro de ratón adulto, por el aumento en la concentración de la misma enzima de cerebro adulto bEF-1. Para esto se estudió la incorporación de aminoácidos en un sistema joven y adulto. En relación a la cantidad de la fracción sobrenadante pH 5, en la que se encuentran bEF-1 y bEF-2. La Fig. 4 demuestra que los niveles de incorporación de aminoácidos obtenidos por la fracción sobrenadante pH 5 fuente de bEF-1 y bEF-2 de cerebro adulto son menores que los obtenidos por la fracción de cerebro joven, tanto en las condiciones limitantes (menos de 5 ug) como en las de saturación (5-20 ug). Cantidades mayores de la fracción sobrenadante pH 5 produjeron una inhibición de la incorporación en lugar de una estimulación.

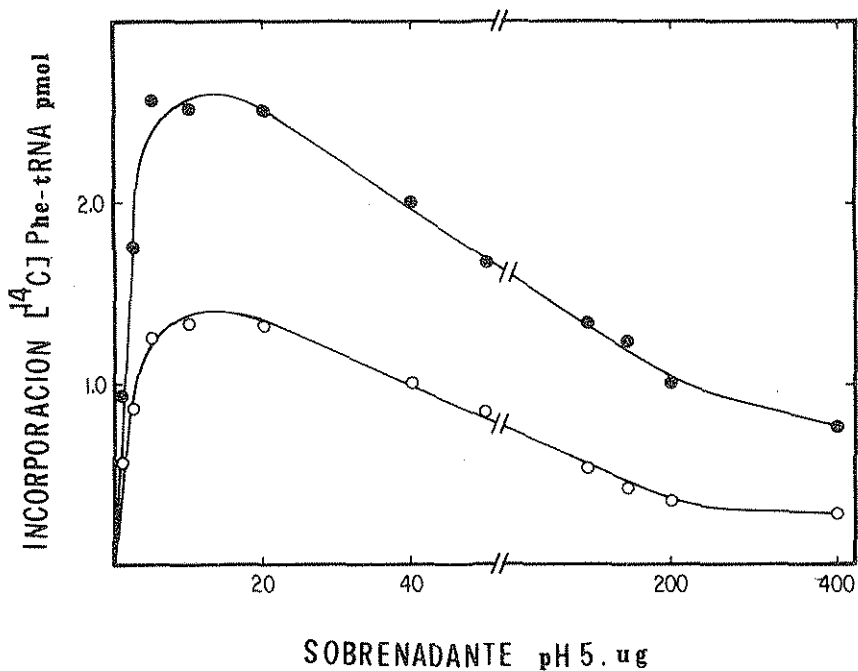


Fig. 4. Efecto de los sobrenadantes pH 5 joven y viejo sobre la incorporación de phe-tRNA en material insoluble en TCA caliente. Diferentes cantidades de sobrenadante pH 5 preparado de cerebros de rata de días posnatales 15 (●) o 90 (○) fueron añadidas a las mezclas de reacción mantenidas a un volumen constante. La polimerización fue ensayada como se describió en Métodos.

Si la diferencia entre las preparaciones jóvenes y adultas no fue abolida por el aumento en concentración de la enzima la eficiencia inherente de bEF-1 podría ser entonces la involucrada. Por consiguiente a un sistema de incorporación de aminoácidos de cerebro joven o de adulto se le agregaron preparaciones de bEF-1 de cerebro joven y adulto, en condiciones de saturación (10 ug). Cuando se añadió bEF-1_H joven al sistema de incorporación de aminoácidos de cerebro adulto, se pudo inducir una actividad semejante a la observada en cerebro joven (Fig. 5). Cuando se utilizó bEF-1_L se obtuvieron resultados semejantes. Por el contrario adición de bEF-1_H de cerebro joven al sistema - joven o de bEF-1 adulto a los sistemas joven y adulto, no modificaron la actividad original.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

