

Tesis de Posgrado

Las poliaminas y su acción sobre la síntesis de proteínas

Echandi Meza, Guillermo G.

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Echandi Meza, Guillermo G.. (1975). Las poliaminas y su acción sobre la síntesis de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1477_EchandiMeza.pdf

Cita tipo Chicago:

Echandi Meza, Guillermo G.. "Las poliaminas y su acción sobre la síntesis de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1477_EchandiMeza.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LAS POLIAMINAS

Y SU ACCION SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS

AUTOR : Lic. Guillermo G. Echandi Meza

DIRECTOR : Dr. Israel D. Algranati

LUGAR DE TRABAJO : Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

1 9 7 5

Res No 1477

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Israel D. Algranati, por su constante apoyo y dirección en la realización de este trabajo, y sobre todo por los conocimientos que a través de él, he adquirido en estos tres años de labor a su lado.

A los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A mis compañeros de laboratorio, Mélida González, Sara Goldenberg, Oscar Surrone, Manuel García-Patrone, Francisco Baralle y Manzur Azzam, por su colaboración y afectuoso estímulo.

A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por su cooperación y crítica constructiva.

A mis amigos Roberto Couso, Gustavo Daleo y Pedro Romero, por los momentos agradables que hemos compartido cuando el trabajo diario nos lo permitió.

A Sara E. Dentéfano, cuyo empeño y dedicación hizo posible la transcripción de este trabajo.

A Soledad Giménez y Margarita Mazzardi por su valiosa colaboración.

A MIS PADRES

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
<u>INTRODUCCION</u>	
Las poliaminas y su acción en la síntesis proteica	1
Interacción de las poliaminas con el DNA	6
Interacción poliaminas y RNA	8
Acción de las poliaminas en la síntesis proteica	14
Acción de las poliaminas en la activación del RNA de transferencia	15
Interacción de las poliaminas con los ribosomas	18
Relación de las poliaminas con la unión del aminoacil tRNA al ribosoma	27
<u>OBJETIVOS DEL TRABAJO</u>	29
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	31
Medios de cultivo	31
Reactivos	33
Crecimiento de las bacterias y método de ayuno	34
Preparación de lisados bacterianos	35
Preparación de extractos bacterianos y distintas fracciones subcelulares por molienda	36
Análisis de la distribución ribosomal	37
Análisis del RNA ribosomal	39
Disociación de los ribosomas	40
Unión de las poliaminas (espermidina ¹⁴ C) a los ribosomas	41
Síntesis de RNA y proteínas en células enteras	42
Transporte de uracilo y leucina	43
Síntesis de polifenilalanina con ácido poliuridílico como RNA mensajero	44
Formación de fenilalanil tRNA	45

	<u>Pág.</u>
Síntesis de proteínas "in vitro" usando como mensajero natural RNA del fago MS-2	45
Formación del complejo de iniciación	47
<u>RESULTADOS</u>	
Requerimiento de putrescina para el crecimiento normal de cultivos de <u>Escherichia coli</u> MA - 261 previamente sometidos a un ayuno de poliaminas	49
Efecto del agregado de putrescina sobre la distribución intracelular de los ribosomas	53
Especificidad del efecto de la poliamina sobre la distribución de ribosomas	63
Disociación de los ribosomas	65
Unión de la espermidina al ribosoma y corrección del perfil ribosomal "in vitro"	67
Síntesis "in vivo" de RNA y proteínas	70
Transporte de uracilo y leucina	74
Síntesis "in vitro" de polipéptidos	76
Síntesis "in vitro" de polipéptidos usando RNA mensajero natural	85
Síntesis de polifenilalanina con subunidades ribosomales purificadas. Detección de partículas 30-S anormales	87
Formación del complejo de iniciación usando como mensajero el trinucleótido AUG	94
<u>DISCUSIÓN</u>	98
<u>CONCLUSIONES</u>	108
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	109

ABREVIATURAS

AMP	5' adenosina monofosfato
ATP	5' adenosina trifosfato
AUG	trinucleósido difosfato adenilil-uridil-guanosina
EDTA	etilén diamino tetracético
GTP	5' guanosina trifosfato
PEP	fosfoenol pirúvico
PK	piruvato quinasa
Poli U.:	ácido poliuridílico
PPi	pirofosfato inorgánico
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
DNA	ácido desoxirribonucleico
S-30	sobrenadante obtenido después de centrifugar un extracto a 30.000 x g
S-150 :	sobrenadante obtenido después de centrifugar a 150.000 x g
S	unidades Svedberg de sedimentación
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
fmet-tRNA :	formilmetionina unida a la especie iniciadora de ácido ribonucleico de transferencia
TCA	ácido tricloroacético
UDD-260nm :	unidades de absorción medida a 260 nanometros

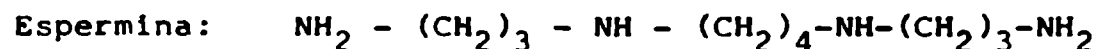
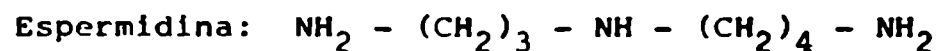
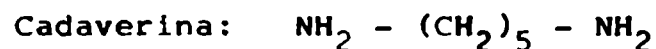
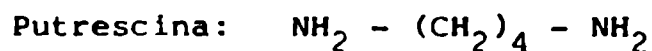
INTRODUCCION

Las poliaminas y su acción en la síntesis proteica

Las poliaminas son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza (1 - 4) que se encuentran presentes en todos los tejidos tanto animales como vegetales.

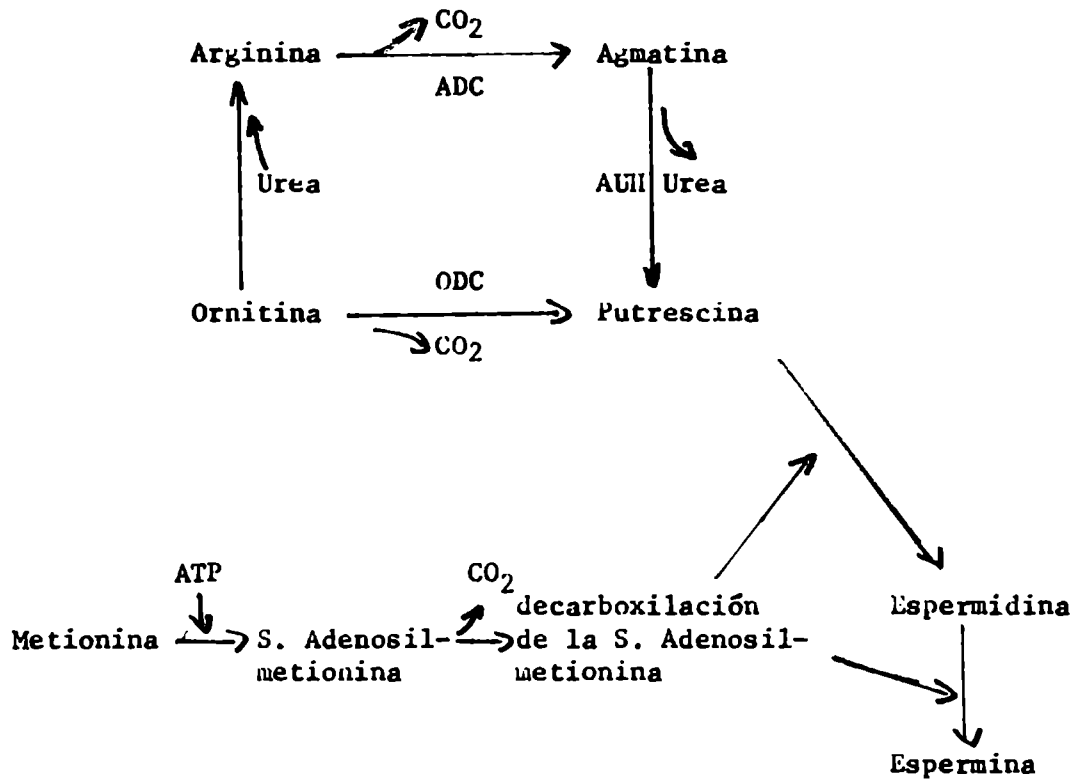
Aunque su distribución es universal, existen diferencias tanto cualitativas como cuantitativas, que dependen de los diferentes tipos celulares de los cuales se aíslan. En procariotes predominan la putrescina y la espermidina, mientras que en eucariotes, la espermina y la espermidina.

Las fórmulas químicas de las poliaminas antes citadas y la de la cadaverina (otra poliamina presente en las células, pero en menor concentración) son las siguientes:



Las poliaminas se pueden definir (5) como compuestos nitrogenados de carácter no proteico, alifáticos y de bajo P.M.

Se han realizado muchos estudios para determinar las vías metabólicas de su biosíntesis (6, 8) . Hoy se sabe que las poliaminas se sintetizan a partir de los siguientes tres aminoácidos: ornitina, arginina y metionina. El esquema de biosíntesis es el siguiente: (6, 7, 8).



ADC = Arginina decarboxilasa

ODC = Ornitina decarboxilasa

AUI = Agmatina ureohidrolasa

Las poliaminas fueron descritas por primera vez en 1676, por Leeuwenhock; pero recién en 1924 (9) Rosenheim determinó la estructura correcta y además sintetizó "in vitro" tanto a la espermidina como a la espermina (2).

Aunque actualmente se conoce que las poliaminas intervienen en múltiples procesos biológicos, tales como la síntesis de ácidos nucleicos (RNA, DNA) y de proteínas, la agregación de subunidades ribosomales, la estabilización de membranas, etc., su efecto biológico primario todavía no está bien definido.

A continuación detallaremos algunos aspectos de las funciones más conocidas de las poliaminas.

Interacción con la pared y membrana celular.

Los estudios para demostrar la función e interacción de las poliaminas con las membranas y la pared celular son bastante complejos, pues las poliaminas presentan una alta solubilidad que hace casi imposible evitar su redistribución al aislar los diferentes componentes celulares (15, 18, 19).

En 1955 Mager (22) trabajando con Pasteurella tularensis observó que si se hacía crecer dicha bacteria en

un medio hipotónico en presencia de espermidina, se evitaba la lisis que ocurría normalmente.

Posteriormente Bachrach y Mager (23, 25) realizaron una serie de experimentos "in vivo" con Bacillus subtilis en los que se demostró la presencia de la espermidina tanto en la pared como en la membrana celular.

Estos investigadores prepararon protoplastos (26) y trozos de pared (27) de Bacillus subtilis cultivado en un medio que contenía espermidina ¹⁴C, o metionina ¹⁴C (precursor de la espermidina). Se observó la presencia de espermidina radiactiva tanto en los protoplastos como en los trozos de pared celular, siendo mayor la concentración de espermidina ¹⁴C en los trozos de pared celular.

Estudios "in vitro" incubando trozos de pared celular y protoplastos con espermidina ¹⁴C, demostraron nuevamente la mayor afinidad de la pared celular por dicha poliamina.

En experimentos realizados con Escherichia coli (28) se observó que la presencia de espermidina era capaz de evitar la lisis enzimática con lisozima, obteniéndose esferoplastos que poseían la particularidad de ser mucho más estables que los obtenidos por otros métodos.

En estos casos la producción de los esferoplastos, no se debía a una inhibición enzimática por la espermi-

dina, sino a una estabilización de la membrana celular. En este proceso la espermidina interactuaba fuertemente con la membrana celular, de manera tal que no se podía eliminar, mediante lavados sucesivos de los esferoplastos formados.

Interacción de las poliaminas con el DNA

Las características catiónicas de las poliaminas sugirió la posibilidad de que dentro de la célula estas sustancias podrían unirse a los ácidos nucleicos.

Ya en 1957 Hershey (10) había aislado dos sustancias que denominó A_1 y A_2 , que eran inyectadas junto con el DNA durante la infección de bacterias por fagos T_4 . Posteriormente Ames (11, 12) identificó estas sustancias como putrescina y espermidina. A raíz de estos hallazgos se planteó la incógnita sobre la función de las poliaminas en la relación que podrían tener con el DNA del fago T_4 . Hoy se sabe, que las poliaminas son capaces de neutralizar el 40% de las cargas negativas del DNA del fago, permitiendo el empaquetamiento de dicho ácido nucleico dentro de la cabeza del virus (13). Experimentos posteriores, en los cuales se trabajó con fago T_4 (12) y esferoplastos de Escherichia coli (15) demostraron que la unión de la poliamina al DNA, se realizaba de una manera inespecífica, y que

simplemente, como se mencionó anteriormente servía para neutralizar las cargas de los fosfatos presentes en dicho ácido nucleico.

Trabajando con minicélulas de Escherichia coli K-12 (16) que contienen solamente un 3% del DNA total de una bacteria normal, se observó que la concentración de poliaminas unidas al total de los ácidos nucleicos de esta cepa mutante era aproximadamente igual a la concentración encontrada en los ácidos nucleicos de la cepa normal. Estos experimentos llevaron a la conclusión de que las poliaminas poseen una mayor afinidad por el RNA que por el DNA.

El hecho de que las dobles hélices de los ácidos nucleicos presenten una absorción a 260 nm menor que las de cadenas aisladas, permitió realizar una serie de experiencias (20, 21) "in vitro", en las cuales se demostró nuevamente la acción estabilizadora de las poliaminas sobre el DNA. Se sabe, que si un ácido nucleico de doble hélice se somete a un calentamiento paulatino comienza a desnaturalizarse y sus cadenas se separan. Esto determina un aumento de la absorción a 260 nm. Se suele llamar temperatura de fusión (T_m) (8) a la temperatura que provoca un incremento en la absorción equivalente a la mitad del incremento total observado cuando la molécula se ha desnaturalizado completamente.

Se ha visto (17) que las poliaminas son capaces de aumentar el T_m alrededor de 10°C por estabilización de las dobles hélices del DNA. Se ha estudiado el mecanismo de esta estabilización (79) y de acuerdo a los resultados se postula que las diaminas (putrescina y cadaverina) son capaces de formar puentes entre los fosfatos de una misma cadena del DNA ó entre dos cadenas de una misma molécula del ácido nucleico. La espermidina y la espermina forman puentes inter e intra moleculares.

El grado de estabilidad que las poliaminas confieren al DNA depende del número de grupos aminos presentes en la molécula de poliamina. Por esta razón la espermina es la que produce mayor estabilidad y la espermidina, cadaverina y putrescina, le siguen en orden decreciente.

Interacción poliaminas y RNA

Como se mencionó anteriormente, las poliaminas se encuentran unidas preferentemente al RNA (16, 29) que parece presentar un mayor número de sitios de unión que el DNA.

Se ha logrado aislar poliaminas unidas a los tres diferentes tipos de RNA: de transferencia, mensajero y ribosomal (13, 30, 31, 19).

También se ha demostrado tanto en células animales como en bacterias una íntima relación entre los niveles presentes de poliaminas y de RNA (32, 33, 31).

Las poliaminas interactúan de manera diferente de acuerdo al tipo de ácido nucleico con el que reaccionan. Mientras que en la estabilización del DNA, la conformación de éste no se altera apreciablemente. La interacción de las poliaminas con el RNA producen un efecto hipocrómico (36), lo que llevaría a pensar que existe una relación poliamina-RNA tal que se producen estructuras tipo doble hélice dentro de la molécula del RNA.

Estudios "in vitro", realizados con la RNA polimerasa DNA dependiente (37), demostraron que tanto la velocidad de síntesis, como la cantidad de RNA producido en esta reacción enzimática eran aumentados por las poliaminas. Se conoce que la RNA polimerasa puede unirse con DNA o RNA para formar complejos. Por lo tanto, la producción de RNA usando el DNA como molde puede verse seriamente inhibida por la presencia de RNA exógeno. Si se estudia el mecanismo de esta reacción, que involucra nucleótidos trifosfato, DNA, metales, la enzima y RNA exógeno, se observa que el orden en que se agreguen los reactivos es crítico y determina la cantidad de producto formado.

Para obtener una cantidad máxima de producto

se debe agregar primero el DNA y la enzima, pues si se agrega primero el RNA, se produce el complejo RNA-enzima y se impide la unión de la enzima a su templado, inhibiéndose de esta manera la síntesis de nuevo RNA.

La estimulación de la síntesis de RNA por las poliaminas (37) se debe a la interacción de estas sustancias con el complejo RNA-enzima, de manera tal que la poliamina es capaz de disociar el complejo, permitiendo por este mecanismo que exista una mayor cantidad de enzima disponible para unirse al DNA y producir RNA. Por otra parte se demostró que las poliaminas eran incapaces de disociar el complejo DNA-enzima.

Petersen (39) demostró que la poliamina actuaba en la síntesis de RNA por dos mecanismos diferentes: aumentando el número de sitios en el DNA capaces de unirse a la enzima y determinando la mayor polimerización del RNA, es decir la formación de cadenas más largas del producto.

La relación entre los niveles de espermidina y los de RNA fueron claramente demostrados en experimentos realizados con embrión de pollo e hígado de rata (41 - 43).

Si se trabaja con hígados en crecimiento activo, ya sea por ser hígados inmaduros de ratas recién nacidas o por estar en período de regeneración después de una hepatectomía parcial, se encuentra una relación directa entre

la estimulación de la síntesis de RNA y el aumento de la síntesis de espermidina (44 , 47). Si se estudian hígados adultos se observan niveles bajos tanto de espermidina como de RNA.

Se considera que la mayor cantidad de espermidina en hígados en regeneración se debe a un aumento en la actividad de la ornitina decarboxilasa (esquema hoja nº 2). Se producen entonces niveles altos de putrescina que estimulan a la enzima S-adenosil metionina decarboxilasa provocando una acumulación de espermidina (45).

Aparentemente el aumento de actividad de la ornitina decarboxilasa está acompañado por un incremento de actividad de la RNA polimerasa (46).

Raina y Cohen (48, 50, 51) han tratado de explicar mejor la relación entre los niveles de RNA y de poliaminas. Para ello han utilizado mutantes nutricionales de Escherichia coli, conocidas como mutantes TAU, pues requieren para su crecimiento la presencia de timina, uracilo y arginina en el medio de cultivo. Además las mutantes usadas eran de dos tipos: "Stringent" y "Relaxed". Se llama cepas "Stringent" a aquéllas en las cuales al suprimirse del medio de cultivo un aminoácido esencial para su crecimiento detienen tanto la síntesis proteica, como la síntesis de RNA. Las cepas "Relaxed" son aquéllas en las cuales la eliminación

de un aminoácido esencial, solamente detiene la síntesis proteica, manteniéndose normal la síntesis de RNA.

Si se estudian los niveles intracelulares de espermidina y de RNA en cultivos desarrollados en ausencia de arginina (aminoácido esencial para estas bacterias) de cepas TAU "st" y TAU "rel", se observa que, en las cepas TAU "rel" (donde la síntesis de RNA continúa) tanto los niveles de espermidina como de RNA son altos, mientras que en las cepas TAU "st" (donde no hay síntesis de RNA) los niveles intracelulares de espermidina se mantienen muy bajos.

Cuando las cepas de Escherichia coli TAU "st" sometidas a un ayuno de arginina, se cultivan en presencia de estreptomina (48, 49) las bacterias se comportan como "relaxed" y se observa nuevamente estimulación de la síntesis de RNA que es acompañada por un incremento en los niveles de espermidina. Resultados similares se obtienen cuando se trabaja con cepas TAU "st" (48) sometidas a ayuno de arginina, pero desarrollados en presencia de espermidina, en estos casos la presencia de la poliamina en el medio de cultivo hace que se sintetice nuevamente RNA.

Para determinar si los niveles altos de RNA provocaban acumulación de espermidina, o viceversa, Cohen utilizó mutantes TAU "rel" cultivadas en ausencia de arginina y de uracilo. En estas condiciones se provoca la inhi-

bición de la síntesis de RNA y se encontró que la síntesis de espermidina no era afectada. Esto hizo pensar que son los cambios en los niveles de espermidina los que producen alteraciones de la síntesis de RNA. La conclusión anterior fue posteriormente ratificada por Cohen, trabajando con mutantes de Escherichia coli deficientes en potasio (34).

Estas bacterias en medios ricos en Na^+ pero deficientes en K^+ y purinas (condición de no crecimiento), detienen la síntesis de RNA, pero mantienen inalterada la velocidad de síntesis de la espermidina.

Los trabajos efectuados por Raina y Cohen fueron seriamente criticados por Maas y Srinivasan (52), debido a que en las experiencias descritas por los primeros los niveles de poliaminas utilizados eran bastante superiores a las concentraciones fisiológicas.

Maas y Srinivasan trabajaron con cepas mutantes de Escherichia coli auxótrofas para putrescina y demostraron (50 , 51) que las poliaminas actuaban en forma indirecta sobre la síntesis del RNA, posiblemente contrarrestando el efecto de algunos inhibidores de dicha síntesis y permitiendo de esta manera una mayor acumulación del RNA.

Acción de las poliaminas en la síntesis proteica

El hecho de que las poliaminas se encuentran formando complejos con las distintas clases de RNA, tanto mensajero como de transferencia y ribosomal llevó a pensar que estas sustancias, podrían desempeñar un papel muy importante en la regulación de la síntesis proteica (53, 13).

Experimentos realizados en varios laboratorios (54 - 58) demostraron que a concentraciones subóptimas de Mg^{++} , las poliaminas eran capaces de aumentar la incorporación de aminoácidos marcados, cuando se usaba sistemas libres de células con RNA mensajeros artificiales.

Otros investigadores trabajando con espermidina y espermina (55), demostraron que estas sustancias eran capaces de producir errores de lectura cuando se usaba poli U como mensajero.