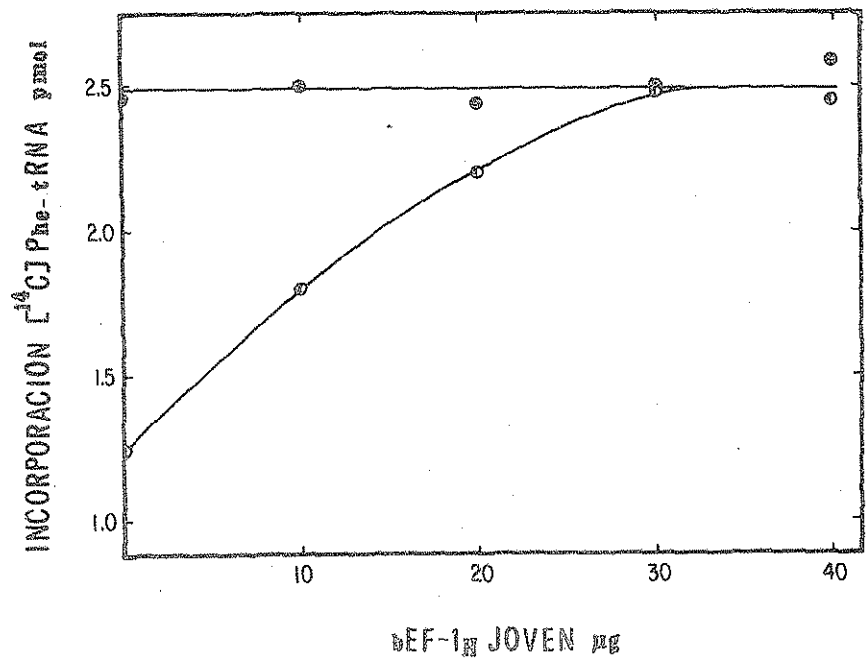


Fig. 5. Efecto de la preparación joven de bEF-1_H sobre la incorporación de phe-tRNA. Diferentes cantidades de la preparación bEF-1_H, obtenida de cerebros de rata de 15 días, fueron añadidas a los sistemas de incorporación que contenían 10 µg de sobrenadante pH 5 del día posnatal 15 (⊙) o 90 (⊗).

DISCUSION

La participación de los factores de elongación en la regulación a nivel de traducción fue propuesta por primera vez en huevos de erizo después de la fertilización, donde se encontró un aumento en la actividad de 2 veces (Castañeda, 1969), esto fue corroborado más tarde por Felliceti et al. (1972). Usando un diferente enfoque, Brandis y Raff (1978) han demostrado un aumento de 2-3 veces en la velocidad de traducción. En otros sistemas eucariotes en donde hay un aumento de síntesis de proteínas totales, se ha observado que la actividad de eEF-1, pero no la de eEF-2, presenta un incremento semejante. En todos estos sistemas eEF-1 parece ser un componente limitante en la velocidad (Willis y Starr 1971; Girgis y Nicholls, 1972; Nielsen et al., 1977; Dusek y Hradec, 1978; Young y Nicholls, 1978).

Hay algunas evidencias de que la actividad de estos factores se ve disminuida durante el envejecimiento de animales y bajo condiciones artificiales ó patológicas: la actividad de eEF-1 disminuye con la edad en un nemátodo (Bolla y Brot, 1975) y en hígado de ratas (de 2 a 24 meses de edad) (Bolla et al., 1975); también en células en cultivo deprivadas de suero, la actividad de eEF-1 se ve disminuida, pero no la de eEF-2 (Hasell y Engelhardt, 1976); en animales en ayuno ambos factores son menos activos en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el músculo, aunque eEF-2 no parece ser limitante (ver, Pain y Clemens, 1973); y la actividad de ambos facores disminuye en - hígado cirrótico (Gressner y Greiling, 1977). El cerebro de roedores fue escogido como un sistema en el cual la disminución de la actividad de eEF-1 con respecto a la edad puede ser demostrada bajo condiciones de crecimiento y diferenciación celular normal.

Los resultados reportados en este trabajo indican claramente que la actividad de bEF-1, tanto de rata como de ratón, está en relación inversa a la edad: la actividad disminuye cuando el cerebro madura. La magnitud de esta disminución es comparable con la disminución de 2 a 5 veces encontrada por otros autores - en sistema de síntesis de proteínas de cerebro utilizando sobrenadantes posmitocondriales (Yamagami et al., 1966; Johnson, 1968; Lerner y Johnson, 1970; Gilbert y Johnson, 1972; Gilbert, 1980) y con la mostrada en la Fig. 4. La disminución de la actividad - de bEF-1 con respecto al tiempo y el cambio de las formas pesadas a la forma ligera (Figs. 1 y 2 respectivamente) coinciden con la disminución de la síntesis de proteínas en el ratón (Gilbert y Johnson, 1974) y rata (Yamagami et al, 1966). Existe entonces, una correlación temporal entre las velocidades de síntesis de proteínas medidas in vivo e in vitro, y la actividad y predominancia de algunas de las formas de bEF-1.

La diferencia que se ha encontrado con respecto a la cinética cambio de la forma pesada a la forma ligera en estos roedores podría explicar el hecho de que Bolla et al. (1975) únicamente hayan encontrado la forma ligera encerebro de rata adulta y dos formas, pesada y ligera, en el cerebro de ratón cuya edad no fue especificada. El resultado más importante de este trabajo es haber encontrado que bEF-1 joven es capaz de producir un aumento en la incorporación de aminoácidos de cerebro en el sistema de cerebro adulto que a su vez no responde a bEF-1 de adulto (Fig. 5). Podemos pues concluir que dependiendo del sistema, bEF-1 puede funcionar como un factor limitante en la síntesis de proteínas.

Aunque la actividad de factores de elongación de cerebro, en relación al decremento de síntesis de proteínas, ha sido previamente estudiada, su relación directa no fue explorada. Chou et al. (1971) utilizaron bEF-1 joven para demostrar que los ribosomas de cerebros joven y viejo son equivalente en su unión a phe-tRNA. Gilbert y Johnson (1972) demostraron que su ensayo de polimerización de aminoácidos fue dependiente de la translocación de peptidil-tRNA por inhibición de bEF-2. Por último, el papel directo de bEF-1 en la disminución de proteínas con respecto a la edad fué descartado por la observación de que factores asociados

con ribosomas de hígado de rata estimularon la unión de phe-tRNA en presencia de concentraciones saturantes de sobrenadante posmitocondrial de cerebro, utilizado como fuente de factores de elongación; aunque no se especificó la edad del cerebro del que fue obtenido el sobrenadante (Gilbert y Johnson, 1973).

Esta última interpretación podría ser aplicada a los resultados obtenidos aquí (Figs. 4 y 5) pero solo cuando los datos de los sistemas joven y adulto son analizados independientemente. La incorporación de aminoácidos no pudo ser aumentada en cualquiera de los dos sistemas por la adición de su fracción sobrenadante, pH 5, o preparaciones de EF-1 homólogas más allá de ciertas cantidades (concentración a saturación). Por lo tanto, si los factores de elongación de hígado y cerebro fueran equivalentes - en su eficiencia, bEF-1 no estaría involucrado en el aumento obtenido por Gilbert y Johnson (1973). Sin embargo, hay dos evidencias experimentales que contradicen este punto. Clovet et al. (1966) probaron la actividad de sobrenadantes de 100,000 x g, sobrenadantes pH 5 y preparaciones de EF-1 de cerebro é hígado de ratas (150-200 g). Ellos encontraron que las preparaciones de hígado son más activas que las de cerebro (basadas en el contenido de proteínas), mientras que las enzimas pH 5 y eEF-2 fueron igualmente activas. Además, Girgis y Nicholls (1972) encontraron que la incorporación de phe-tRNA utilizando sobrenadante, pH 5, prepa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

radas de cerebro y riñón de ratas, de edad no especificada, fue menor que la obtenida por sobrenadante pH 5, de hígado; la actividad de incorporación pudo ser aumentada al nivel que presenta el hígado añadiendo preparaciones de EF-1, de hígado pero no de EF-2. Sin embargo, estos experimentos fueron realizados bajo condiciones de no saturación.

Los experimentos realizados en este trabajo fueron hechos en condiciones de saturación, como lo muestra el dato que las preparaciones de cerebro joven y de adulto no pudieron aumentar la actividad del sistema homólogo (Fig. 5). El aumento de incorporación obtenido en el sistema adulto, saturado con sus propios factores, cuando se le adiciona cEF-1 joven indica que los factores EF-1 de cerebro joven y adulto son cualitativamente diferentes. Esta conclusión se ve reforzada por los resultados de la Fig. 3 en donde el aumento en incorporación muestra que no se detectan efectores enzimáticos difusibles. La aparente desaparición de la forma joven de bEF-1_L (Fig. 2,B) es de lo más interesante a este respecto. Las posibles causas de las diferencias entre bEF-1 joven y adulto ameritan la continuación del trabajo.