Posteriormente Takeda (60) demostró nuevamente, pero trabajando con mensajeros naturales (RNA mensajero de MS-2) que las poliaminas eran capaces de disminuir los niveles óptimos de magnesio, para la síntesis de la proteína capsular del virus.

Hurwitz (58 - 59) demostró que las concentraciones de magnesio intracelulares, eran demasiado bajas con respecto a los niveles utilizados para la síntesis de pro-

teínas "in vitro". Por esta razón se postuló que "in vivo" se usan tanto el Mg^{++} como las poliaminas (en especial la espermidina) en la biosíntesis proteica.

Acción de las poliaminas en la activación del RNA de transferencia

La primera etapa en la síntesis proteica es la activación de aminoácidos y la formación de complejos aminoacil tRNA (61). Esta etapa sumamente específica determina en gran parte la fidelidad de la copia del mensaje (que depende de una reacción de reconocimiento entre el codón del RNA mensajero y el anticodón del tRNA).

La reacción clásica por la cual se sintetiza el aa-tRNA es la siguiente: (62 - 63)

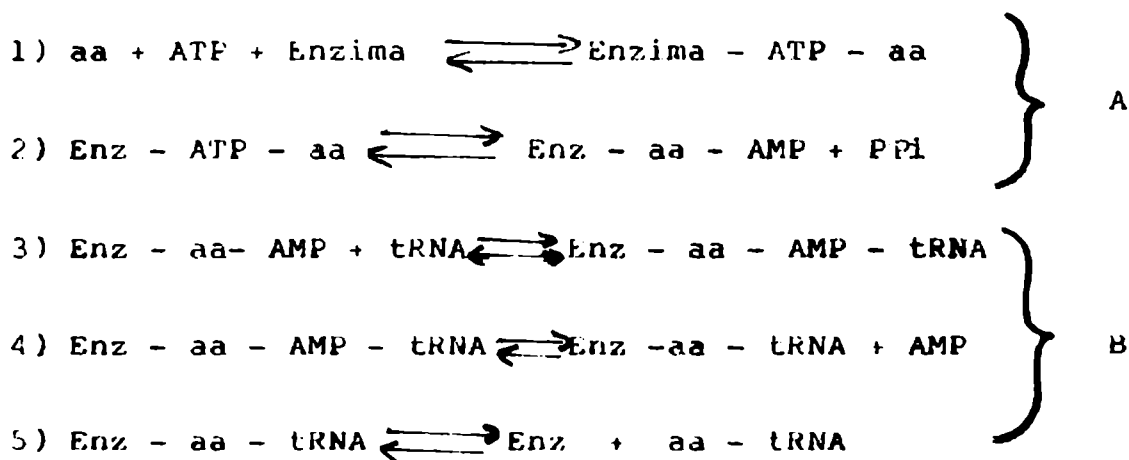


Existen una serie de evidencias que apoyan este mecanismo, en especial el hecho de poder aislar el complejo aminoacil-AMP-enzima en columnas de sephadex, y que este complejo así aislado pueda transferir su aminoácido al tRNA correspondiente.

Allende y col. (63) estudiaron esta reacción y observaron que tanto para la formación del complejo AA-AMP + Enzima, como para la transferencia del aminoácido al tRNA era necesaria la presencia de niveles altos de Mg⁺⁺.

Posteriormente, analizando la reacción de transferencia (b), ellos demostraron que el Mg⁺⁺ podía ser reemplazado por espermidina, sin que se alteraran los niveles de AA - tRNA formado (65 - 66).

En 1972 Eldret (64) estudió más a fondo esta reacción, postulando 5 etapas.



La reacción A ocurre rápidamente, mientras que la reacción B es mucho más lenta y por lo tanto limitante. Por otra parte ya se sabía que la formación del complejo AA - AMP - Enzima podía determinarse indirectamente por agregado de ³²Ppi exógeno. De esta manera se detecta

la reacción inversa por formación de ATP(^{32}P), aminoácido y enzima.

El mecanismo propuesto anteriormente fue seriamente objetado por Loftfield (74, 67), quién propone un mecanismo concertado en el que reaccionan el aminoácido, la enzima, ATP y el tRNA simultáneamente sin formación de complejo AA - AMP - Enzima Intermediario.

Igarashi y Pastuzyn (72 - 73) demostraron que en presencia de espermidina o espermina es posible obtener aminoacil - tRNA en ausencia de Mg^{++} y sin la formación del complejo intermediario. Estos hechos apoyaron la teoría de Loftfield, quién también refirmó su hipótesis con el siguiente experimento (67): si se usa una mezcla de reacción que contiene complejo (AA - AMP - enzima) radiactivo marcado con ^{14}C en el aminoácido, espermina, ATP, aminoácido libre marcado con tritio, y una cantidad limitante de tRNA, la mayoría del aa- tRNA que se forma proviene del aminoácido libre o sea de aquél que no está formando complejo. De esta manera se concluye que en presencia de poliaminas el mecanismo que predomina es el de tipo concertado.

Los experimentos de Loftfield son criticados por otros investigadores (68 - 69 - 70), quienes argumentan que en las experiencias descritas en presencia de esper-

mina y ausencia de magnesio, existía contaminación por el magnesio complejado por el tRNA. Ellos postulan que las poliaminas actuarían desplazando al magnesio del tRNA y permitiendo que el magnesio liberado pueda actuar en la reacción de aminoacilación del tRNA.

Otros experimentos (71) indicaron que el EDTA usado para la eliminación total del magnesio de las preparaciones de tRNA actuaba inhibiendo la enzima encargada de formar el aminoacil tRNA.

Se debe mencionar también que Cohen (34), ha demostrado usando bromuro de etidio la presencia en la molécula de tRNA de sitios de unión limitados y específicos para las poliaminas.

Todos los hechos mencionados parecen señalar que las poliaminas están unidas al tRNA y participan (posiblemente junto con el Mg^{++}) en la reacción de activación de aminoácidos.

Interacción de las poliaminas con los ribosomas

Antes de entrar a analizar la relación de las poliaminas con el ribosoma, creo necesario definir dichas estructuras donde se realiza la síntesis proteica.

Los ribosomas son partículas macromoleculares formadas por RNA y proteínas (88). Estas partículas se clasifican de acuerdo a su coeficiente de sedimentación: en procariotes se aíslan ribosomas con coeficiente de sedimentación 70 S, que pueden disociarse en dos subunidades más pequeñas de coeficientes 30 S y 50 S.

A partir de organismos eucariotes se aíslan ribosomas 80 S que pueden dar lugar a subunidades 40 S y 60 S.

Si se analiza más a fondo la composición de las subunidades de bacterias se puede determinar sus componentes: La subunidad 30 S está compuesta por una molécula de RNA de coeficiente de sedimentación de 16 S (PM 0.55×10^6) (80 - 82) y 21 proteínas (83). Por otra parte de la subunidad 50 S, se aíslan dos moléculas de RNA, una de 5 S (PM = 4×10^4) y otra de 23 S, (PM = $1,1 \times 10^6$) y 34 proteínas (84 , 91).

Hace algunos años se creía que los ribosomas desempeñaban un papel pasivo en la síntesis proteica; hoy se sabe que dichas partículas además de servir de soporte a la síntesis proteica, intervienen en forma activa y directa en la regulación de dicha síntesis.

Podemos enumerar las siguientes funciones ribosomales en el proceso de traducción:

- I) Reconocimiento y unión del RNA mensajero por la subunidad 30 S (89 - 91). En esta etapa interviene un factor proteico llamado IF 3 (93, 94), que confiere especificidad a la unión entre la subpartícula ribosomal y el mensajero.
- II) Existencia de dos sitios de unión en el ribosoma (84, 92), para el aminoacil tRNA y el peptidil tRNA. Estos sitios se denominan A y P respectivamente.
- III) Formación de la unión peptídica: Es la reacción que involucra la formación de la unión entre el peptidil tRNA (unido al sitio P) y el aminoacil tRNA (unido al sitio A). En esta reacción el peptidil tRNA cede el péptido al aminoacil tRNA produciéndose una cadena polipeptídica con un aminoácido más y la simultánea hidrólisis de GTP (84, 91). En la formación del enlace peptídico participa una o más proteínas presentes en la subunidad 50 S, que se conocen con el nombre de peptidil transferasas (96 -97).
- IV) Control de la fidelidad de lectura del RNA mensajero (95).
- V) Translocación:
Se conoce con este nombre a la etapa en la cual el ribosoma, mediante un cambio conformacional se des-

plaza a lo largo del RNA mensajero. De esta manera queda expuesto un nuevo codón en el sitio A del ribosoma y el peptidil tRNA pasa al sitio P, con la consecuente liberación del tRNA deacilado (98).

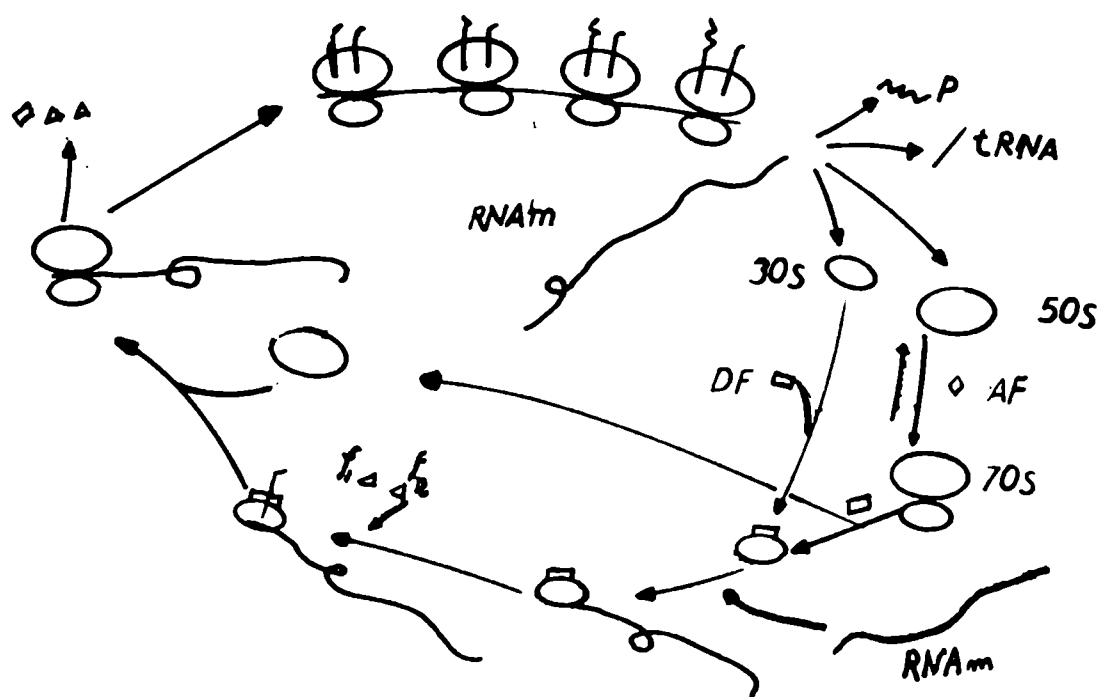
Cuando se analizan extractos bacterianos se encuentran ribosomas en varias formas: unidos a complejos polisómicos, como monómeros libres o como subunidades 30 S y 50 S.

Los monómeros pueden ser de tres tipos: de terminación, que se forman por asociación de las subunidades libres, los monosomas de iniciación y los que se producen por la ruptura de los polisomas, y por lo tanto tienen unidos trozos de RNA mensajero y peptidil tRNA.

La distribución de los diferentes tipos ribosomales aislados depende del método de extracción (99, 100, 105) y de la etapa de crecimiento en que se encuentre el cultivo bacteriano (101).

Los ribosomas participan durante la síntesis de proteínas de un ciclo que se puede esquematizar de la siguiente manera (101 - 104).

CICLO RIBOSOMAL



P = Proteína

DF = Factor de disociación

AF = Factor de asociación

f1 = Factor de iniciación

f2 = Factor de iniciación

Los monómeros ribosomales representan entre el 15 y el 20 % del total de la fracción ribosomal y se encuentran en un equilibrio dinámico con las subunidades. Este equilibrio está fuertemente desplazado hacia los monómeros. El papel fisiológico de estas partículas es muy discutido; algunos autores las consideran una reserva que la célula puede utilizar cuando se requiere una mayor síntesis proteica.

Se ha aislado un nuevo factor a partir de Bacillus stearothermophilus (85 - 87) que posee la capacidad de desplazar el equilibrio $70 S \rightleftharpoons$ subunidades ribosómicas hacia el monómero. Este factor, que también ha sido encontrado en células animales (134) podría intervenir activamente en el ciclo ribosomal y se ha demostrado que contiene poliaminas (86).

Estas sustancias confieren estabilidad a los ribosomas y aumentan la relación monómeros / subunidades.

En 1960 Cohen (30) demostró la presencia de putrescina y espermidina en la fracción ribosomal de lisados de Escherichia coli. Aproximadamente el 15% del total de la poliamina endógena estaba unida al ribosoma, y esta localización no se debía a una redistribución de las sustancias posterior a la lisis celular.

Cohen (30) también comprobó que cuando los

extractos bacterianos se preparaban en medio acuoso los monómeros ribosomales desaparecían y solamente se encontraban las subunidades de bajo coeficiente de sedimentación. Cuando los extractos se obtenían en medios acuosos pero en presencia de magnesio o de espermidina nuevamente reaparecían los monómeros.

Stevens (106 , 108) demostró que contrariamente a los resultados de Cohen, debía existir un gran intercambio entre las poliaminas unidas al ribosoma y el medio de extracción. Este intercambio dependía de las características iónicas del medio y aumentaba a mayor fuerza iónica.

Los estudios de Stevens (107) con Bacillus stearothermophilus cultivados a 45 - 55 y 65 °C indicaron que la mayor cantidad de poliamina unida a ribosomas provenía de los cultivos desarrollados a 65 °C, aún cuando a esa temperatura la concentración total de poliamina intracelular era la menor. Además se encontró que los ribosomas aislados de los cultivos a 65 °C (que solamente se diferenciaban de los aislados a 45 y 55 °C en la concentración de poliaminas) eran muy estables a la desnaturalización térmica.

Cuando los ribosomas aislados de Bacillus stearothermophilus se dializaban contra soluciones de

naranja de acridina (que se une a los ácidos nucleicos), este colorante se unía a los ribosomas aunque no era capaz de desplazar la espermidina presente en los mismos. Por otra parte, si un experimento similar se realizaba con RNA ribosomal al cual se le había unido espermidina, el colorante era capaz de desplazar a la poliamina. De esta manera se puede concluir que posiblemente las poliaminas unidas al ribosoma están protegidas, evitándose su desplazamiento. Wiess y col. (110 - 113) estudiaron más a fondo la relación entre los niveles de magnesio y espermidina en los ribosomas de Escherichia coli. Estos investigadores demostraron por medio de diálisis que la espermidina es capaz de desplazar al magnesio del ribosoma sin alterar la carga neta de la partícula. Cuando la espermidina reemplaza más del 70% del Mg^{++} en el ribosoma, estas partículas pierden su capacidad de sintetizar polifenil alanina en sistemas " in vitro ". Por lo tanto parece requerirse un mínimo del 30% de magnesio para mantener las características estructurales y funcionales del ribosoma. Por desplazamiento de más del 70% del Mg^{++} en las partículas ribosomales, éstas pierden proteínas, sufren alteraciones del coeficiente de sedimentación y se vuelven más sensibles a la RNAsa.

Se ha postulado (114) la presencia de dos sitios hábiles para la unión de cationes a los ribosomas de hígado de rata, y de tres sitios para los de Escherichia

coli (111 - 113).

El sitio I en los ribosomas de Escherichia coli, estaría ocupado únicamente por el ión Mg^{++} y correspondería al catión necesario para mantener las características funcionales y estructurales del ribosoma; en el caso específico de los ribosomas de Escherichia coli, el magnesio presente en el sitio I podría ser reemplazado por Mn^{++} . Esto no ocurre en los ribosomas aislados de hígado de rata (114).

El sitio II podría unir los cationes divalentes y las poliaminas. El sitio III estaría ocupado por cationes monovalentes como el Na^+ , NH_4^+ y sobre todo por el potasio (K^+). Aunque este sitio también podría ser ocupado por el Mg^{++} y las poliaminas, se considera que sería necesario un nivel mínimo de iones monovalentes y en especial de K^+ , para que los ribosomas puedan funcionar activamente en la síntesis proteica (115 - 116). Mediante el estudio de cultivos de Bacillus thuringiensis, Igarashi (117) ha realizado las siguientes observaciones:

- 1) Los ribosomas de Bacillus thuringiensis en desarrollo logarítmico son mucho más activos en síntesis proteica "in vitro" que las partículas ribosomales de bacterias en fase estacionaria.

- II) La carga catiónica neta de los ribosomas obtenidos de bacterias en crecimiento logarítmico es mayor que la carga de las partículas de células en fase estacionaria.
- III) El incremento de la carga neta catiónica de ribosomas, durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano se debe a un aumento de la concentración de poliaminas. En cambio el nivel de magnesio varía muy poco durante las distintas etapas del crecimiento. Estos hechos y la posibilidad de reemplazar aunque sea parcialmente al magnesio, indican la importancia de las poliaminas presentes en los ribosomas y el papel fundamental que estas sustancias desempeñan en la síntesis proteica.

Relación de las poliaminas con la unión del aminoacil tRNA al ribosoma

Takeda y col. encontraron que existe una íntima relación entre los niveles de magnesio y poliaminas y la unión del aminoacil tRNA al ribosoma (75). Es bien conocido que la unión del aminoacil tRNA al ribosoma requiere niveles altos de magnesio (76 - 77).

El hecho de que las poliaminas (75) sean capaces de disminuir los niveles óptimos de magnesio para esta reacción de unión al ribosoma, conjuntamente con las observaciones de Hurwitz (58), de que los niveles intracelulares de magnesio no son suficientes para obtener una capacidad máxima de unión, hacen suponer que "in vivo" las poliaminas pueden sustituir parcialmente al magnesio en esta reacción.

Tanner demostró trabajando con levaduras (78) que en este caso las poliaminas, además de estimular esta reacción de unión a concentraciones subóptimas de magnesio, eran un requerimiento indispensable para que dicha reacción se llevara a cabo.

Objetivos del trabajo

El aislamiento de mutantes bacterianas en la síntesis de putrescina (50 - 51) ha permitido estudiar mejor las funciones que las poliaminas desempeñan en la célula.

Nosotros trabajamos con una cepa doble mutante de Escherichia coli K-12 auxótrofa para poliaminas, por lo cual necesita la presencia de espermidina o putrescina en el medio de cultivo para crecer normalmente.

Esta cepa tiene dañadas las enzimas ornitina decarboxilasa y agmatina ureohidrolasa, por lo cual los dos caminos metabólicos para la síntesis de putrescina se encuentran bloqueados (esquema página 3). La actividad de la enzima ornitina decarboxilasa presente en la mutante es aproximadamente un 2 % de la actividad de la enzima de bacterias normales. Por otra parte, la agmatina ureohidrolasa tiene sólo 4 % de la actividad correspondiente a la enzima normal.

El hecho de que esta mutante necesite la presencia de poliamina en el medio de cultivo para crecer normalmente, y la característica de las poliaminas de actuar en pequeñas concentraciones determina que esta cepa deba someterse a un proceso de ayuno para disminuir los niveles intracelu-

lares de poliaminas; solamente después del ayuno las bacterias requieren poliaminas para su crecimiento.

En estas condiciones es posible estudiar el rol fisiológico de estas sustancias y analizar su participación en distintos procesos metabólicos.

El objeto de este trabajo consiste en relacionar la capacidad de las poliaminas para asociar subunidades ribosomales y su posible intervención, tanto en la biosíntesis y ensamblado de los ribosomas, como en las diferentes etapas de la "traducción".

MATERIALES Y METODOS

Materiales y métodos

En todos nuestros experimentos se trabajó con Escherichia coli MA-261 que es auxótrofa para Treonina, Leucina, Serina y Tiamina. Esta cepa es además una doble mutante que tiene dañadas las enzimas Agmatina Ureo-hidrolasa (AUH⁻) y la Ornitina decarboxilasa constitutiva (ODC⁻), lo que determina un requerimiento exógeno de putrescina para crecer normalmente (S. Cunningham, W. Maas. En prensa).

Medios de cultivo

A) Medio sólido:

Bacto nutrient broth	0,8 g
Na Cl	0,5 g
Agar	2 g

Se mezcla, posteriormente se disuelve en 100 ml de agua destilada.

B) Medio líquido MMO: Contiene por litro los siguientes componentes:

Sol. a	=	40 ml
Sol. b	=	40 ml

- Glucosa 20% = 24 ml
- Tiamina 0.5 mg / ml = 8 ml
- Biotina 0.5 mg / ml = 20 ml
- Sol. de aminoácidos 2,5 mg / ml = 40 ml
- Ornitina 2.5 mg/ml = 40 ml

Sol. a (sales) : KH_2PO_4 = 87,5 g
 H_2KPO_4 = 37,5 g
 $3\text{H}_2\text{O Na}_3$ Citrato = 6,24 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada

Sol. b (sales) : $\text{Mg (SO)}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,25 g
 $(\text{NH}_4)_2 (\text{SO})_4$ 12,5 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada

Sol. de aminoácidos:

Leucina, Treonina, Serina, Metionina,
 Glicina en una concentración de 2,5 mg/ml de c/uno.