El patrón de la disminución de la actividad de bEF-1 en rata es muy semejante al del ratón, pero difiere en la velocidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de decaimiento; la velocidad mostró una vida media de 30 y 6.6 días respectivamente, con una relación logarítmica de 1.8. Esta figura cae dentro del rango (1.75-1.8) obtenido cuando se forman los valores promedios del tiempo de vida y de madurez sexual: 3.5 y 2 años y 7 y 3.75 semanas para rata y ratón respectivamente (The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 1972). Esta semejanza en la relación sugiere que los procesos involucrados en la disminución de la actividad de BEF-1 es análogo en ambos animales. La medida con la cual esta correspondencia de índices estuviera más relacionada (desde el punto de vista de síntesis de macromoléculas) al desarrollo de cerebro o a su envejecimiento es muy interesante pero hasta el momento desconocida. Los múltiples componentes involucrados en el proceso de envejecimiento son poco conocidos y el problema en cerebro es todavía mayor por la heterogeneidad celular y por las diferencias en la velocidad de desarrollo que presentan las diferentes regiones cerebrales. En general, una vez que las células posmitóticas expresan sus funciones diferenciadas, los signos de envejecimiento comienzan a aparecer.

La maduración del sistema nervioso central en el ratón y en la rata toma lugar heterocrónicamente durante el periodo posnatal temprano y posiblemente exista una sobreposición en tiempo de ciertos procesos de desarrollo con otros de maduración

y envejecimiento. Sin embargo, es importante recordar aquí que, además de las varias deficiencias progresivas que acompañan al envejecimiento, la actividad de eEF-1 se ha encontrado disminuida en este proceso y en otros de degeneración, como fue ya mencionado previamente.

REFERENCIAS

- Adams, D.H. (1966). The relationship between cellular nucleic acids in the developing rat cerebral cortex. Biochem. J. 98, 636-640.
- Anderson, W.F., Bosch, L., Cohn, W.E., Lodish, H., Merrick, W.C., Weissbach, H., Wittmann, H.G., and Wool, I.G. (1977). International symposium on protein synthesis. FEBS Lett. 76, 1-10.
- Andrew, W. and Andrew, N.V. (1940). Comparison of the changes caused by fatigue and by aging in the cerebral cortex of mice. J. Comp. Neurol. 72, 525-533.
- Barra, H.S., Uñates, L.E., Sayavedra, M.S., and Caputto, R. (1972). Capacities for binding amino acids by tRNAs from rat brain and their changes during development. J. Neurochem. 19, 2289-2297.
- Bolla, R. and Brot, N. (1975) Age dependent changes in enzymes involved in macromolecular synthesis in Turbatrix aceti. Arch. Biochem. Biophys. 169, 227-236

- Bolla, R., Weissbach, H., and Brot, N. (1975). Multiple forms of elongation factor 1 in various rat tissues. Arch. Biochem. Biophys. 166, 683-684.
- Brandis, J. W. and Raff, R.A. (1978). Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. Dev. Biol. 67, 99-113.
- Castañeda, M. (1969). The activity of ribosomes of sea urchin eggs in response to fertilization. Biochim. Acta 179, 381-388.
- Chou, L., Lerner N.P., and Johnson, T.C. (1971). In vitro binding of phenylalanyl-tRNA to neonatal and adult mouse brain ribosomes. J. Neurochem. 18, 2535-2544.
- Clouet, D.H., Rather, M., and Williams, N. (1966). [¹⁴C] leucine incorporation into brain ribosomes. Biochim. Biophys. Acta 123, 142-150.
- Dusek, Z. and Hradec, J. (1978). Protein synthesis in tumor host. II. Increased activity of peptide elongation factor 1 in experimental rat tumors and in host liver. Neoplasma 25, 713-718.

Dwyer, B. and Wasterlain, C.G. (1980). Regulation of the first step of the initiation of brain protein synthesis by guanosine diphosphate. J. Neurochem. 34, 1639-1647.

Felicetti, L., Metafora, S., Gambino, R., and DiMatteo, G. (1972). Characterization and activity of the elongation factors T₁ and T₂ in the unfertilized egg and in the early development of sea urchins. Cell Differ. 1, 265-277.

Gilbert, B.E. (1978). Ribosomal activity in prenatal mouse brain. J. Neurochem. 31, 171-176.

Gilbert, B.E. (1980). Regulation of prenatal and postnatal protein synthesis in mouse brain. J. Neurochem. 35, 176-182.

Gilbert, B.E. and Johnson, T.C. (1972). The use of aminoacyl-tRNA to measure polypeptide synthesis by ribosomas isolated from neonatal and adult mouse brain tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 2034-2039.

Gilbert, B.E. and Johnson, T.C. (1973). Mouse brain ribosomal subunits: role of ribosome-associated factors on aminoacyl-tRNA binding and polypeptide synthesis. Brain Res. 63, 313-322.

Gilbert, B.E. and Johnson, T.C. (1974). Fetal development: the effects of maturation on in vitro protein synthesis by mouse brain tissue. J. Neurochem. 23, 811-818.