C) Medio líquido MMA: Posee los mismos componentes que el medio MMO excepto que se le agrega 40 ml de Arginina (5mg/ml) por litro de medio cultivo en lugar de ornitina.

D) Medio líquido MMOP:

Contiene los mismos componentes que el medio líquido MMO con el agregado de 40 ml de putrescina (2,5 mg/ml) por litro de medio cultivo (putrescina diclorhidrato).

Reactivos:

Los reactivos utilizados en los diferentes experimentos son los siguientes: sacarosa (libre de ribonucleasa) adquirida en Schwarz-Mann; putrescina diclorhidrato de Schwarz-Mann; espermidina triclorhidrato y espermina tetraclorhidrato de Sigma; cloranfenicol de Parke Davis; rifampicina de Lepetit; ácido poliuridílico y RNA del fago MS-2 de Miles; RNA de transferencia de Escherichia coli de General Biochemicals; las sustancias radiactivas leucina ^{14}C , fenilalanina ^{14}C , uracilo ^{14}C , espermidina ^{14}C , valina ^{14}C , metionina ^{14}C y metionina ^3H se obtuvieron en New England Nuclear Corporation.

Crecimiento de las bacterias y método de ayuno

A partir de una estria de Escherichia coli MA-261 desarrollada en medio A se inoculó medio líquido MMO (B) y se dejó crecer. Luego se mantuvo el cultivo en frío a 0 °C (hielo picado) durante varias horas, procedimiento que produce la eliminación de putrescina de la célula al medio, favoreciéndose de esta manera el ayuno. El cultivo se diluyó posteriormente 50 veces con medio MMA (C) y se dejó crecer a 37 °C durante la noche; el crecimiento en este medio líquido produce un aumento considerable de la población bacteriana. Nuevamente se realizó una dilución 1 : 10 del cultivo anterior con medio fresco MMO dejándose crecer hasta obtener una población bacteriana de 2 a 3 x 10⁸ células /ml. Este cultivo se utilizó mediante dilución 1 : 3 en MMO y MMOP (D) para preparar los cultivos finales. En esta etapa y en el medio MMO se puede observar que el nivel intracelular de poliaminas ha disminuído en forma tal que la bacteria requiere el agregado exógeno de poliaminas para crecer normalmente. Se sabe que mediante este método de ayuno los niveles de putrescina intracelulares disminuyen 100 veces, mientras que los de espermidina se reducen aproximadamente a la mitad (50 -51).

Todos los cultivos se efectuaron a 37 °C durante la noche, con buena aereación. El crecimiento bacteriano se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm.

Preparación de lisados bacterianos

Los lisados bacterianos, se prepararon a partir de cultivos en crecimiento logarítmico. Las células se cosecharon después de un enfriamiento lento, (15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos en hielo picado) de manera tal que se completa la síntesis proteica, acumulándose de esta forma los monómeros de terminación, e impidiéndose una nueva reiniciación por la baja temperatura.

Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 3.500 xg durante 10 minutos y se resuspendieron en 0,2 ml de sacarosa 25% en buffer Tris-HCl 10mM pH 7,8 60mM KCl (la sacarosa usada es libre de ribonucleasa). Se agregó posteriormente 50 µl de una mezcla (1 : 1) de lisozima (Sigma 10 mg/ml en buffer 0,25 mM Tris-HCl pH7,8) y 8mM EDTA,dejándose a 0 °C durante 5 minutos; se agregó luego 5µl de acetato de magnesio 1M y se congeló y

descongeló dos veces en nieve carbónica-acetona. Después de dejar descongelar en agua fría se agregó 25µl de deoxicolato de sodio (25 mg/ml) en buffer 10mM Tris HCl pH7.2, manteniendo por 10 minutos a 0 °C, y luego se añadió 3µl de DNAsa (2,5 mg/ml) . Después de 5 minutos a 0 °C, se agregó 0,2 ml de buffer 20 mM Tris HCl pH 7,8 , 10mM acetato de magnesio, 50mM KCl y se centrifugó a 7.000 xg. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes a los que se les midió la concentración ribosomal por espectrofotometría de absorción a 260 nm.

Preparación de extractos bacterianos y distintas fracciones subcelulares por molienda.

Cultivos bacterianos en crecimiento logarítmico se cosecharon por enfriamiento lento; las células se sedimentaron por centrifugación a 3,500 xg y se lavaron una vez con buffer 10mM Tris-HCl pH7,8-,60mM NH₄Cl, 5mM acetato de magnesio y 6mM mercaptoetanol (buffer de molienda). Todas las operaciones se realizaron a 0-4 °C. La ruptura celular se hizo mecánicamente, moliendo las bacterias durante 5 períodos de 1 minuto cada uno con el

doble de su peso de alúmina, y resuspendiendo la mezcla con buffer de molienda (3 a 4 ml/gramo de peso húmedo de bacterias). Luego se centrifugó a 20.000xg durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante al que se le agregó DNAsa (3µg/ml), dejando en reposo por 5 minutos. Se centrifugó nuevamente a 30.000xg durante 20 minutos con lo que se obtuvo la fracción sobrenadante llamada (S-30). El sobrenadante (S-30) se sometió a una diálisis durante 5 horas contra 1000 volúmenes de buffer de molienda.

Los sobrenadantes (S-150) se obtuvieron a partir de los (S-30) dializados sometiénolos a una centrifugación a 150.000xg durante 240 minutos. El sobrenadante se recogió en dos fracciones: una correspondiente a los $\frac{2}{3}$ superiores y la otra al $\frac{1}{3}$ inferior. El sedimento que contiene los ribosomas se resuspendió cuidadosamente en 0,2 ml de buffer de molienda.

Las fracciones S-30, S-150 y los ribosomas resuspendidos se conservaron congelados a -70°C. De esta manera se mantienen activos durante por lo menos varias semanas.

Análisis de la distribución ribosomal

Gradientes analíticos

Los extractos celulares obtenidos por los métodos de lisis o de molienda, se analizaron por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa de 15 a 40% (P/V) en buffer Tris HCl, pH 7,8, 20 mM, acetato de magnesio 10mM, KCl 50mM. Se sembraron aproximadamente 0,6 UDO 260nm en un volumen total de 0,2ml de los extractos celulares sobre los gradientes de 4,6 ml y se centrifugó durante 90 minutos a 45.000rpm en un rotor Spinco SW 65. Los gradientes se analizaron por absorción a 254nm en un espectrofotómetro ultravioleta con celda de flujo continuo (ISCO);el contenido de los tubos de centrifuga se hace pasar por la celda inyectando sacarosa al 50% en el fondo del gradiente.

Para distinguir monómeros de terminación de los monosomas se usaron gradientes de sacarosa de 15 a 40% en una solución buffer de igual composición que la descrita anteriormente pero que contenía 60mM de NaCl en lugar de KCl.

Gradientes preparativos

Para obtener cantidades relativamente grandes de subunidades se utilizó gradientes lineales de 12 ml de sacarosa de 10 a 30% (sacarosa Mann libre de RNAsa) en un "buffer" similar al de molienda pero con 0,1 mM de acetato de magnesio. Se sembró 0,2 ml de una muestra que contenía aproximadamente 40 UDO 260nm de una suspensión de ribosomas previamente dializados durante 4 horas contra 1000 volúmenes de "buffer" de molienda con 0,1 mM de acetato de magnesio para lograr la disociación completa, y se centrifugó los gradientes a 35.000xg durante 360 minutos en un rotor SW-40 Spinco. Posteriormente los gradientes se fraccionaron por aspiración desde el fondo usándose para esto una bomba Desaga. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,3 ml que se analizaron midiendo su absorción a 260 nm.

Las fracciones correspondientes a cada subunidad se juntaron y se dializaron contra 1.000 volúmenes de "buffer" de molienda durante 24 horas y luego se guardaron a - 70 °C.

Todas las diálisis se efectuaron a 4 °C.

Análisis del RNA ribosomal.

Subunidades purificadas obtenidas de cultivos

bacterianos desarrollados en medios MMO y MMOP (0,3 UDO 260nm de partículas 50S o 0,2 UDO 260nm de 30S) se trataron con sodio dodecil sulfato (SDS) a concentración final de 2% y EDTA 15 mM, durante 3 minutos a 37 °C; de esta manera se puede liberar el RNA ribosomal (125). Las muestras se sembraron luego sobre gradientes lineales de sacarosa 15 a 40% en buffer Tris 1mM, acetato de magnesio 1mM y se centrifugaron 240 minutos a 45.000rpm en un rotor SW 50.1. Los gradientes se analizaron midiendo la absorción a 254 nm por pasaje a través de una celda de flujo continuo como ya se ha descrito.

Disociación de los ribosomas

Para estudiar el estado de los ribosomas a diferentes condiciones iónicas se analizaron los extractos celulares por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y se calculó el porcentaje de disociación en base a la relación de alturas o áreas de los picos correspondientes a las partículas 50S y 70S.

Unión de las poliaminas (espermidina ^{14}C) a los ribosomas

En estos experimentos se utilizó la técnica de equilibrio de diálisis, trabajando con tubos de diálisis Visking previamente lavados (120).

Muestras de 0,4ml que contenían 4 a 5 UDO 260nm de ribosomas en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 50mM KCl 5mM acetato de magnesio y 2mM mercaptoetanol se dializaron durante 24 horas a 4 °C contra 30ml del mismo buffer al que se había agregado espermidina ^{14}C (0,5 μCi) 1mM. La unión de la espermidina ^{14}C al ribosoma se determinó tomando muestras de 50 μl de la solución externa y del interior de la bolsa de diálisis (por triplicado), las que se contaron en un espectrómetro de centelleo líquido, previo agregado de agua (0,2ml) y 3 ml de solución de Bray.

La cantidad de poliamina unida se determinó a partir de la diferencia entre la radiactividad dentro y fuera de la bolsa de diálisis considerando que una unidad de densidad óptica a 260nm de ribosoma 70S equivale a 23 picomoles (122)

La determinación del RNA se hizo por el método del Orcinol (123) y la de proteínas por el de Lowry (124).

Síntesis de RNA y proteínas en células enteras

Un cultivo de Escherichia coli MA-261 previamente sometido a un ayuno de putrescina se centrifugó a 3.000xg durante 10 minutos a 15 °C.

El sedimento de células se resuspendió en medio MMO libre de leucina y se reinició el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una concentración de 10^8 células por ml .

Se tomaron alícuotas de 10ml que fueron incubadas en presencia o ausencia de putrescina, con el agregado correspondiente de precursores radiactivos.

Para los estudios de cinética de síntesis de RNA se añadió uracilo ^{14}C ($14\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{Ci/ml}$) y leucina $5\mu\text{M}$. Después de diferentes períodos de tiempo se tomaron muestras de 1ml y se precipitaron con ácido tricloroacético al 6% (concentración final) frío, dejando a 0 °C durante 30 minutos. El material insoluble se recuperó por filtración en millipore, lavándose varias veces con TCA frío al 5%. Los filtros millipore se secaron y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Previo agregado de una mezcla centelladora que tiene la siguiente composición: 4g de omnifluor en un litro de tolueno).

En la cinética de síntesis proteica se agregó Leucina ^{14}C (5 μM , 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) y se procedió como en el caso anterior, pero calentando durante 15 minutos a 90 $^{\circ}\text{C}$ después de la precipitación con TCA, con el fin de producir la hidrólisis de los aminoacil tRNA.

Transporte de uracilo y leucina

Cultivos bacterianos que fueron sometidos a un ayuno de poliaminas se incubaron en medio MMO o en medio MMOP que contenían 200 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina y (14 μM , 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) de uracilo ^{14}C para medir el transporte de uracilo.

Cultivos paralelos de estas bacterias también previamente ayunados se incubaron en medio MMO o en medio MMOP libres de leucina, con cloranfenicol (200 $\mu\text{g/ml}$ y leucina ^{14}C (5 μM , 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) para medir el transporte del aminoácido radiactivo. En todos los casos los precursores marcados se agregaron después de preincubar los cultivos durante 5 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ con los correspondientes antibióticos.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos y se filtraron inmediatamente por millipore, lavándose luego con 5 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente. Se secaron los filtros y se determinó la incorporación a las células totales en un contador de centelleo líquido.

Síntesis de polifenilalanina con ácido poliuridílico como RNA mensajero.

Para los experimentos en que se determinó la síntesis de polifenilalanina se utilizó una mezcla de reacción de 0,1 ml con la siguiente composición: buffer Tris-HCl pH 7,8 50 mM, ATP 1mM, GTP 0.02mM PEP 5mM, piruvato quinasa 3 µg, cloruro de amonio 70mM, 40 µg de RNA de transferencia, 0,05 µCi de fenilalanina ¹⁴C, 0.01mM, 50 µg de poli U, acetato de magnesio y S-30 en las cantidades indicadas para cada experiencia. El S-30 en algunos experimentos fue sustituido por ribosomas y S-150. En todos los casos antes de agregar el poli U, se preincubaron las mezclas de reacción a 37 °C durante 3 minutos. Después del agregado del RNAm sintético se continuó la incubación a 37 °C durante los tiempos indicados

para cada experimento. La reacción se detuvo por el agregado de TCA (concentración final 6%) frío, luego se calentó durante 15 minutos a 90 °C, se filtró a través de millipore y se lavó tres veces con TCA al 5% frío, y la radiactividad insoluble se determinó en un contador de centelleo líquido.

Formación de fenilalanil tRNA

Para medir la formación de fenilalanil tRNA, se usó una mezcla de reacción similar a la descrita anteriormente en la cual se omitió el poli U., determinándose la radiactividad insoluble en TCA al 6% frío.

Síntesis de proteínas "in vitro" usando como mensajero natural RNA del fago MS-2

La síntesis proteica con mensajero natural se realizó en una mezcla de reacción de 50 µl con la siguiente composición: buffer Tris HCl 50 mM, pH 7,8,

cloruro de amonio 60 mM, PEP 5mM, ATP 1mM, GTP 0,02 mM
piruvato quinasa 30 µg/ml 19 aminoácidos (0,025 mM)
de cada uno, 0,5 µCi de valina ¹⁴C (0,061 mM),
0,25 UDO 260 nm de RNA del fago MS-2 y 1 UDO 260 nm
de sobrenadante S-30 previamente preincubado como se
describe a continuación.

La preincubación se realizó de la siguiente
manera: 100 UDO 260 nm de fracción S-30 de cultivos bac-
terianos ayunados y desarrollados en medio MMO o MMOP se
incubaron a 34 °C durante 7 minutos con 0,02 volúmenes
de Tris-HCl 2M, pH 7,8 y 0,1 volumen de una mezcla de ener-
gía que contenía PEP 50mM, piruvatoquinasa 300 µg/ml,
ATP 10 mM y GTP 0,2 mM. Después de esta preincubación
se agregó 0,5 volúmenes de sobrenadante S-150 proveniente
de un cultivo bacteriano desarrollado en presencia de po-
liamina. Las concentraciones de acetato de magnesio usa-
das fueron las indicadas para cada experimento. La reac-
ción de síntesis proteica se detuvo por el agregado de
TCA al 6% en frío, luego se calentó durante 15 minutos
a 90 °C, y se filtró a través de millipore lavándose 3
veces con TCA al 5% frío. La radiactividad insoluble se
determinó en un contador de centelleo líquido.

Formación del complejo de iniciación

La formación del complejo de iniciación se realizó en dos etapas; en la primera de ellas, cuya finalidad es la formación del formilmetionil ^3H tRNA se usó una mezcla de reacción de 50 μl cuya composición es la siguiente: Tris-acetato 100mM, pH 7,2, ATP 3mM, acetato de magnesio 10mM, KCl 10 mM, tRNA de Escherichia coli 0,16 mg, leucovorina 5 μg , sobrenadante S-150 (obtenido de cultivos en medio MMOP) equivalente a 0,26 mg de proteína y 4 μM de metionina ^3H (2 μCi) . Esta mezcla se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, luego se enfrió a 0 $^{\circ}$ y se agregó una mezcla de 50 μl que contenía 1 UDO 260 nm de sobrenadante S-30 (proveniente de cultivos bacterianos ayunados y desarrollados en medio MMO o MMOP) preincubado como se describió para la síntesis proteica con mensajero natural, cloruro de amonio 100 mM, acetato de magnesio 8 mM, GTP 0,2 mM y 0,1 UDO 260 nm del trinucleótido AUG.

Después de incubar a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, se detuvo la reacción por el agregado en frío de 3 ml de buffer Tris-acetato 100mM, pH 7,2, acetato de amonio 50 mM y

acetato de magnesio 20 mM. Posteriormente se filtró a través de millipore, se lavó tres veces con el buffer anterior y se determinó la radiactividad fijada al millipore en un contador de centelleo líquido.

Formación del complejo de iniciación a partir de formil metionil ^{14}C tRNA purificado.

Para la formación del complejo de iniciación a partir de formil metionil ^{14}C tRNA purificado se utilizó una mezcla de reacción de 0,1 ml que contenía los siguientes reactivos: acetato de magnesio 6mM, buffer Tris-HCl 40mM, pH 7,2, cloruro de amonio 50 mM, GTP 0,2mM, AUG 0,1 UDO 260 nm, 2.200 cpm de ^{14}C formil metionil tRNA (55cpm/p.mol) y ribosomas en las cantidades indicadas para cada experimento. Se incubó a 24 °C por 20 minutos y la reacción se detuvo por el agregado en frío de 1ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,2, acetato de magnesio 20mM, KCl 50 mM, procediéndose luego como en el caso anterior.

RESULTADOS

Requerimientos de putrescina para el crecimiento normal de cultivos de Escherichia coli MA-261 previamente sometidos a un ayuno de poliaminas.

Varios investigadores han demostrado, trabajando con diferentes cepas auxótrofas para poliaminas, que en las bacterias sometidas a un ayuno de estas sustancias los niveles intracelulares de putrescina se encontraban disminuídos 100 veces, mientras que los de espermidina se reducían a la mitad (119). En estas condiciones las bacterias dependen del agregado exógeno de poliaminas para crecer normalmente. La cepa MA-261 de Escherichia coli posee un comportamiento similar y por lo tanto el agregado de putrescina al medio de cultivo provoca, después de un período de 60 minutos, un incremento en la velocidad de crecimiento de dicha bacteria. Fig. 1.

El tiempo de generación en varios experimentos fué de 180 a 300 minutos en cultivos en ausencia de putrescina (MMO), mientras que en presencia de esta sustancia fué de 60 a 90 minutos.

Cuando los cultivos de esta misma cepa bacteriana previamente sometidos a un ayuno de poliaminas se desarrollaron en el medio MMO suplementado con putrescina (MMOP), espermidina, espermina o Mg, se obtuvieron las curvas de crecimiento que muestra la Fig. 2. Se puede observar que el tiempo de generación mínimo se obtiene con putrescina y le siguen en orden creciente los correspondientes a medios de cultivo con espermidina, espermina, y magnesio.

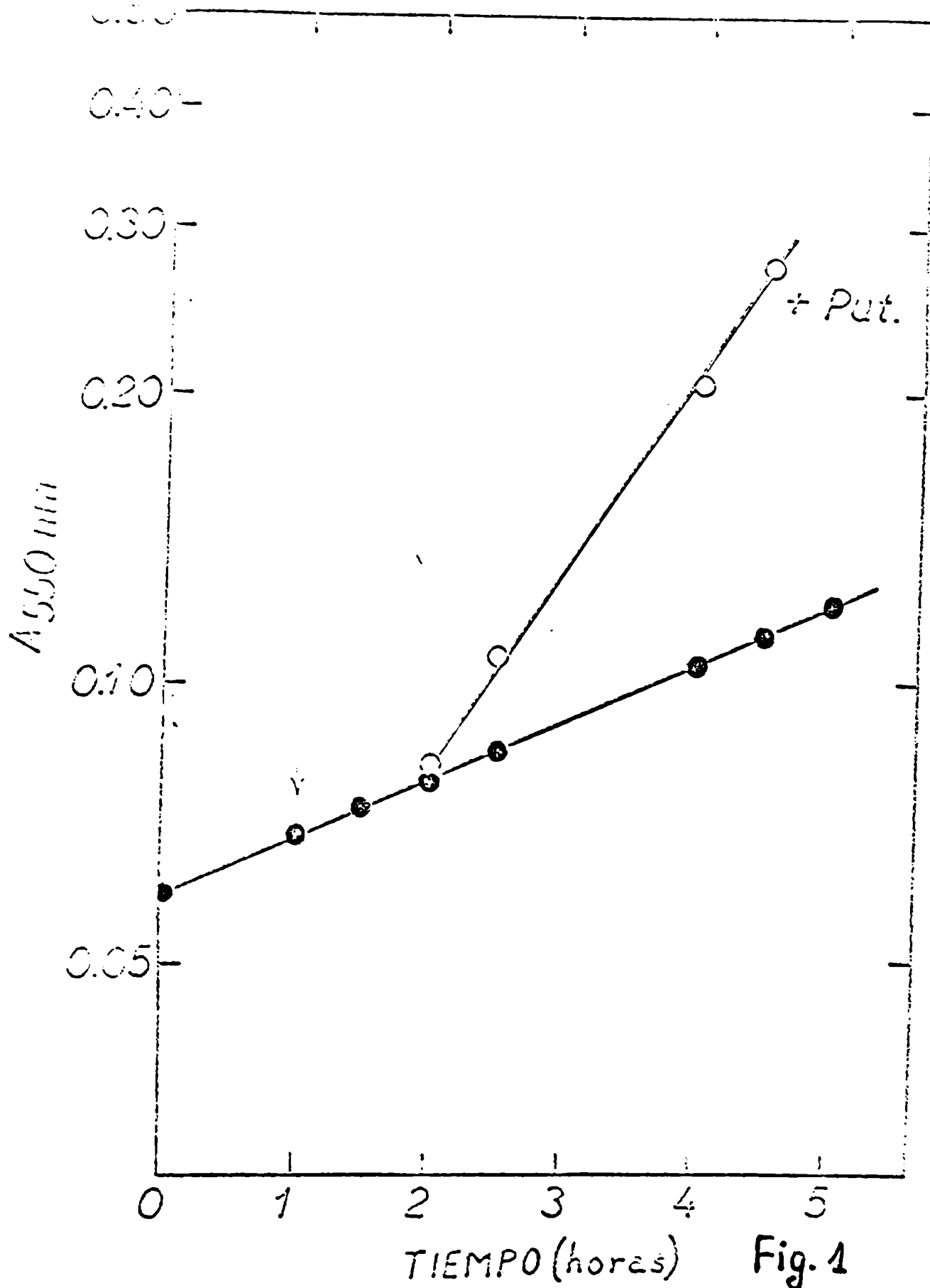


Figura 1.- Efecto de la adición de putrescina sobre el crecimiento de *Escherichia coli* PA 251.- Las células sometidas al ayuno de poliaminas se incubaron a 37°C en medio MMO. Después de 1 hora se separó una alícuota del cultivo que fue suplementada con putrescina (100 $\mu\text{g/ml.}$) y ambas fracciones se incubaron nuevamente. Absorción óptica a 550 nm en medio MMO, ●, y en medio MMCP, ○.