Gilbert, B.E., Grove, B.K., and Johnson, T.C. (1972). Characteristics and products of a cell-free polypeptide synthesizing system from neonatal and adult mouse brain. J. Neurochem. 19, 2835-2842.

Gilbert, J.M. (1974). Differences in the translation of rat forebrain messenger RNA dependent on the source of protein synthesis factors. Biochim. Biophys. Acta 340, 140-146.

Girgis, G.R. and Nicholls, D.M. (1972). Protein synthesis limited by transferase I. Biochim. Biophys. Acta 269, 465-476.

Gressner, A.M. and Greiling, H. (1977). Determination of protein synthesis elongation factor activity in liver biopsy specimens from normal and cirrhotic rats. Digestion 15, 348-352.

Hassell, J.A. and Engelhar, D.L. (1976). The regulation of protein synthesis in animal cells by serum factors. Biochemistry 15, 1375-1380.

- Johnson, T.C. (1967). The effects of maturation on in vitro RNA synthesis by mouse brain cells. J. Neurochem. 14, 1075-1081.
- Johnson, T.C. (1968). Cell-free protein synthesis by mouse brain during early development. J. Neurochem. 15, 1198-1194
- Johnson, T.C. (1973). Physical-chemical properties of mammalian brain ribosomes during neural development. Tex. Rep. Biol. Med. 31, 331-344.
- Johnson, T.C. (1976). Regulation of protein synthesis during postnatal maturation of the brain. J. Neurochem. 27, 17-23.
- Johnson, T.C. and Belytschko, G. (1969). Alteration in microsomal protein synthesis during early development of mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 844-851.
- Lerner, M.P. and Johnson, T.C. (1970). Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue. J. Biol. Chem. 245, 1388-1393.

Lerner, M.P. and Johnson, T.C. (1971). Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue: in vitro binding of template RNA to brain ribosomes. J. Neurochem. 18, 193-201.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mann, D.M.A. and Yates, P.O. (1975). Lipoprotein pigments-their relationship to aging in the human nervous system. I. The lipofuscin content of nerve cells. II. The melanin content of pigmented nerve cells. Brain 97, 481-498.

McKeehan, W.L. and Hardesty, B. (1969). Purification and partial characterization of the aminoacyl transfer ribonucleic acid binding enzyme from rabbit reticulocytes. J. Biol. Chem. 244, 4330-4339.

Moldave, K. (1963). The preparation of C¹⁴-aminoacyl soluble-RNA. Methods Enzymol. 6, 757-761.

Moon, H.M. and Weissbach, H. (1972). Interaction of brain transferase I with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 254-262.

Moon, H.M., Redfield, B., Millard, S., Vane, F., and Weissbach, H. (1973). Multiple forms of elongation factor 1 from calf brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3282-3286.

Murthy, M.R.V. and Rappoport, D.A. (1965). Biochemistry of the developing rat brain. V. Cell-free incorporation of L-|I¹⁴C|leucine into microsomal protein. Biochim. Biophys. Acta 95, 121-131.

Nielsen, J.B.K., Plant, P.W., and Haschemeyer, A.E.V. (1977). Control of protein synthesis in temperature acclimation. II. Correlation of elongation factor 1 activity with elongation rate in vivo. Physiol. Zool. 50, 22-30.

Pain, V.M. and Clemens, M.J. (1973). The role of soluble protein factors in the translational control of protein synthesis in eukaryotic cells. FEBS Lett. 32, 205-212.

Slobin, L.I. and Moller, W. (1975). Changes in form of elongation factor during development of Artemia salina. Nature 258, 452-454.

The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 4th ed. (1972). pp. 187-211. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Weissbach, H., Redfield, B., and Moon, H.M. (1973). Further studies on the interactions of elongation factor 1 from animal tissues. Arch. Biochem. Biophys. 156, 267-275.

Willis, D.B. and Starr, J.L. (1971). Protein biosynthesis in the spleen. III. Aminoacyltransferase 1 as a translational regulatory factor during the immune response. J. Biol. Chem. 246, 2828-2834.

Yamagami, S., Fritz, R.R., and Rappoport, D.A. (1966). Biochemistry of the developing rat brain. VII. Changes in the ribosomal system and nuclear RNA's. Biochim. Biophys. Acta 129, 532-547.

Young, E.T. and Nicholls, D.M. (1978). Liver enzyme induction by 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) is accompanied by an increase in the specific activity of elongation factor 1. Biochem. J. 172, 479-486.