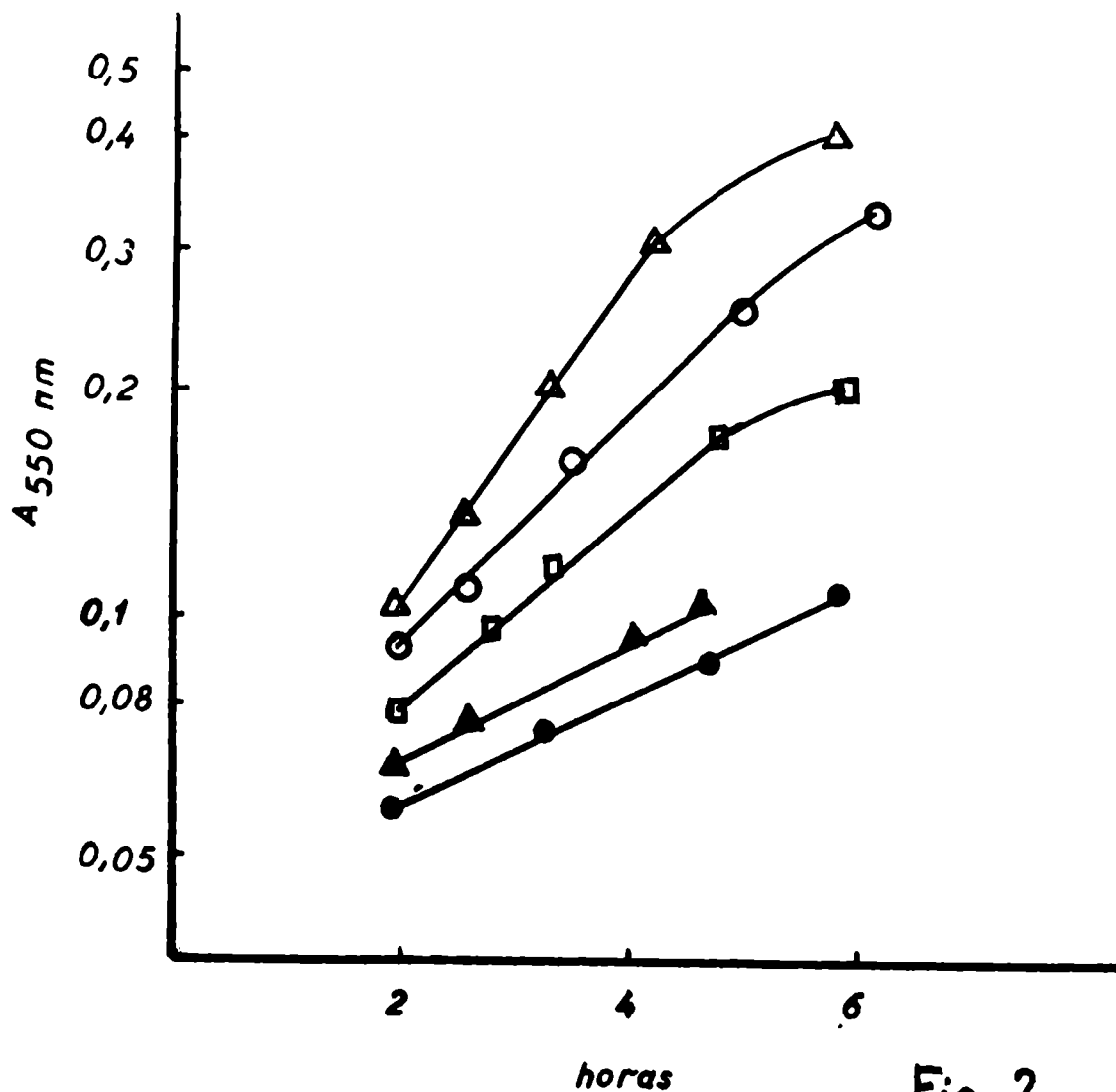


Fig. 2

Fig. 2.- Efecto del agregado de varias poliaminas o Mg^{++} sobre el crecimiento de *E.coli* MA-261. Células sometidas a un ayuno de poliamina, se incubaron a $37^{\circ} C$ en presencia de 8 mM (concentración final) de Mg^{++} o 0,8 mM (concentración final) de la poliamina indicada en cada caso Δ Medio MM0 + putrescina, tiempo de duplicación 90 minutos; \circ Medio MM0 + espermidina, tiempo de duplicación 132 minutos; \square Medio MM0 + espermina, tiempo de duplicación 150 minutos; \blacktriangle Medio MM0 + Mg^{++} , tiempo de duplicación 245 minutos; \bullet Medio MM0, tiempo de duplicación 250 minutos. El crecimiento bacteriano se midió por absorción óptica a 550 nm.

Efecto del agregado de putrescina sobre la distribución intracelular de los ribosomas

Se ha demostrado que las poliaminas desempeñan funciones muy importantes en el metabolismo celular (5 - 19). En experimentos "in vitro" se encontró la propiedad de estas sustancias de disminuir los niveles óptimos de magnesio para la síntesis de proteínas (59), que en algunos casos era netamente estimulada (126).

Las poliaminas son capaces de producir "in vitro" la asociación de las subunidades ribosomales (105). Por otra parte se sabe que se encuentran formando parte del factor de asociación aislado en Bacillus stearothermophilus (86).

Estos descubrimientos nos llevaron a estudiar el efecto sobre la distribución intracelular de los monómeros 70 S y las subunidades ribosomales del agregado de putrescina a cultivos previamente ayunados. En estas experiencias los cultivos bacterianos ayunados se desarrollaron durante varias horas en medio MMO; luego se tomó una alícuota que corresponde a la mitad del cultivo original y se la suplementó con putrescina; ambos cultivos

se continuaron incubando durante 30 minutos. Posteriormente las células se cosecharon enfriando lentamente y los lisados bacterianos obtenidos se analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa; la Fig.3A muestra el perfil ribosomal de los cultivos desarrollados en ausencia de putrescina (MMO); en estos casos se observa un desplazamiento del equilibrio ribosomal a favor de las subunidades, con una disminución apreciable del pico correspondiente al monómero 70 S y un aumento del pico correspondiente a la subunidad 50 S. El pico de partículas 30 S aparece ligeramente disminuido y algo difuso, lo cual puede indicar que durante el ayuno de putrescina los mecanismos de síntesis y/o ensamblado de la subunidad pequeña están dañados. La Fig. 3 B corresponde a un cultivo sometido a un ayuno y luego desarrollado durante 30 minutos en presencia de putrescina.

En este caso se produce un rápido cambio en la distribución ribosomal, desplazando el equilibrio a favor del monómero, con la consiguiente disminución de los picos de subunidades. Además se normaliza el perfil correspondiente al pico de la subunidad pequeña.

Si tomamos como parámetro el área de los

picos 50 S y 70 S, la relación 70 S/ 50 S en la Fig. 3A (medio MMO) es de 1,54, mientras que en la Fig. 3B (medio MMOP) es de 2,89. El contenido total de ribosomas observado en los gradientes correspondientes a células ayunadas (MMO), es menor que para células cultivadas en medio MMOP, pero se compensa por una mayor absorción a 260 nm del sobrenadante (dato no mostrado en las figuras) .

Cuando dos cultivos desarrollados en la misma forma que los descritos para los experimentos anteriores, se cosecharon por enfriamiento rápido en presencia de cloranfenicol, tratamiento que provoca la detención de la síntesis proteica con la conservación de los poli-ribosomas, se encontró un número mayor de polisomas en lisados celulares provenientes de cultivos desarrollados en presencia de putrescina (MMOP), manteniéndose una relación monómero/subunidades semejante a la observada en la (Fig. 3); (Fig. 4A y B).

Los perfiles obtenidos en la Fig. 3 indican un efecto directo de las poliaminas sobre la distribución "in vivo" de las diferentes partículas ribosomales. Estas diferencias observadas en los perfiles de la Fig. 3 podrían deberse a alguno de los siguientes artificios:

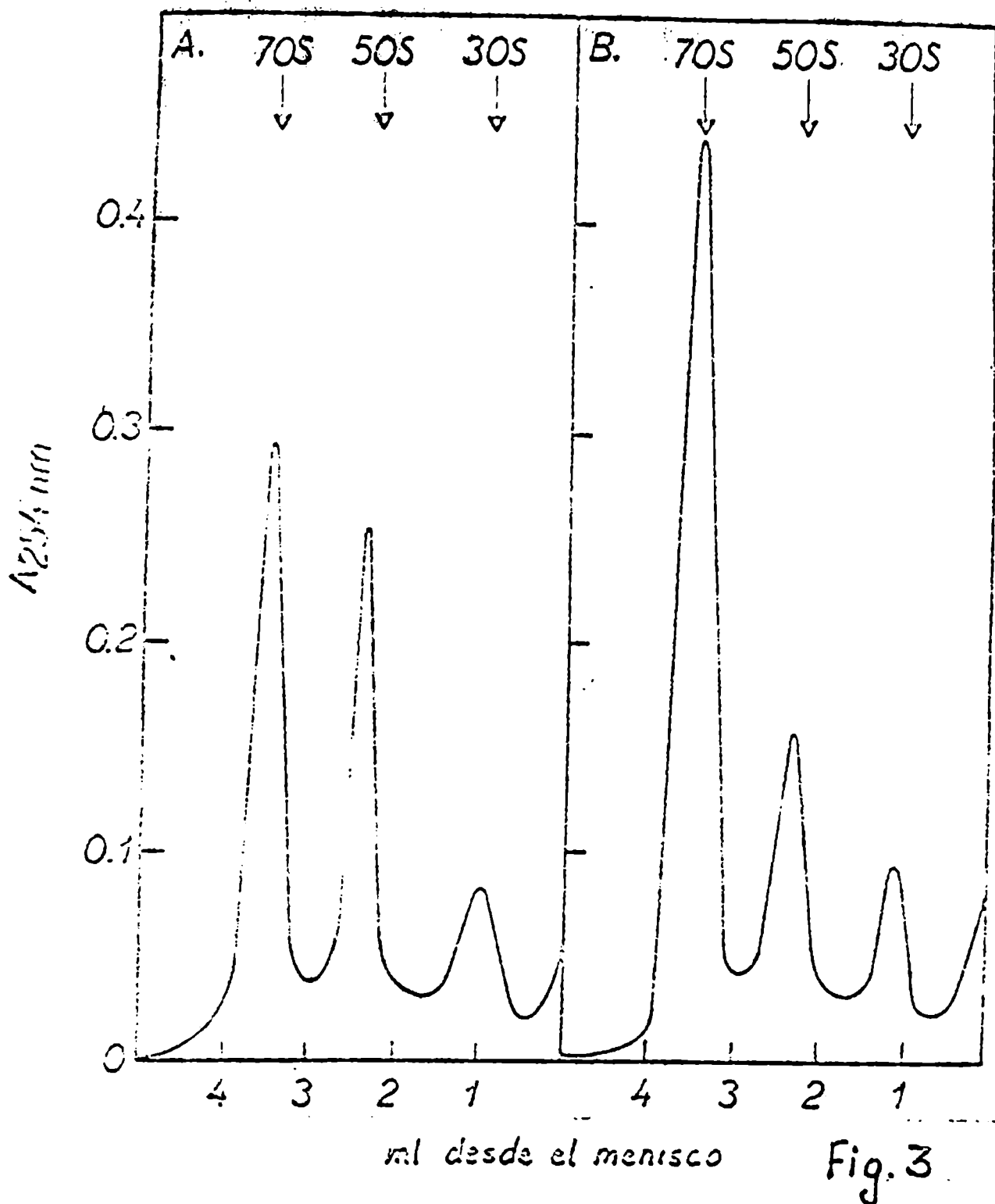


Figura 3.- Efecto de las poliaminas sobre el perfil ribosomal.-

Después de cosechar las bacterias se lisaron según se ha descrito en materiales y métodos. Los extractos celulares se analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa. A, es el perfil ribosomal correspondiente a un lisado preparado a partir de bacterias cultivadas en medio MMO y B, corresponde a células que han crecido en medio MMO al que se agregó putrescina durante los últimos 30 minutos de la incubación.

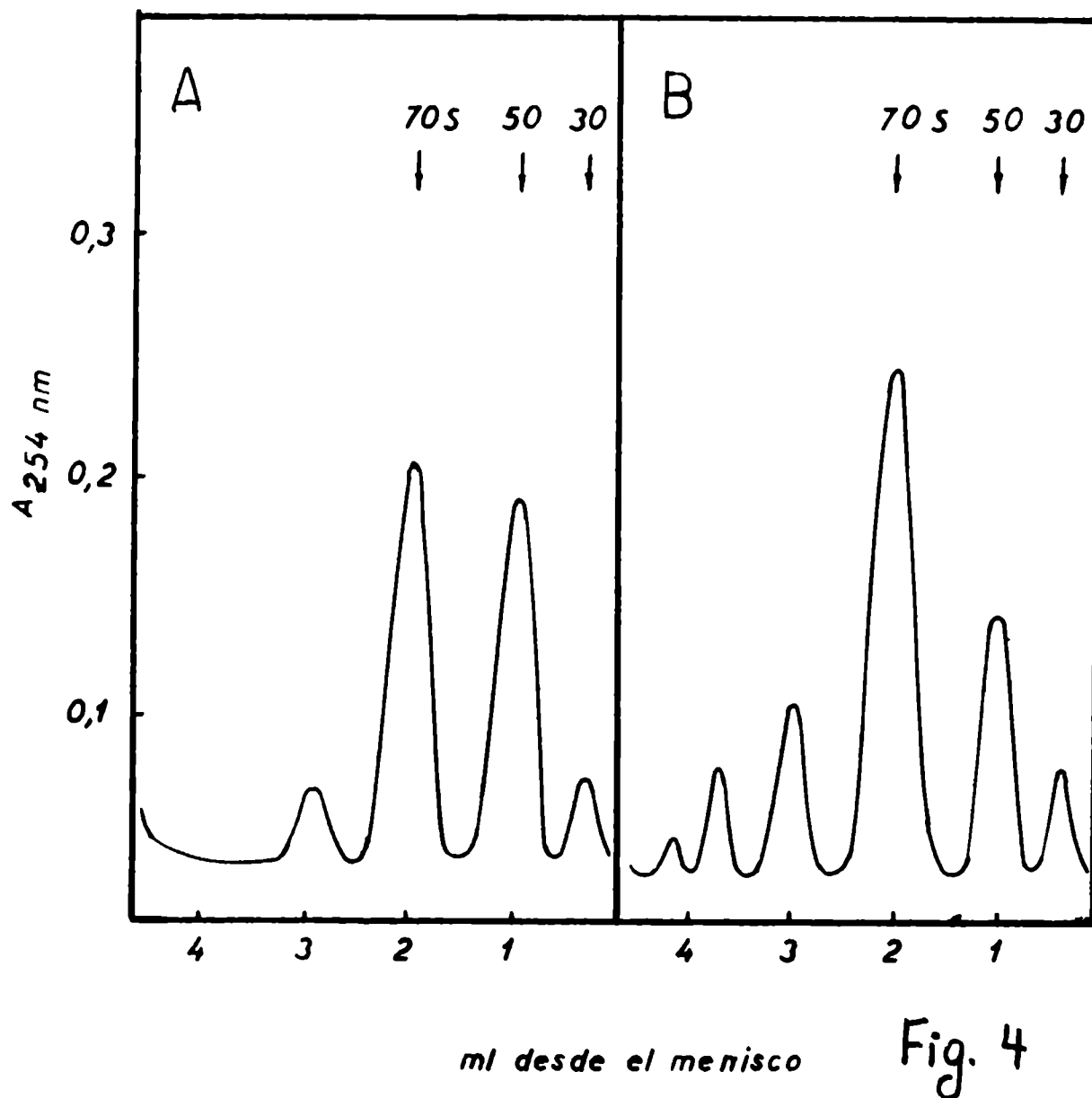


Fig. 4.- Efecto del agregado de putrescina sobre la distribución intracelular de polisomas. Después de cosechar las células por enfriamiento rápido en presencia de cloranfenicol, las células bacterianas se lisaron según se ha descrito en materiales y métodos. Los extractos celulares se analizaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. A es el perfil ribosomal correspondiente a un lisado preparado a partir de bacterias cultivadas en medio MMO; B corresponde a células ayunadas que se han desarrollado en medio MMCP durante 3 horas.

- I) La sensibilidad de las bacterias cultivadas en medios MMO o MMOP frente al método de lisis puede ser muy distinta, determinando una diferencia de extracción tanto de los monómeros como de las subunidades ribosomales en ambos tipos de bacterias.

- II) Tanto los monómeros de terminación como los monosomas aparecen en el mismo pico del perfil ribosomal. Si el contenido de ambos tipos de partículas fuera diferente en los lisados provenientes de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina, esto podría explicar las distintas distribuciones de ribosomas en ambos extractos.

- III) La dimerización de las subunidades 30 S da lugar a partículas con coeficiente de sedimentación de 50 S. Por lo tanto los diferentes perfiles en los extractos de los cultivos en presencia o ausencia de putrescina se pueden deber a una distinta dimerización de las subunidades 30 S en ambos lisados, que produciría contaminaciones de distinto grado en los picos correspondientes a partículas 50 S.

Para descartar la primera posibilidad se realizaron estudios cuantitativos del RNA total extraído de bacterias desarrolladas en presencia o ausencia de poliamina. Se encontró que en ambos casos se podía extraer entre un 80 a 90 % del RNA total. Dado que la mayoría del RNA celular corresponde al RNA ribosomal, la diferencia observada en la Fig. 3 no puede ser atribuida a una extracción selectiva de las subunidades o monómeros ribosomales.

El antibiótico trimetoprim inhibe la síntesis proteica a nivel de la iniciación (121) produciendo la acumulación de monómeros de terminación. Cuando los cultivos bacterianos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina se cosechan luego de estar en contacto con trimetoprim durante 15 minutos, se observa que los perfiles ribosomales de células así tratadas, no se diferencian de los correspondientes a extractos bacterianos cosechados por el método de enfriamiento lento (Fig.3); este hecho nos indicaría que la mayoría de los monómeros encontrados en ambos casos corresponden a partículas de terminación. Se ha demostrado que es posible distinguir los monómeros de terminación de los monosomas cuando se usan gradientes de sacarosa en los cuales el K^+ se susti-

tuye por Na^+ (127). Al realizar los análisis en gradientes de Na^+ (Fig. 5) se encontró que el porcentaje de los ribosomas de terminación en el pico de 70 S era de un 82 % para los lisados provenientes de cultivos ayunados y de 87 % para los que se habían desarrollado en presencia de putrescina. Estos hechos apoyan la idea de que la diferencia de perfiles de la Fig. 3 no se debe a diferentes tipos de monómeros 70 S.

El análisis de las subunidades purificadas a partir de extractos bacterianos procedentes de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de poliamina nos permitió estudiar detalladamente una posible contaminación de la subunidad ribosomal 50 S con dímeros de 30 S. Se realizó un análisis de estas subunidades purificadas en gradientes de sacarosa y se encontró que en ambos casos (células cultivadas con o sin putrescina) las subunidades 50 S poseían un 95 % de pureza, aún después de ser incubadas a 55 °C durante 5 minutos en presencia de 2 mM ditiotreitolo que es un tratamiento que produce la disociación de los dímeros de 30 S. (M. García Patrone, dato no publicado). Para confirmar estos resultados se sometieron ambos tipos de subunidades 50 S a un tratamiento con SDS al 2 % de concentración final, con lo que se

produce la liberación del RNA correspondiente a cada partícula; posteriormente se analizaron por centrifugación en gradientes los RNA obtenidos y se encontró que en ambos casos la subunidad 50 S presentaba un pico de RNA de 23 S acompañado por otro más pequeño de 16 S.

La aparición de este pico de RNA de 16 S se podría explicar por la actividad de endonucleasas presente en la subunidad 50 S (128). Por otro lado aunque este pico de RNA de 16 S tenga su origen en una contaminación por dímeros de 30 S, el hecho de que ambos tipos de subunidades 50 S (provenientes de cultivos ayunados o no) posean la misma cantidad de RNA 16 S sugiere que aún en el caso de una contaminación por dímeros, ésta no alteraría el perfil ribosomal que se observa en la Fig. 3 A y B .

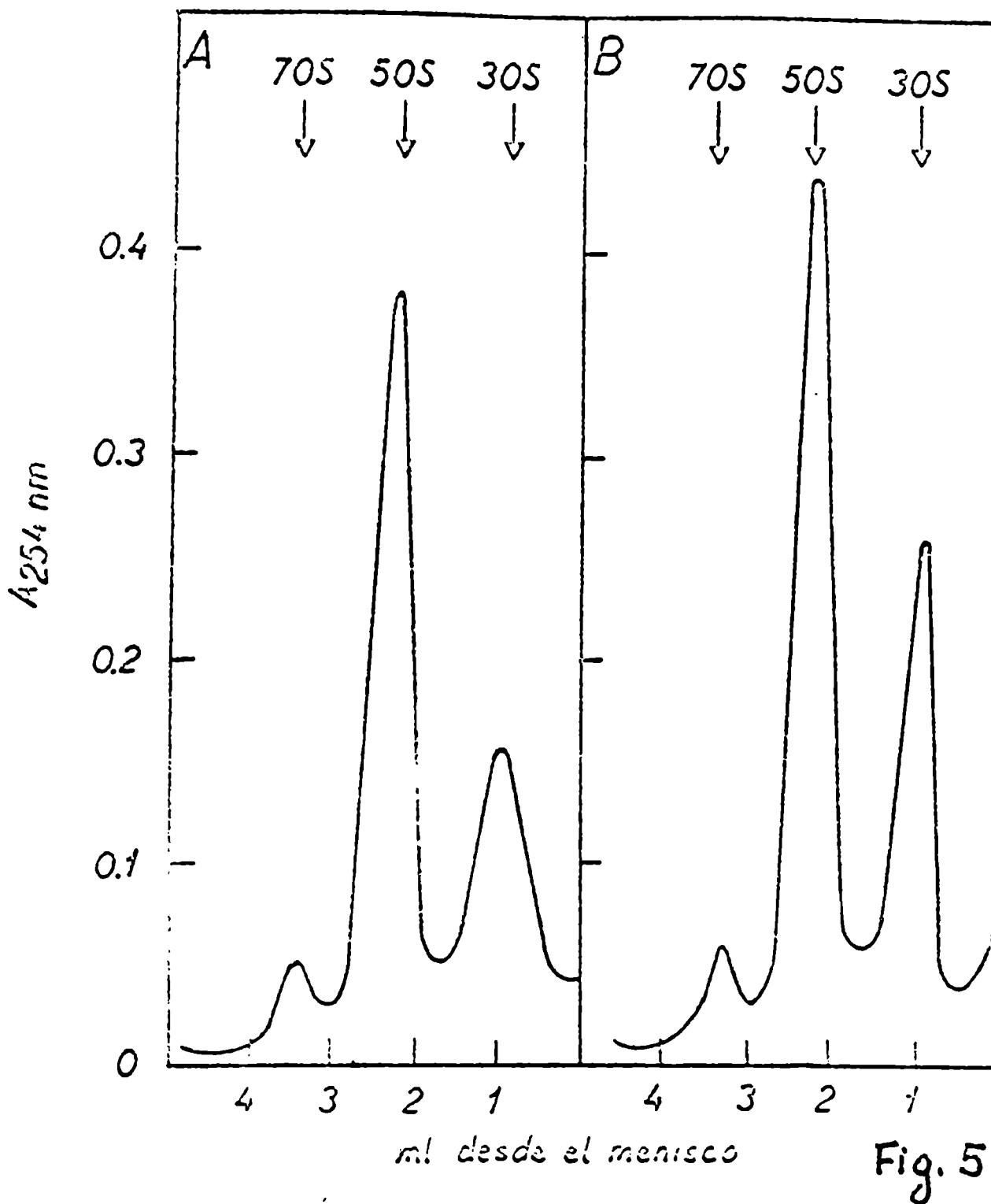


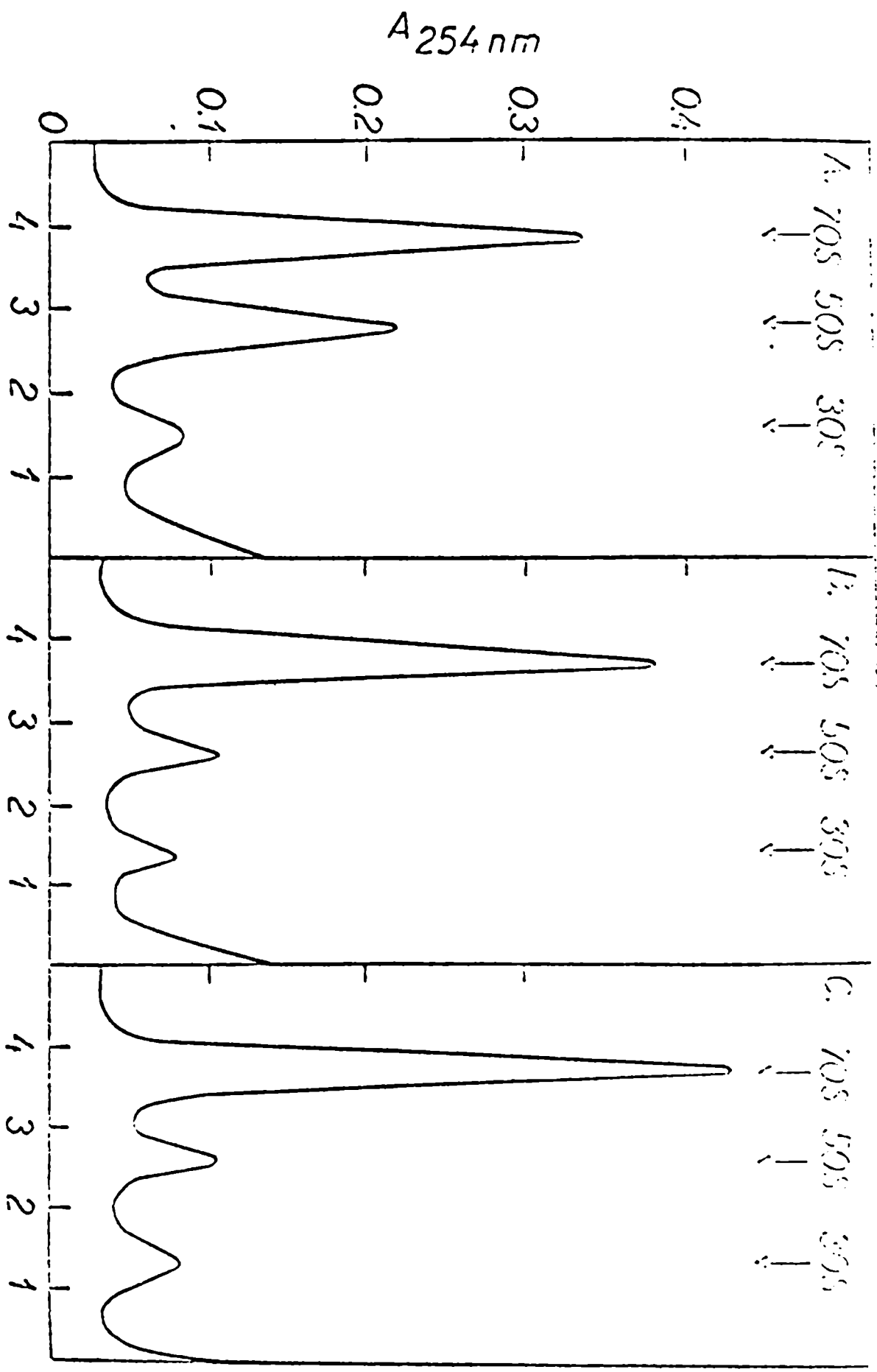
Fig. 5.- Efecto del agregado de poliamina sobre los perfiles ribosomales
obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa que contienen iones Na^+ .
 Las células bacterianas se lisaron y se analizaron como se ha descrito en ma-
 teriales y métodos. A: corresponde a un perfil ribosomal de cultivos desarro-
 llados en medio MMG. B: corresponde a los perfiles obtenidos de células ayu-
 dadas y luego cultivadas por 30 minutos en medio MMGP.

Especificidad del efecto de la poliamina sobre la distribución de ribosomas.

Se investigó si los perfiles ribosomales de los cultivos desarrollados en medio MMO eran característicos de la falta de poliamina o podrían obtenerse por el ayuno de otras sustancias tales como glucosa o fuentes de nitrógeno.

En estos experimentos los cultivos desarrollados en presencia de putrescina se lavaron varias veces con medio MMOP sin glucosa, y luego se volvieron a incubar a 37 °C durante 30 minutos en medio MMOP sin glucosa. Los lisados obtenidos a partir de estas células presentaban un perfil similar al de los correspondientes al medio MMOP completo (Fig. 6B y 6C). Un cultivo paralelo desarrollado en ausencia de poliamina (MMO), dió una distribución ribosomal característica de la ausencia de esta sustancia (Fig. 6A). Iguales resultados se obtuvieron cuando las bacterias se sometieron a un ayuno de nitrógeno.

Figura 6.- Especificidad del efecto de poliaminas sobre la distribución ribosomal. Los lisados de bacterias desarrolladas en distintas condiciones se analizaron como se indicó en materiales y métodos. Las bacterias fueron cultivadas en los siguientes medios: A, en MMO; B, en MMOP; C, en MMOP, pero las células se lavaron y reincubaron durante 30 minutos en el mismo medio libre de glucosa.



ml desde el menisco

Fig. 6

Disociación de los ribosomas

La sensibilidad a la disociación de los ribosomas obtenidos a partir de bacterias desarrolladas en presencia o ausencia de putrescina se estudió a concentraciones decrecientes de magnesio. En la Fig. 7 se puede observar que las partículas ribosomales provenientes de los cultivos en medio MMO están más disociadas que las obtenidas de bacterias desarrolladas en medio MMOP. Por otro lado, las curvas de disociación para ambos tipos de partícula son paralelas, indicando que los monómeros 70 S obtenidos de cultivos en presencia o ausencia de poliaminas poseen igual sensibilidad a la disociación por la disminución de los niveles de magnesio.

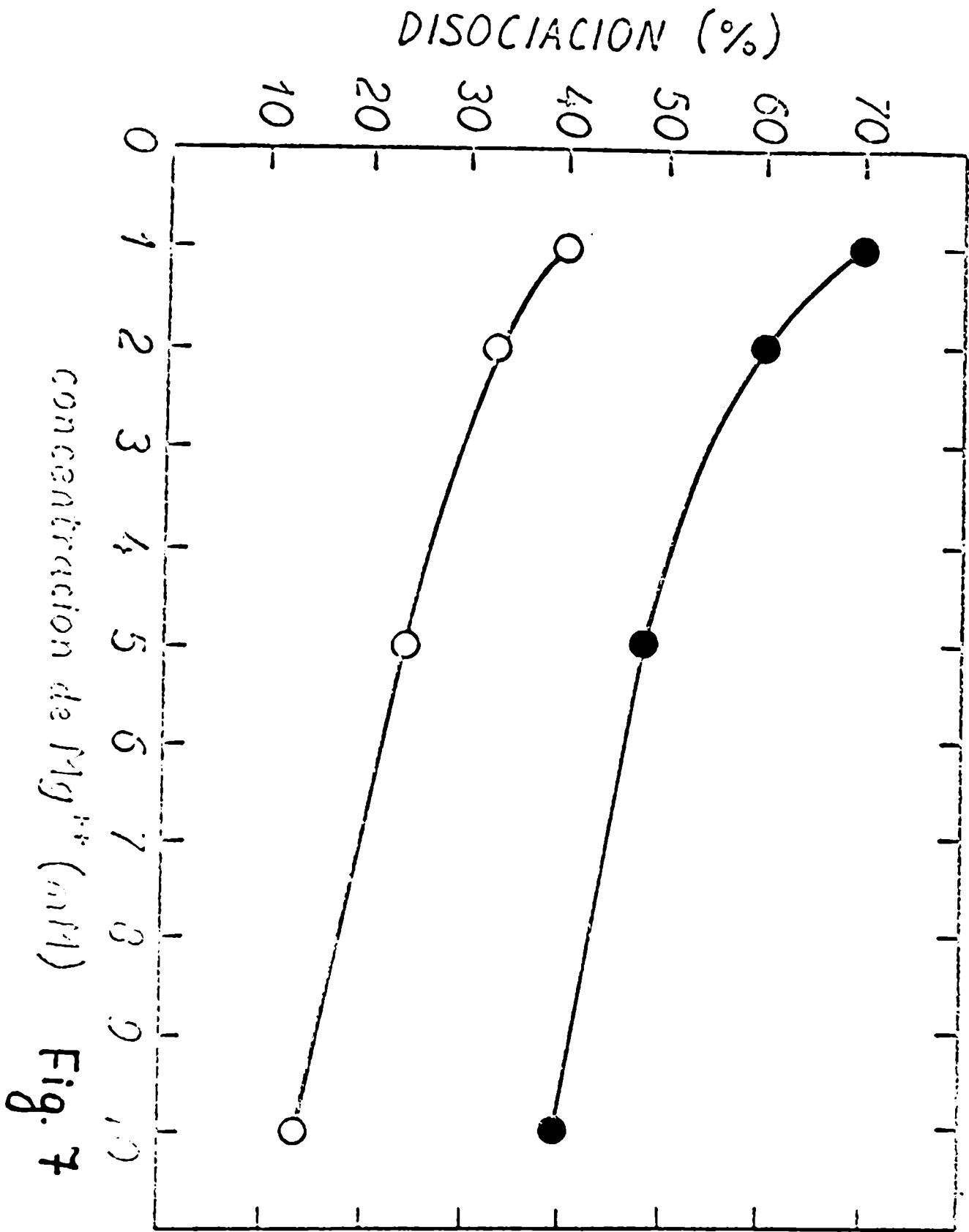


Figura 7.- Estabilidad de los ribosomas a diferentes concentraciones de Mg⁺⁺. Después de ajustar la concentración de Mg⁺⁺ a los niveles indicados, los extractos obtenidos a partir de bacterias cultivadas en medio MMQ (●) o MMQP (○) se analizaron y se calculó los respectivos porcentajes de disociación.

67

Unión de la espermidina al ribosoma y corrección del perfil ribosomal " in vitro ".

La unión de espermidina radiactiva a partículas ribosomales aisladas de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de poliamina se realizó por equilibrio de diálisis. El número de moléculas unidas resultó ser del mismo orden (920 ± 35 moléculas/ ribosoma) para ambos tipos de partículas ribosomales.

Después de una diálisis de 24 horas contra una solución que contenía espermidina 1 mM, las subunidades se asociaron parcialmente, especialmente en el caso de las provenientes de cultivos en medio MMO. De esta manera los perfiles ribosomales de las bacterias ayunadas o no tienden a igualarse (Fig. 8).

Además, después de la diálisis ambos tipos de partículas 70 S se vuelven más resistentes a la disminución de la concentración del magnesio (Fig. 9)

Figura 8.- Efecto de diálisis contra soluciones de espermidina sobre la distribución ribosomal. Las muestras se sometieron a equilibrio de diálisis procediendo como se ha descrito en materiales y métodos. A y B son los perfiles de los ribosomas de terminación en gradientes de sacarosa antes de diálisis, y C y D después de diálisis. A y C corresponden a las muestras preparadas con bacterias cultivadas en medio MMO y B y D a los extractos de células desarrolladas en medio MMOP.

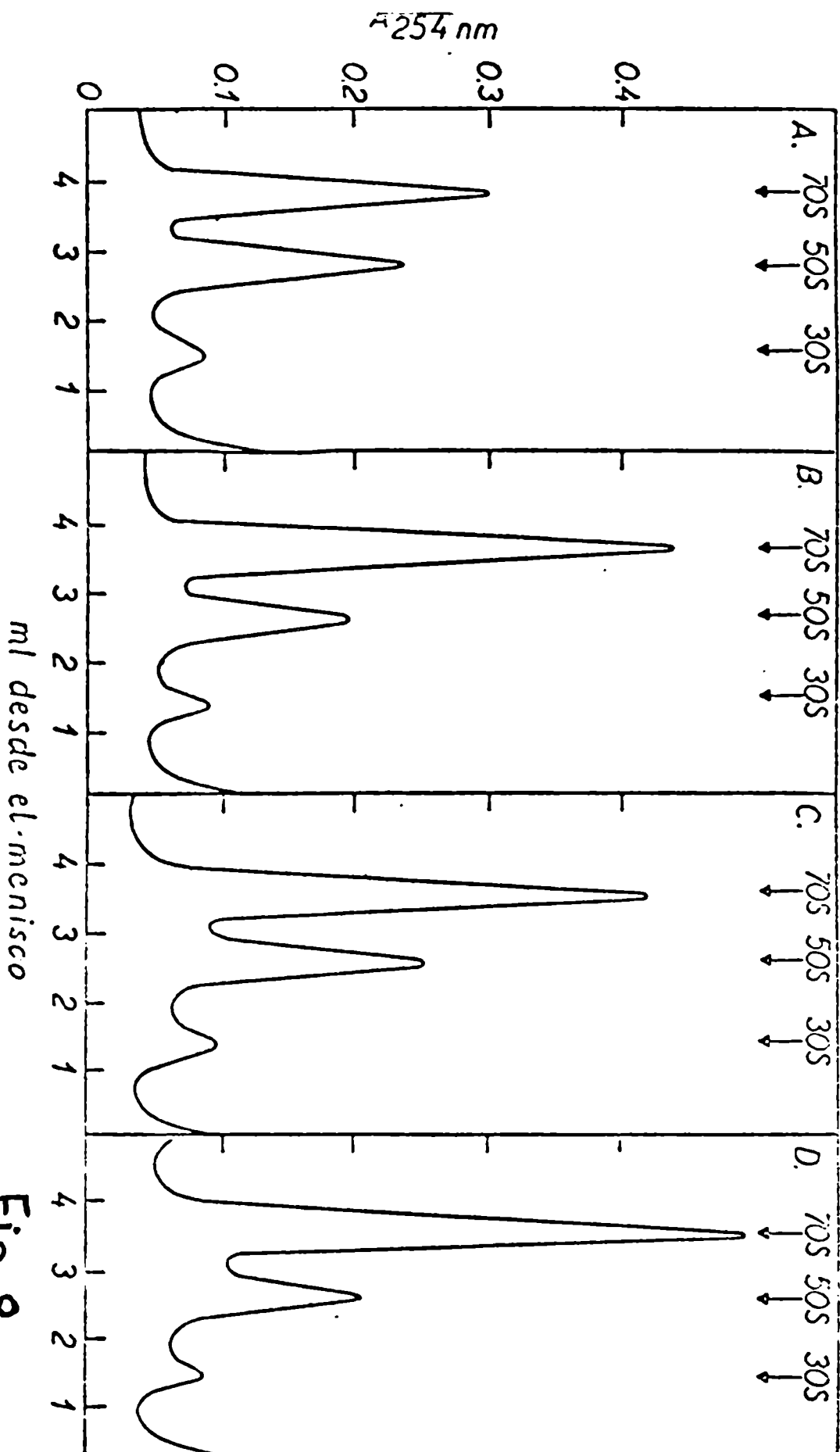


Fig. 8

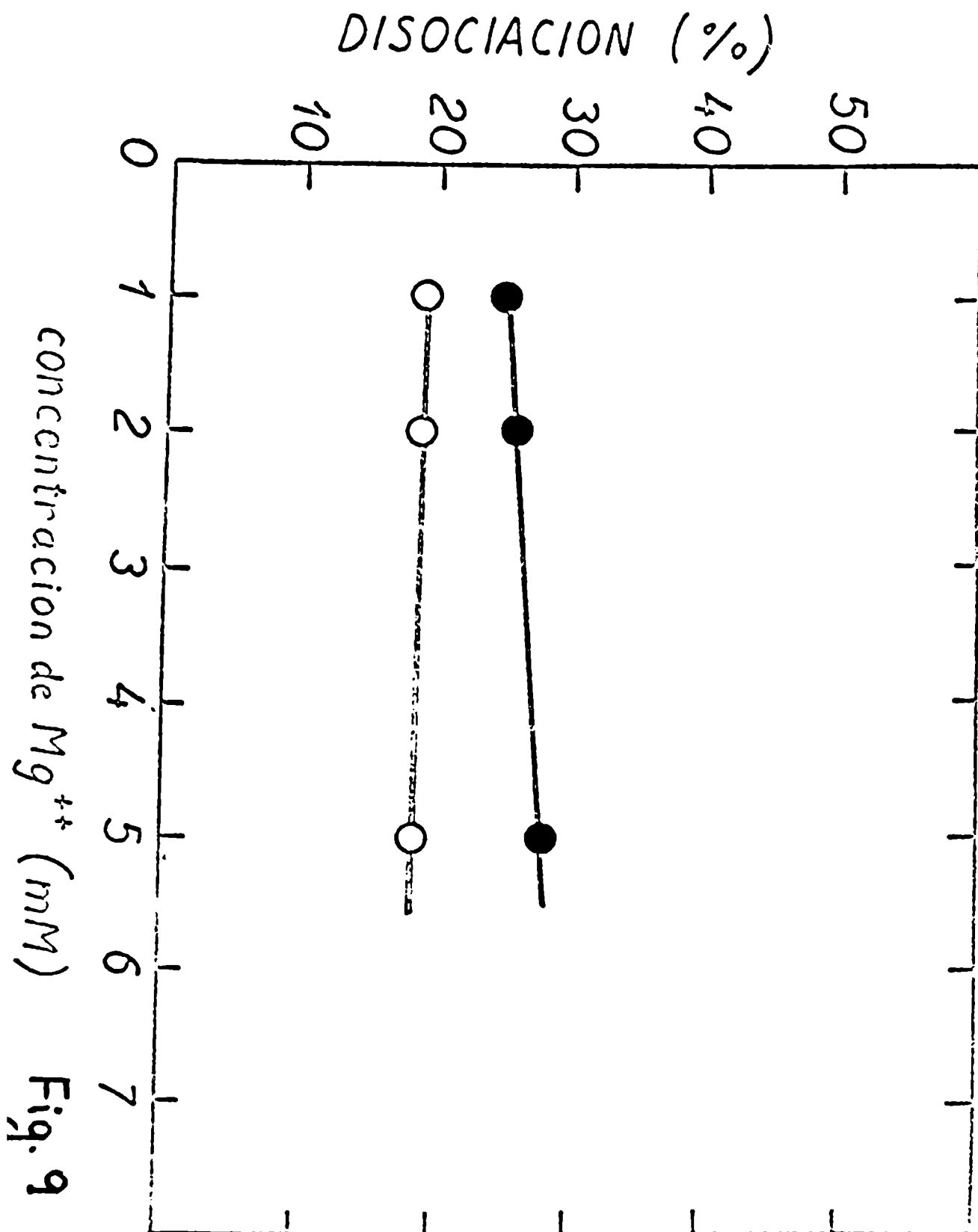


Figura 9.- Estabilidad de los ribosomas después de diálisis contra espermidina. Las muestras se sometieron a un equilibrio de diálisis contra espermidina 1mM luego se ajustó la concentración de Mg^{++} a distintos valores. Después de análisis por centrifugación en gradientes de sacarosa se determinaron los porcentajes de disociación. Los símbolos son los mismos usados en la Fig. 7.-

Síntesis " in vivo " de RNA y proteínas

Se estudió las cinéticas de síntesis de RNA y proteínas en cultivos bacterianos desarrollados en medio MMO y MMOP , a los cuales se agregó los precursores radiactivos respectivos (uracilo o leucina).

En la Fig. 10 A correspondiente a la cinética de síntesis de RNA, se puede observar un incremento de dicha síntesis para ambos cultivos. Aunque la síntesis del RNA fue mayor a tiempos largos en las bacterias desarrolladas en presencia de putrescina, el agregado de esta sustancia provocó en los cultivos bacterianos un retardo de la síntesis de RNA durante los primeros 30 minutos.

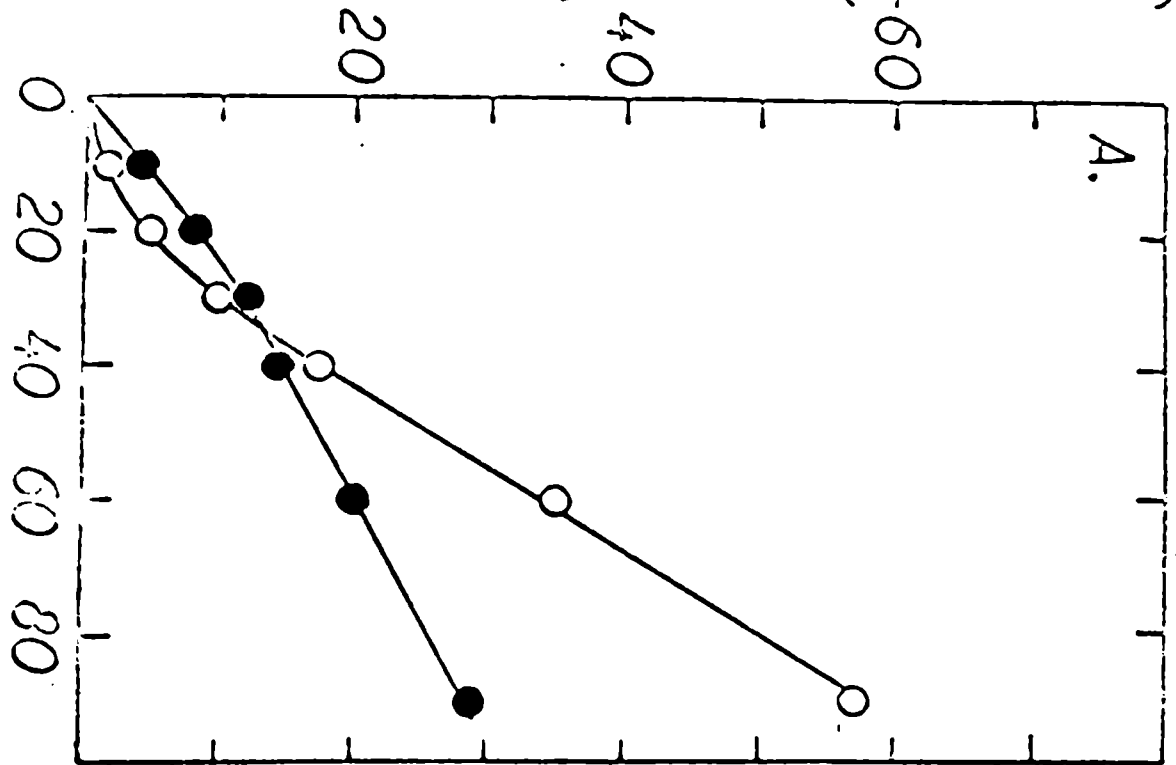
En los cultivos desarrollados en MMO no se observó este efecto.

La cinética de síntesis proteica muestra un comportamiento diferente a la del RNA; en estos casos Fig. 10 B) el agregado de la putrescina produce un incremento inmediato en la síntesis proteica.

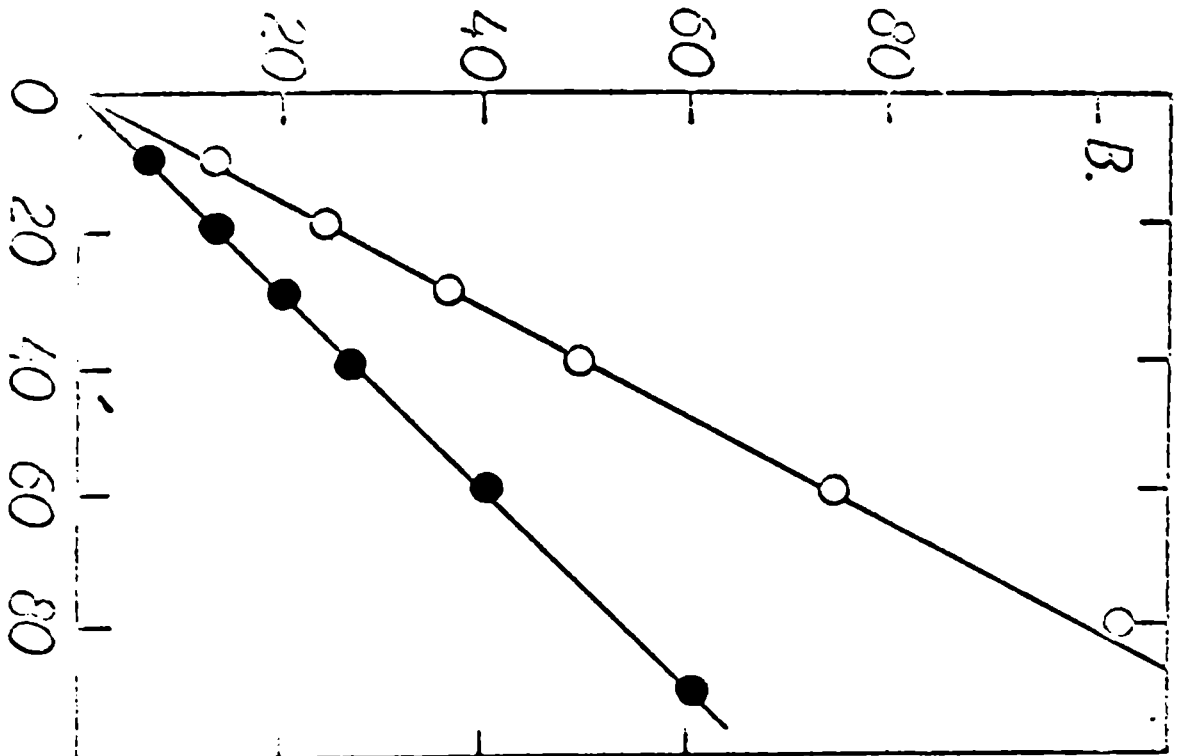
Estos resultados sugieren un efecto independiente de las poliaminas sobre el proceso de la

Figura 10.- Efecto del agregado de putrescina sobre la síntesis de RNA y proteínas en bacterias ayunadas. El procedimiento experimental se ha indicado en materiales y métodos. A , cinética de la síntesis de RNA; B, cinética de la síntesis proteica. ● y ○ , incorporaciones en células cultivadas en medio MM0 y MMOP, respectivamente.

incorporación de [¹⁴C]Uracilo (cpm x 10⁻³)



incorporación de [¹⁴C]Leucina (cpm x 10⁻³)

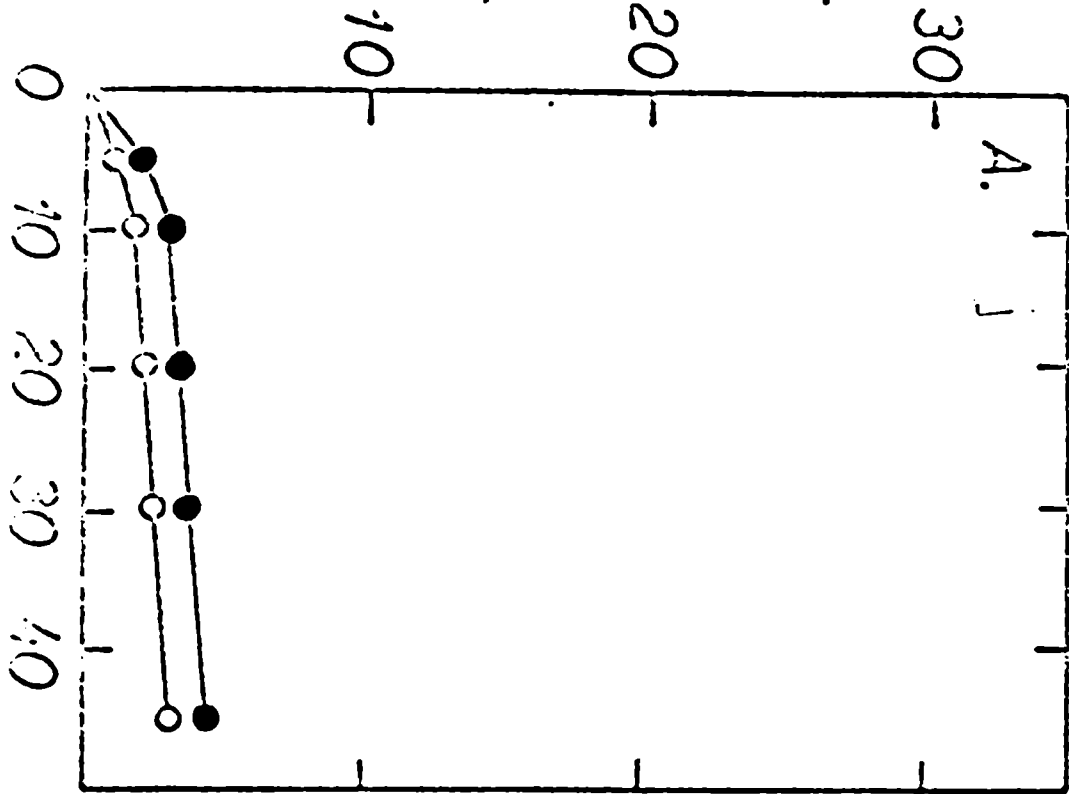


Tiempo (min)
Fig. 10

traducción. Para confirmar estos resultados se estudiaron las cinéticas de síntesis de RNA y proteínas en presencia de rifampicina (100 µg/ml). Este antibiótico produce la inhibición de la síntesis del RNA. En estas condiciones de trabajo se pudo observar que mientras los niveles de RNA se encuentran inhibidos en más de un 90 % para ambos cultivos (Fig. 11 A) la síntesis de proteínas disminuye solamente entre 10 a 30 % (Fig. 11 B).

Además, el agregado de putrescina al medio de cultivo provoca el inmediato incremento de la síntesis proteica. El período que transcurre antes de la detención de la síntesis proteica en presencia de rifampicina es relativamente largo (30 minutos); esto nos podría indicar una demora de acción de la droga o que la cepa es poco sensible al antibiótico. Aun así, se debe señalar que el grado de inhibición de la incorporación del uracilo a las células bacterianas producido por el antibiótico, es mayor en los cultivos que fueron suplementados con la putrescina, mientras que en el mismo caso (MMOP) la síntesis proteica es marcadamente superior.

incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Uracilo ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)



incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Leucina ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)

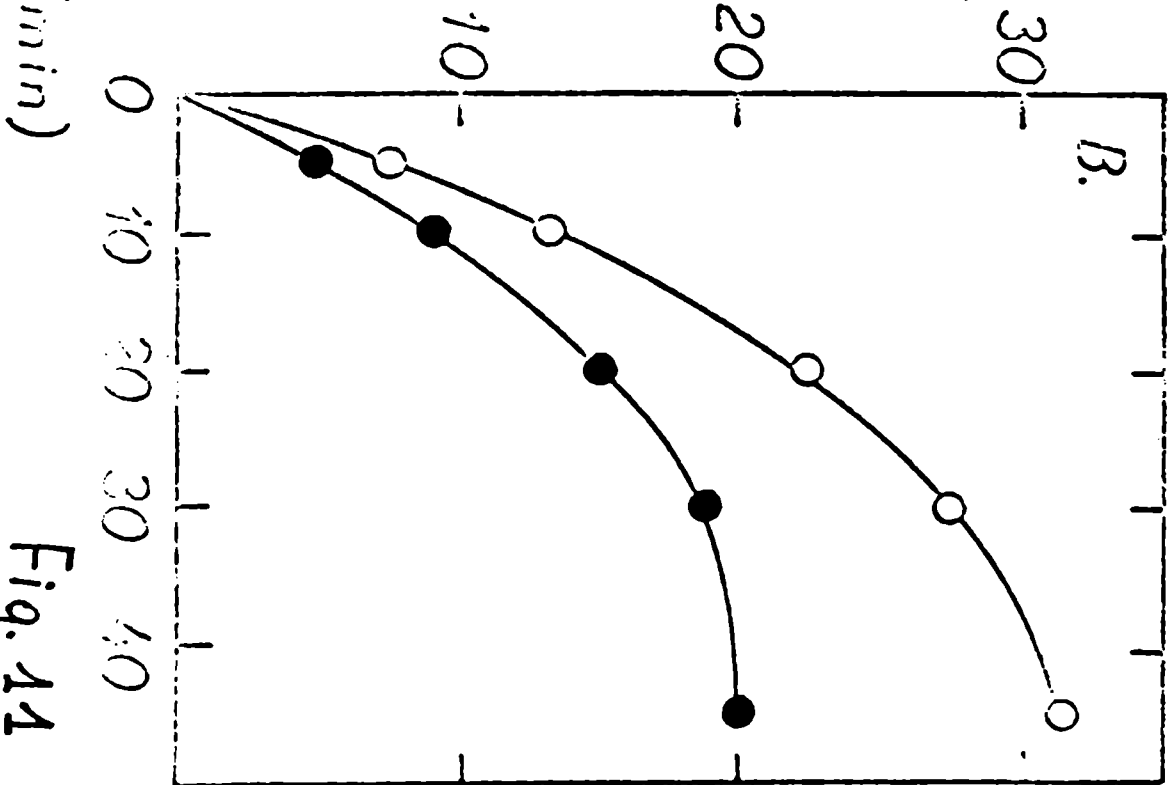


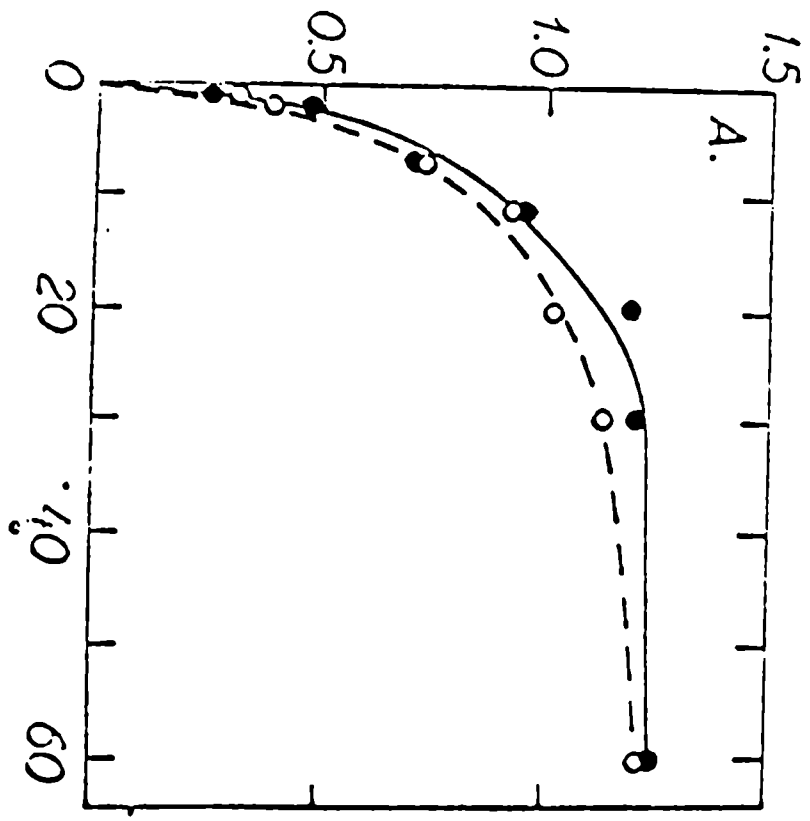
Fig. 11

Figura 11.- Efecto del agregado de putrescina sobre la síntesis de RNA y proteínas en células ayunadas y en presencia de rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los detalles experimentales y los símbolos utilizados son iguales a los indicados en la Fig. 10.-

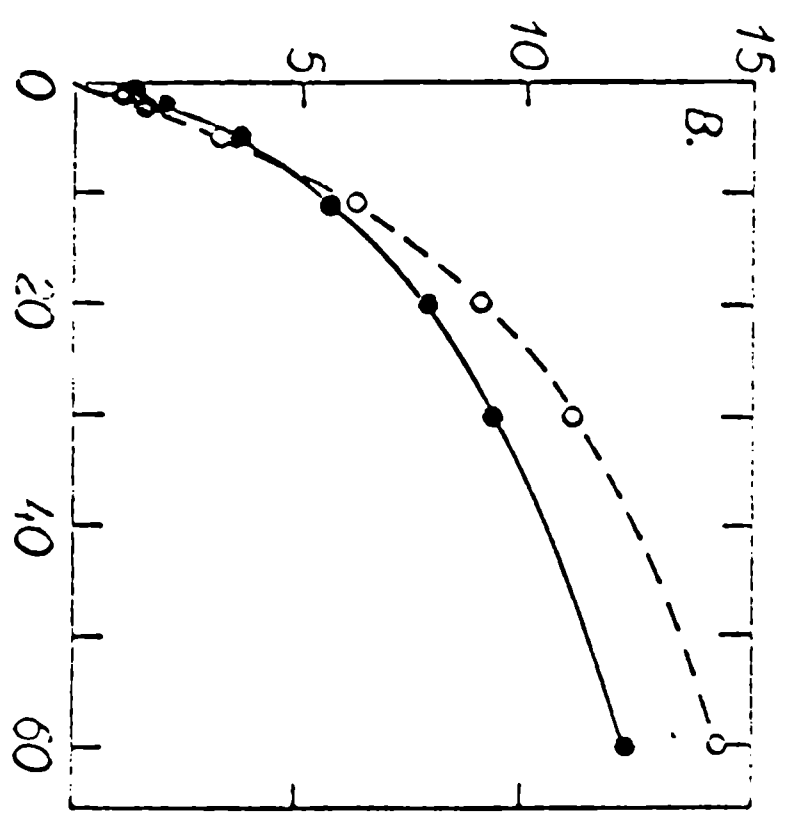
Transporte de uracilo y leucina

Las diferencias que observamos en los experimentos anteriores (durante la primera hora posterior al agregado de la putrescina) no se deben a un número diferente de bacterias, ya que el aumento de la síntesis del DNA y de la velocidad de crecimiento inducidas por la poliamina comienza después de ese período (Fig. 1).

Sin embargo, estas diferencias podrían atribuirse a una modificación en el transporte de los precursores radiactivos por la presencia o ausencia de la poliamina. Las Figs. 12 A y B demuestran que el transporte de uracilo y de leucina es similar para los cultivos desarrollados en presencia o ausencia de poliamina. Estudios realizados por otros autores indican que la diferencia de incorporación del uracilo durante el período inicial (Fig. 10 A) parece deberse a una expansión del " pool " endógeno de esta sustancia después del agregado de la putrescina (129).



Transporte de [14 C] Uracilo ($\text{cpm} \times 10^{-4} / 10^8 \text{ células}$)



Tiempo (min)

Fig. 12

Figura 12.- Efecto del agregado de poliamina sobre el transporte de uracilo y leucina. El transporte de leucina (A) y de uracilo (B) se midió según lo indicado en materiales y métodos. Los valores correspondientes a los medios MMO (●) y MMOP (○) se expresaron como la radioactividad incorporada por 10^8 células.

Síntesis "in vitro" de polipéptidos:

Los experimentos de síntesis "in vitro" de polipéptidos, demostraron que el agregado de putrescina a cultivos previamente sometidos a un ayuno de esta sustancia produce un efecto independiente a nivel de la traducción. En estos experimentos se midió la incorporación de fenilalanina usando al poli U como RNA mensajero. Los resultados indicaron que las fracciones S-30 provenientes de cultivos desarrollados en presencia de putrescina presentaban una actividad 3 a 4 veces mayor que la correspondiente a extractos de bacterias cultivadas en ausencia de esta sustancia (Fig. 13). Esta diferencia de actividad para ambos sobrenadantes S-30 no se debe a distintos requerimientos de magnesio, ya que en ambos sistemas el óptimo de magnesio oscila entre 13 y 15 mM (Fig. 14). Cuando se siguió la cinética de incorporación de fenilalanina (Fig. 15) se pudo ver que los sobrenadantes S-30 provenientes de cultivos desarrollados en medio NMO presentaban una reducida actividad inicial que luego alcanzaba un valor máximo en tiempos relativamente cortos no ocurriendo lo mismo con los sobrenadantes S-30 aislados de células cultivadas en presencia de putrescina. El retardo observado en la síntesis de polipéptidos en extrac-

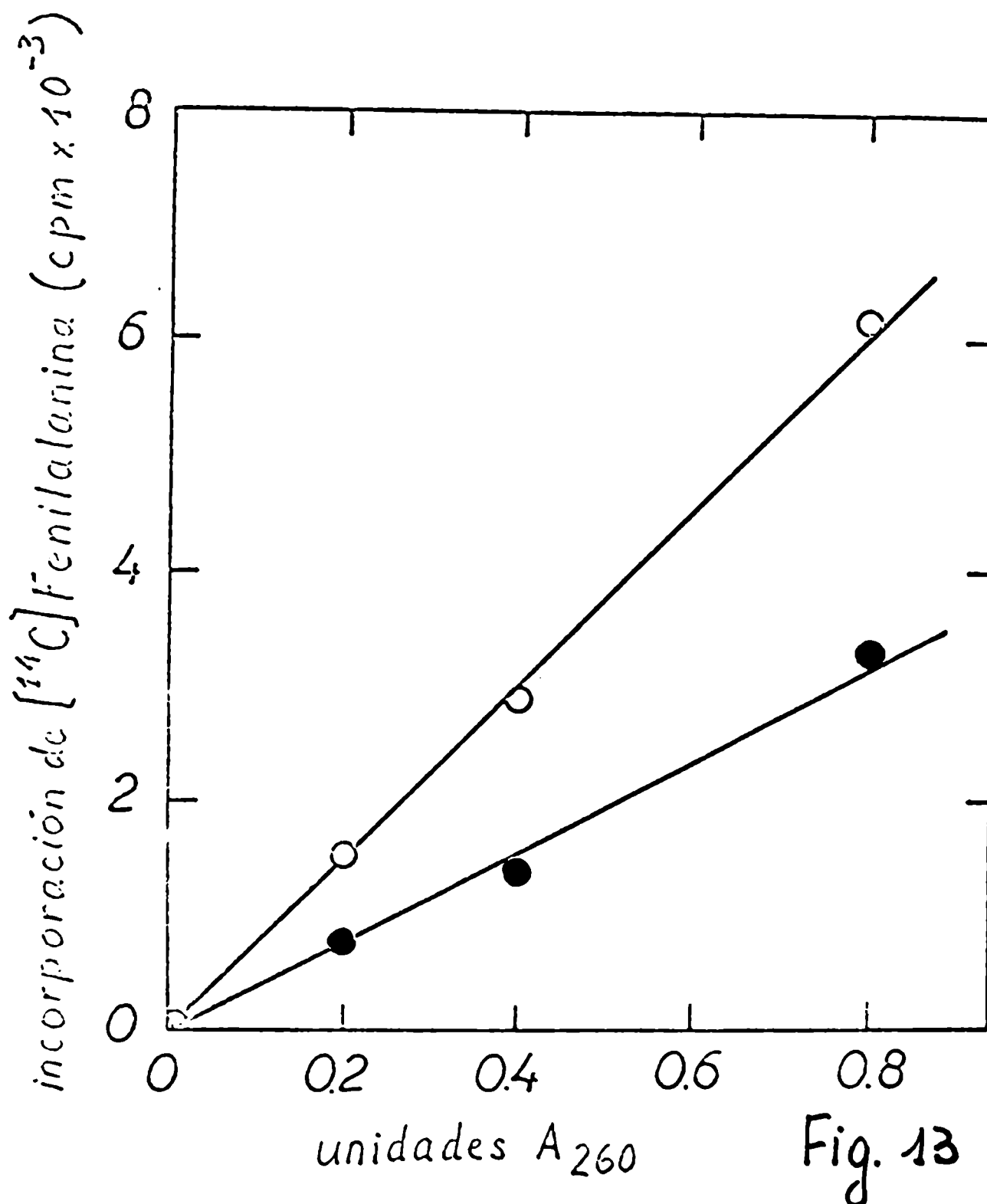


Figura 13.- Incorporación de fenilalanina en extractos de bacterias ayunadas y suplementadas con poliaminas. Las mezclas de reacción contenían las cantidades indicadas de extracto S-30 y los demás componentes descritos en materiales y métodos. La concentración de acetato de Mg fue de 15 mM y el tiempo de incubación de 30 minutos. Los símbolos ● y ○ corresponden a extractos de bacterias cultivadas en medios M40 y MNOP, respectivamente.

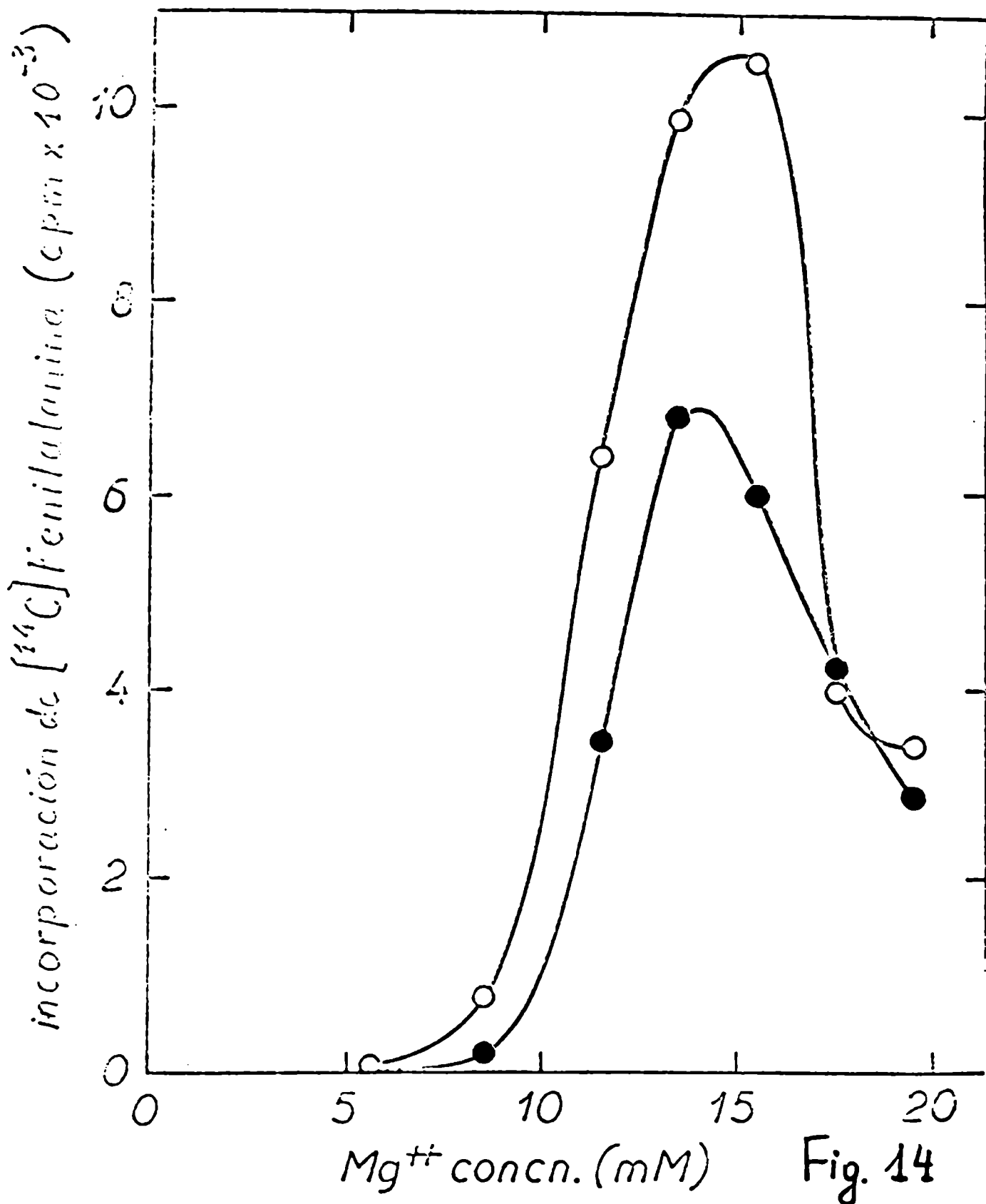


Figura 14.- Síntesis de polifenilalanina en ambos extractos bacterianos a distintas concentraciones de Mg^{++} . Se usaron 0,4 unidades de absorción óptica medida a 260 nm de cada extracto S-30 y las concentraciones indicadas de acetato de Mg. Los demás detalles experimentales y los símbolos fueron descritos en materiales y métodos y en la leyenda de la Fig. 13.

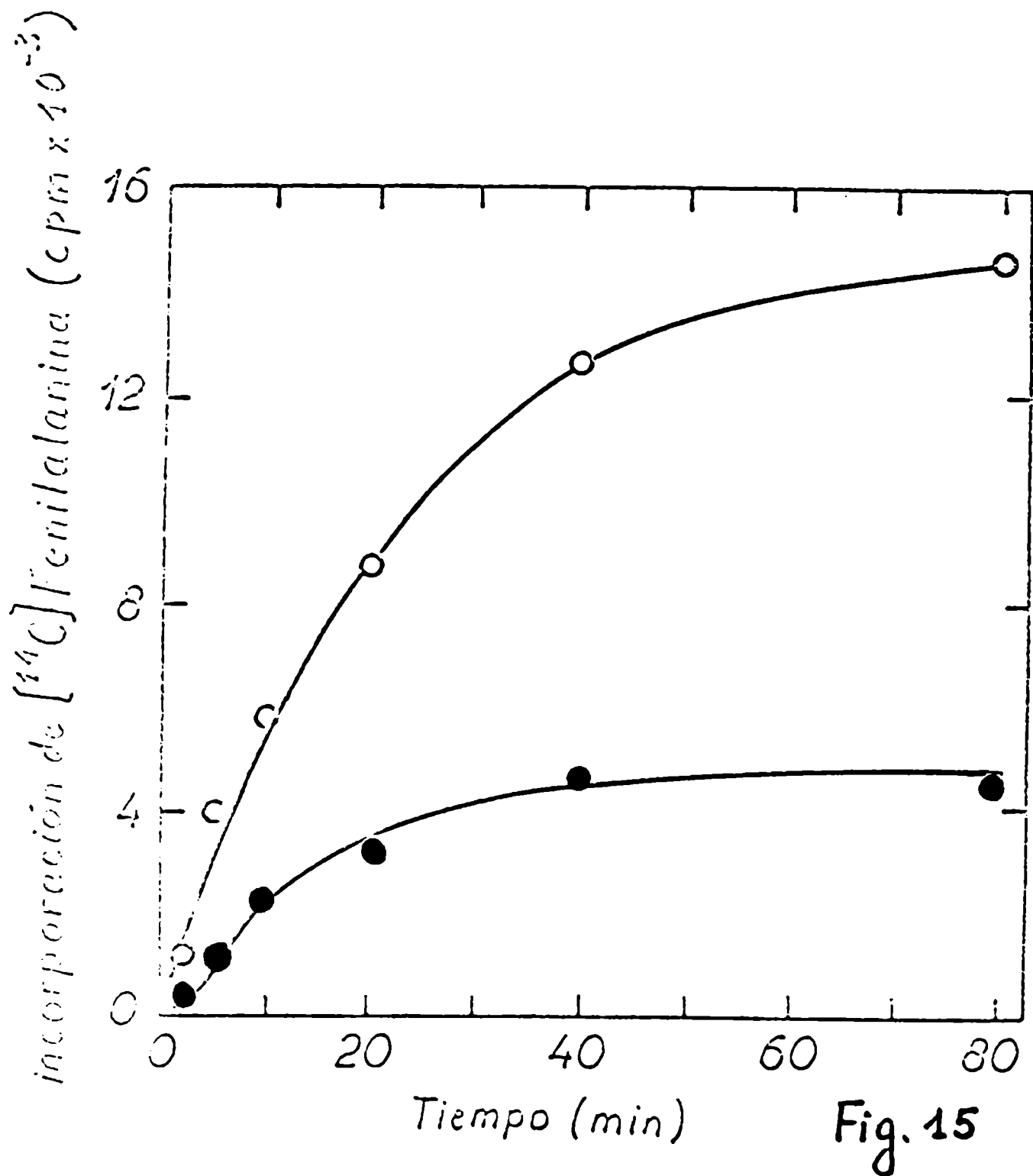


Figura 15.- Cinética de incorporación de fenilalanina en extractos de bacterias ayunadas o suplementadas con putrescina. Las mezclas de reacción se han descrito en materiales y métodos. En todos los casos se utilizaron 0,4 unidades de absorción óptica medida a 260 nm de los extractos S-30 y una concentración de Mg^{++} de 15 mM. Los tiempos de reacción son los indicados en cada caso y los símbolos los mismos utilizados en la Fig. 13.

tos de bacterias desarrolladas en medio MMO parece indicar que las células con bajos niveles de poliaminas presentan alguna deficiencia en los procesos de iniciación de la síntesis proteica. Por otra parte se ha descartado la posibilidad de que la reducida velocidad de síntesis de polifenilalanina en los extractos de bacterias desarrollados en ausencia de putrescina se deba a un menor nivel de activación de los aminoácidos. En nuestro caso esto no ocurre, pues, ambos sistemas preparados a partir de bacterias cultivadas en ausencia o presencia de putrescina mostraron similares cinéticas de activación (Fig. 16).

Para estudiar con más detalle el efecto del ayuno de poliaminas sobre la síntesis "in vitro" de polipéptidos, se centrifugaron las fracciones S-30 provenientes de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina con el fin de separar ribosomas de los factores solubles presentes en la fracción sobrenadante denominada S-150. Combinando luego ribosomas y fracción S-150 de ambos sistemas para realizar la síntesis "in vitro" de polipéptidos, se podría detectar cuál de estos componentes es defectuoso en los extractos de bacterias con bajos niveles de poliaminas. Los resultados de la Tabla I muestran que la capacidad de sintetizar polipéptidos depende en la mayoría de los casos, del origen de los ribosomas (I y III). En algunos

experimentos el sobrenadante S-150 obtenido de las bacterias desarrolladas en presencia de poliaminas aumentó la actividad de los ribosomas de células sometidas al ayuno de estas sustancias (II).

Los resultados anteriores parecen indicar que el ayuno de putrescina provoca una alteración en alguno de los componentes o factores ribosomales, que en ciertas condiciones podrían liberarse parcialmente al sobrenadante.

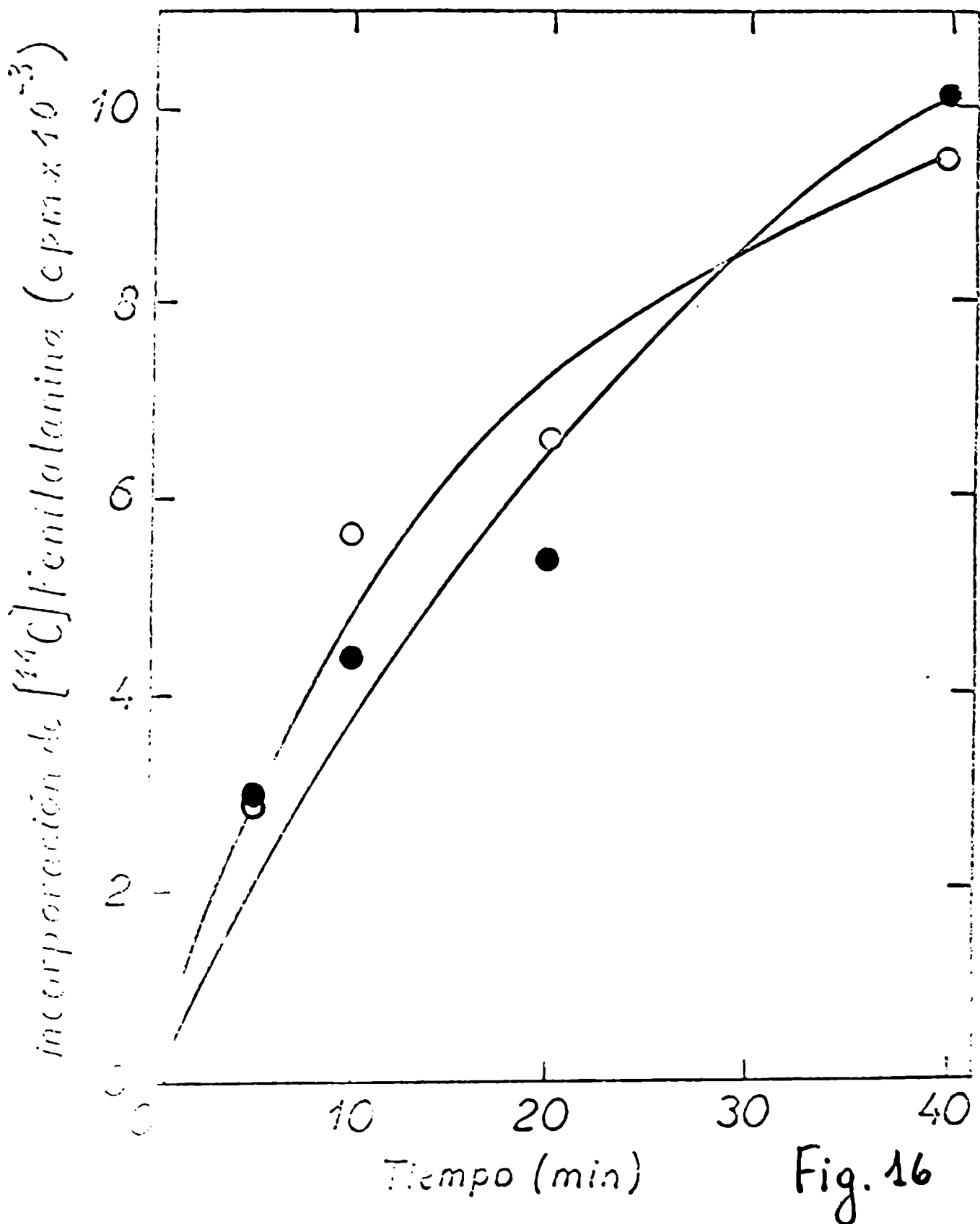


Figura 16.- Cinética de formación de fenilalanil-tRNA en extractos de bacterias ayunadas o suplementadas con putrescina. Las mezclas utilizadas se han descrito en materiales y métodos. Se usaron 0,4 unidades de absorción óptica a 260 nm de los extractos S-30 y una concentración de ion Mg^{++} de 15 mM. Símbolos como en la Fig. 13.-

Tabla 1

Síntesis de polifenilalanina con preparaciones de ribosomas y fracciones sobrenadantes (S-150) obtenidos de bacterias cultivadas en ausencia o presencia de putrescina

Experimento	Ribosomas		S 150		Síntesis de polipéptidos picomoles de fenilalanina incorporada
	MMO	MMOP	MMO	MMOP	
I	+	-	+	-	23,6
	+	-	-	+	26,7
	-	+	+	-	46,2
	-	+	-	+	46,6
II	+	-	+	-	25,0
	+	-	-	+	46,4
	-	+	+	-	70,5
	-	+	-	+	97,8
III	+	-	+	-	48,4
	+	-	-	+	59,6
	-	+	+	-	143,5
	-	+	-	+	136,0

Las mezclas de reacción contenían 0,2 unidades ópticas medidas a 260 nm de suspensiones de ribosomas y 15 µg de proteínas de sobrenadante S 150 obtenidos a partir de extractos de bacterias desarrolladas en los medios MMO o MMOP. La concentración de Mg⁺⁺ fue de 14 mM y la de los demás componentes como se describió en Materiales y Métodos. El tiempo de incubación fue de 30 minutos. El blanco de la reacción (realizado en ausencia de ácido poliuridílico) fue restado en cada caso.

TABLA II

Síntesis de polifenilalanina con sistemas reconstituidos a partir de; subunidades ribosomales purificadas obtenidas de bacterias cultivadas en presencia o ausencia de putrescina.

	subunidades 30S		subunidades 50S		Síntesis de polipéptidos (cpm)
	de bacterias desarrolladas en medio de cultivo				
	MMO	MMOP	MMO	MMOP	
Expt. 1	+	-	+	-	1724
	+	-	-	+	1909
	-	+	+	-	4817
	-	+	-	+	5970
Expt. 2	+	-	+	-	1771
	+	-	-	+	1492
	-	+	+	-	7956
	-	+	-	+	7550

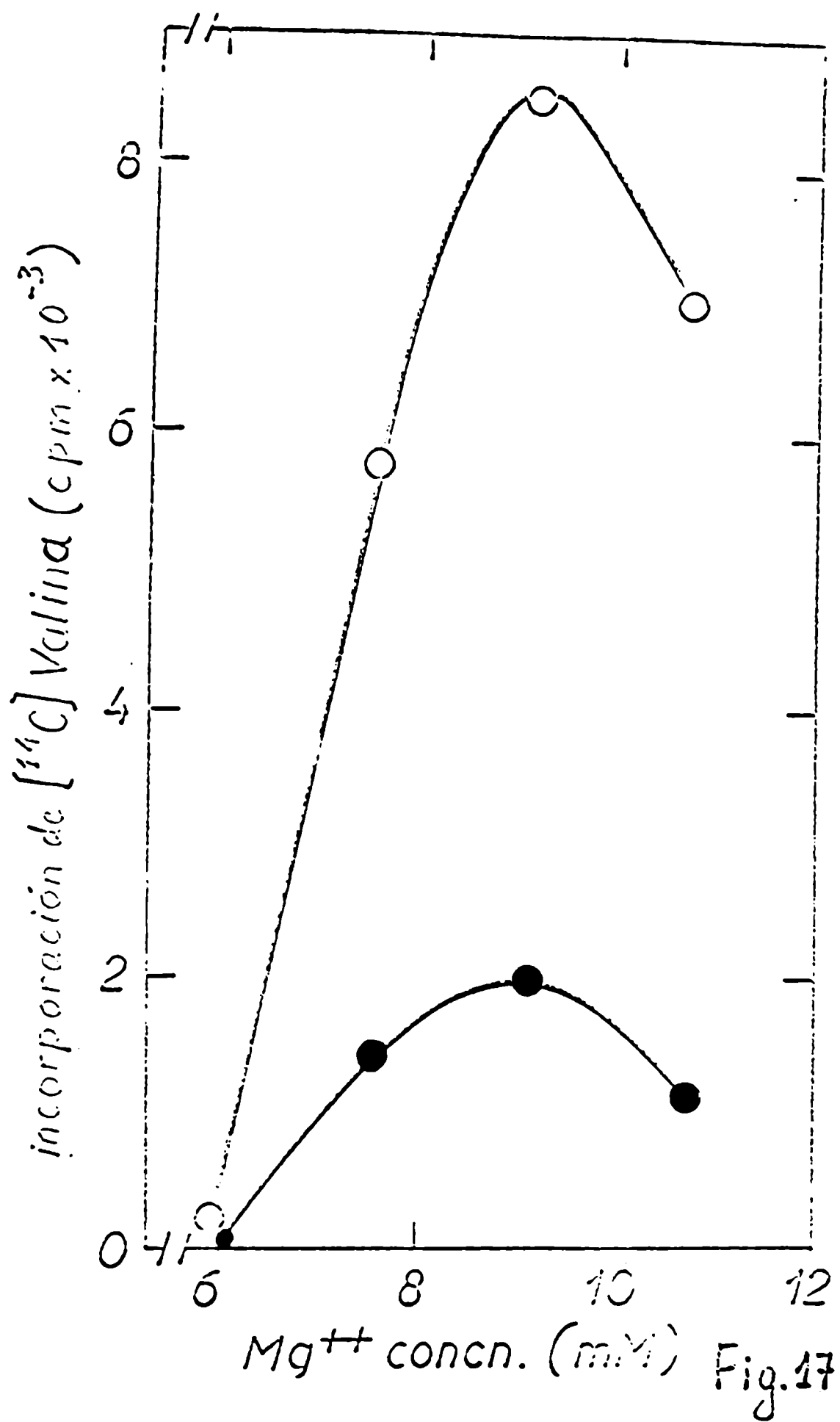
La mezcla de reacción contiene 0,05 UDO 260 nm de la subunidad ribosomal 30S y 0,10 UDO 260 nm de la 50S, que se obtuvieron a partir de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina según se indica para cada experimento. El sobrenadante (S-150) equivalente a 15 µg de proteínas se obtuvo de los cultivos desarrollados en presencia de putrescina. La concentración de Mg⁺⁺ que se usó para estos experimentos fue de 13 mM y las incubaciones se realizaron a 37° durante 30 minutos. El blanco de la reacción (incorporación obtenida en ausencia de poli U) fue restado en cada caso.

Todos los otros detalles de la reacción están descritos en Materiales y Métodos.

Síntesis "in vitro" de polipéptidos usando RNA mensajero natural

Los resultados obtenidos para la síntesis "in vitro" de polifenilalanina fueron confirmados cuando se utilizó como mensajero natural el RNA del fago MS-2. En estos experimentos (Fig. 17), las fracciones S-30 aisladas de bacterias cultivadas en medio suplementado con putrescina (MMOP), mostraron una actividad 4 veces mayor que la correspondiente a la de bacterias ayunadas. Se observó además que para ambos extractos la concentración de magnesio que da máxima actividad es de aproximadamente 9 mM.

Figura 17.- Efecto de la concentración del Mg^{++} sobre la incorporación de valina inducida, por el RNAm del fago MS-2 en extractos bacterianos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina. La mezcla de reacción se ha descrito en materiales y métodos. Símbolos y corresponden a los extractos obtenidos a partir de cultivos desarrollados en medio MMO y MMOP. respectivamente.-



Mg^{++} concn. (mM) Fig. 17

Síntesis de polifenilalanina con subunidades ribosomales purificadas. Detección de partículas 30-S anormales.

Los experimentos descriptos de síntesis "in vitro" de polipéptidos usando RNA mensajeros artificiales o naturales y fracciones S-30 provenientes de bacterias sometidas o no a un ayuno de putrescina, demostraron que dicho ayuno provocaba una disminución de la capacidad sintética de polipéptidos. Las actividades de los sistemas reconstituidos con ribosomas y fracciones sobrenadantes S-150 indicaron que la disminución de la actividad dependía fundamentalmente de las partículas ribosomales. Estos hechos y la aparición de partículas 30-S anormales en los perfiles de ribosomas obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa de los extractos de bacterias ayunadas (Fig. 3), sugirió la posibilidad de que la disminución de la actividad en los extractos de células cultivadas en ausencia de putrescina podría deberse a algún daño en la subunidad ribosomal más pequeña.

Para confirmar esta hipótesis, se purificaron subunidades ribosomales a partir de extractos obtenidos de bacterias desarrolladas en presencia o ausencia de putrescina (Fig. 18). Posteriormente se realizaron una

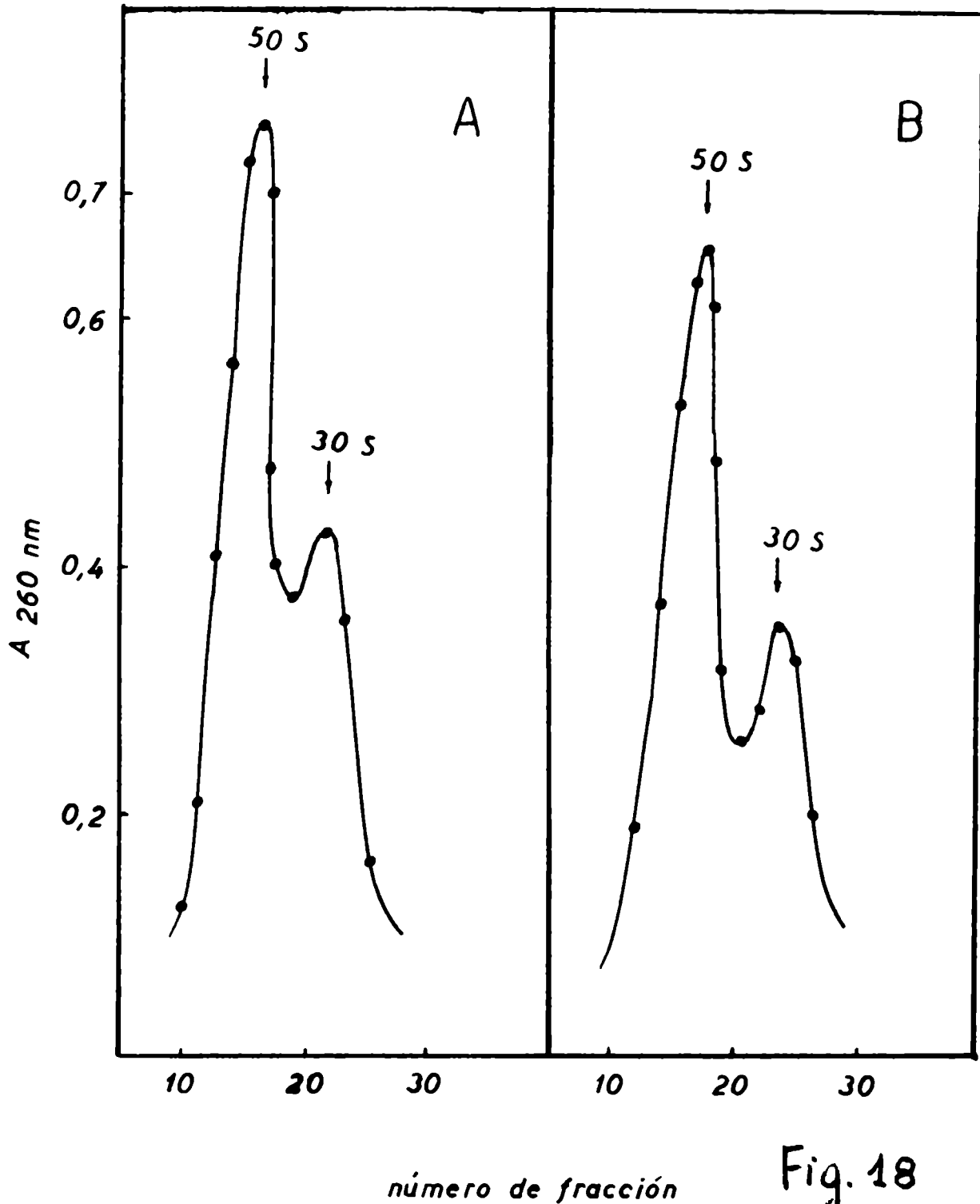


Fig. 18

Figura 18.- Purificación de las subunidades ribosomales por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Suspensiones de ribosomas provenientes de bacterias cultivadas en medio MMG y MMOP se sometieron a una centrifugación en gradientes de sacarosa con el fin de obtener subunidades ribosomales purificadas (ver detalle en materiales y métodos). A: perfil correspondiente a extractos de cultivos desarrollados en medio MMG; B: perfil de extractos de bacterias cultivadas en medio MMOP.

serie de experimentos de síntesis de polifenilalanina en sistemas reconstituídos mezclando subunidades purificadas obtenidas de ambos extractos; en todos los casos se utilizó la misma fracción sobrenadante S-150 proveniente de bacterias desarrolladas en presencia de putrescina. Los datos de la Tabla II indican claramente que el nivel de actividad está dado por el tipo de subpartículas 30-S utilizado, no ocurriendo lo mismo con la subunidad 50-S. Cuando el sistema incluye la subunidad 30-S preparada de bacterias desarrolladas en presencia de putrescina la actividad es 3 a 5 veces mayor que cuando se utiliza partícula 30-S de células ayunadas y no depende del tipo de subunidad 50-S usado.

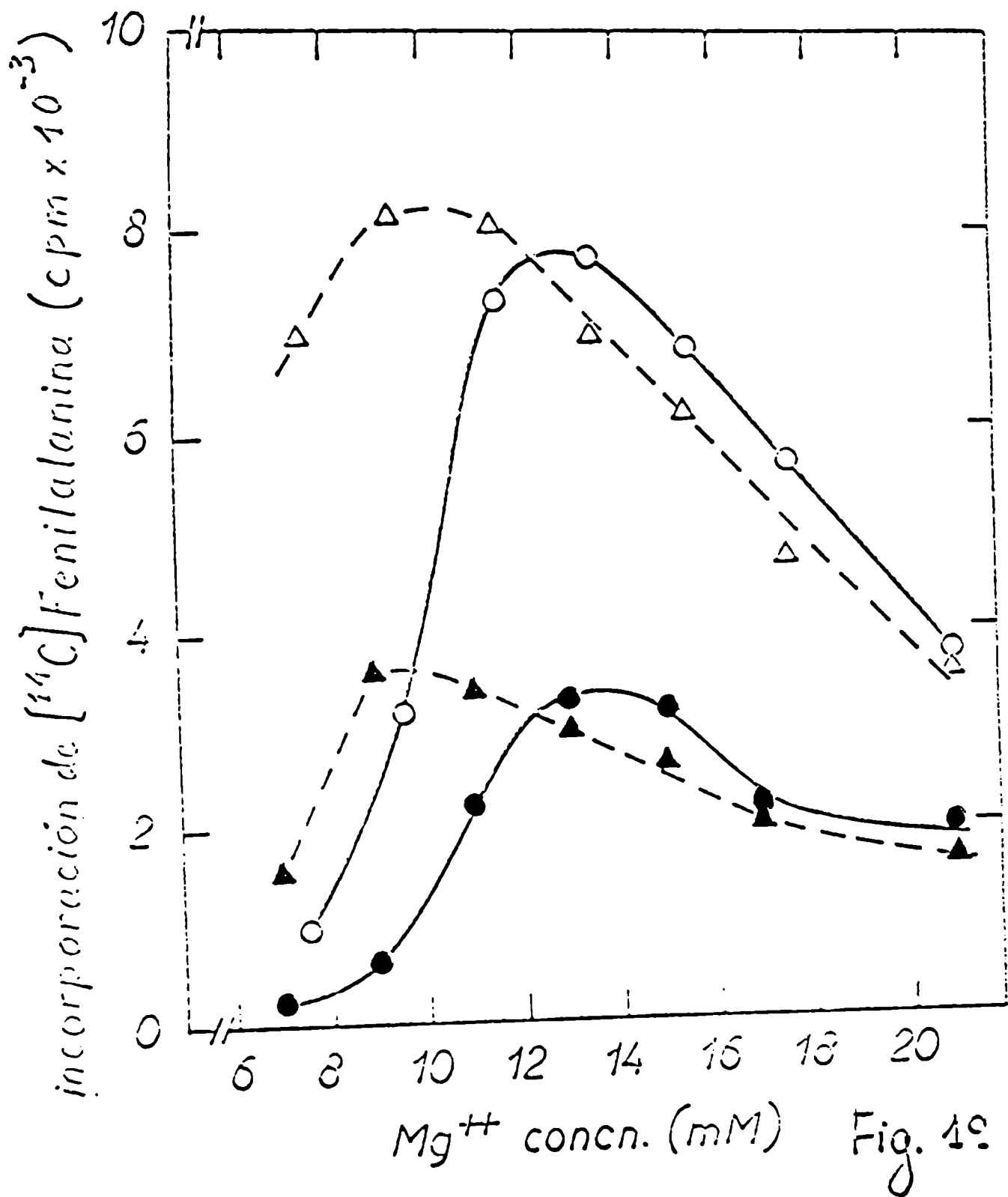
Estos resultados podrían deberse a una diferencia en las concentraciones de poliaminas de los ribosomas aislados en varias condiciones de cultivo. Para descartar esta posibilidad se midió la síntesis de polifenilalanina en los mismos sistemas descritos, utilizando diferentes concentraciones de magnesio y en presencia o ausencia de espermidina. La Fig. 19 muestra que el agregado "in vitro" de espermidina no modifica la eficiencia de los ribosomas obtenidos de bacterias ayunadas o desarrolladas en presencia de putrescina. En ambos sistemas la espermidina causa un desplazamiento similar del óptimo de magnesio, que dis-

minuye hasta aproximadamente 9 a 10 mM.

Los análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de los ribosomas aislados a partir de bacterias desarrolladas en presencia o ausencia de putrescina, indicaron que la subunidad ribosomal más pequeña de células ayunadas daba picos asimétricos y que dicha asimetría se acentuaba a medida que disminuía la concentración de magnesio en los gradientes (Fig. 20-A-B-C). De esta manera aparecía un pico doble correspondiente a las subunidades 30-S deficientes cuando el nivel de magnesio se hacía 0.1mM. Al mismo tiempo los perfiles correspondientes a ribosomas de bacterias desarrolladas en presencia de putrescina (Fig. 20 D-E-F) no presentan ningún tipo de asimetría aún a concentraciones muy bajas de magnesio.

Cuando se analizaron en gradientes de sacarosa las subunidades aisladas y purificadas obtenidas de las bacterias cultivadas en los medios MMO y MMOP se pudo observar que sólo la subunidad 30-S de las células desarrolladas en ausencia de putrescina era anormal, presentando nuevamente un doble pico (Fig. 21 B). Esta heterogeneidad de la partícula 30-S puede deberse a la presencia de subunidades defectuosas o de precursores de las partículas maduras. Los perfiles correspondientes a todas las otras subunidades fueron perfectamente simétricos (Fig. 21 A-C-D).

Figura 19.- Efecto de la concentración del Mg^{++} y la adición de espermidina sobre la síntesis de polifenilalanina en sistemas libres de células, obtenidos a partir de cultivos bacterianos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina. La mezcla de reacción contiene partículas ribosomales 30 S y 50 S purificadas, en las cantidades indicadas en materiales y métodos. Sbrnadante S-150 (15 μ g de proteínas) obtenido de cultivos desarrollados en presencia de putrescina y todos los reactivos necesarios para la síntesis de polifenilalanina (Materiales y Métodos). Símbolos : ● y ○ , corresponden a la mezcla de subunidades ribosomales de bacterias desarrolladas en presencia o ausencia de putrescina respectivamente ▲ y △ corresponden a los mismos sistemas con la adición de 0.5 mM espermidina.



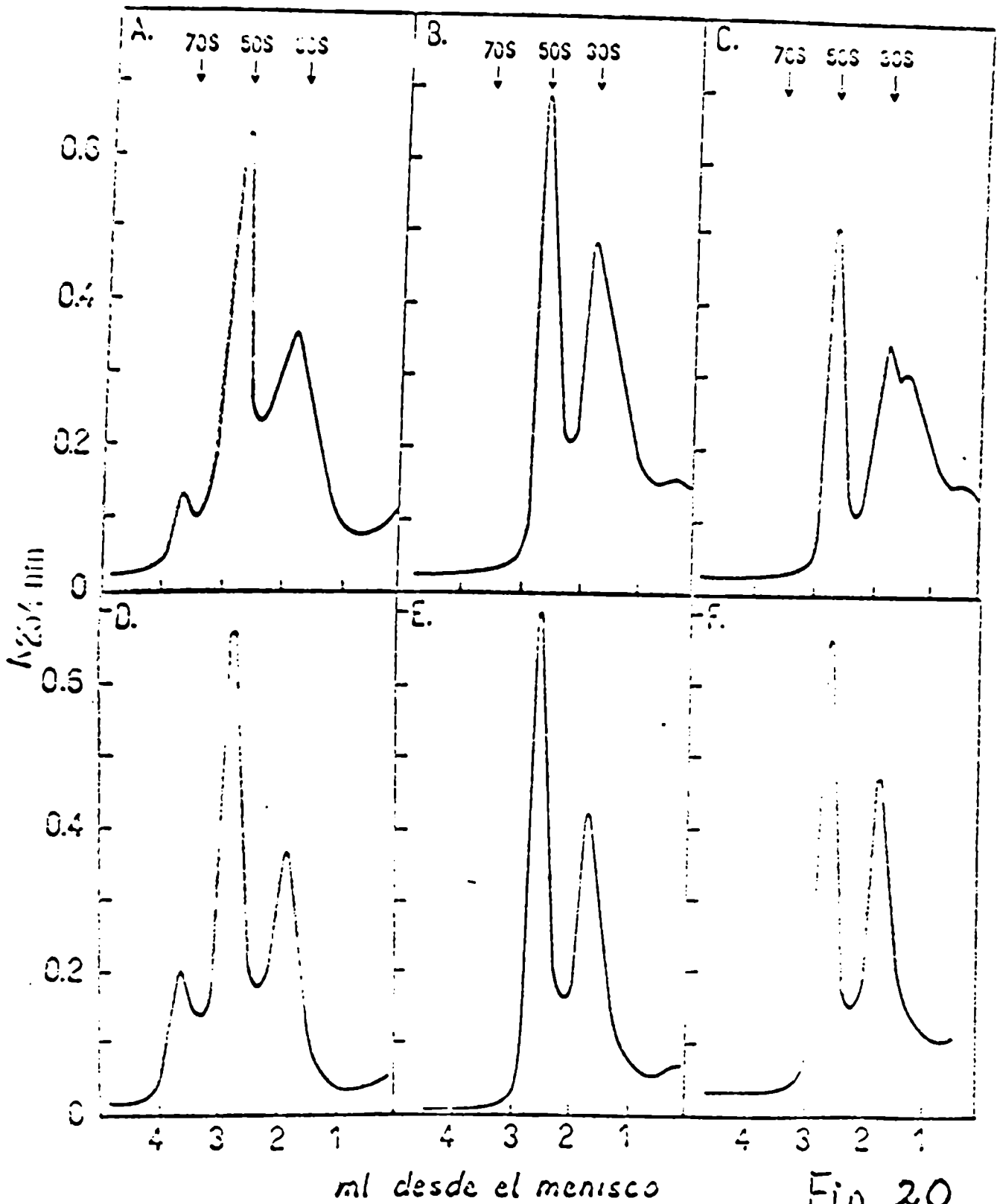
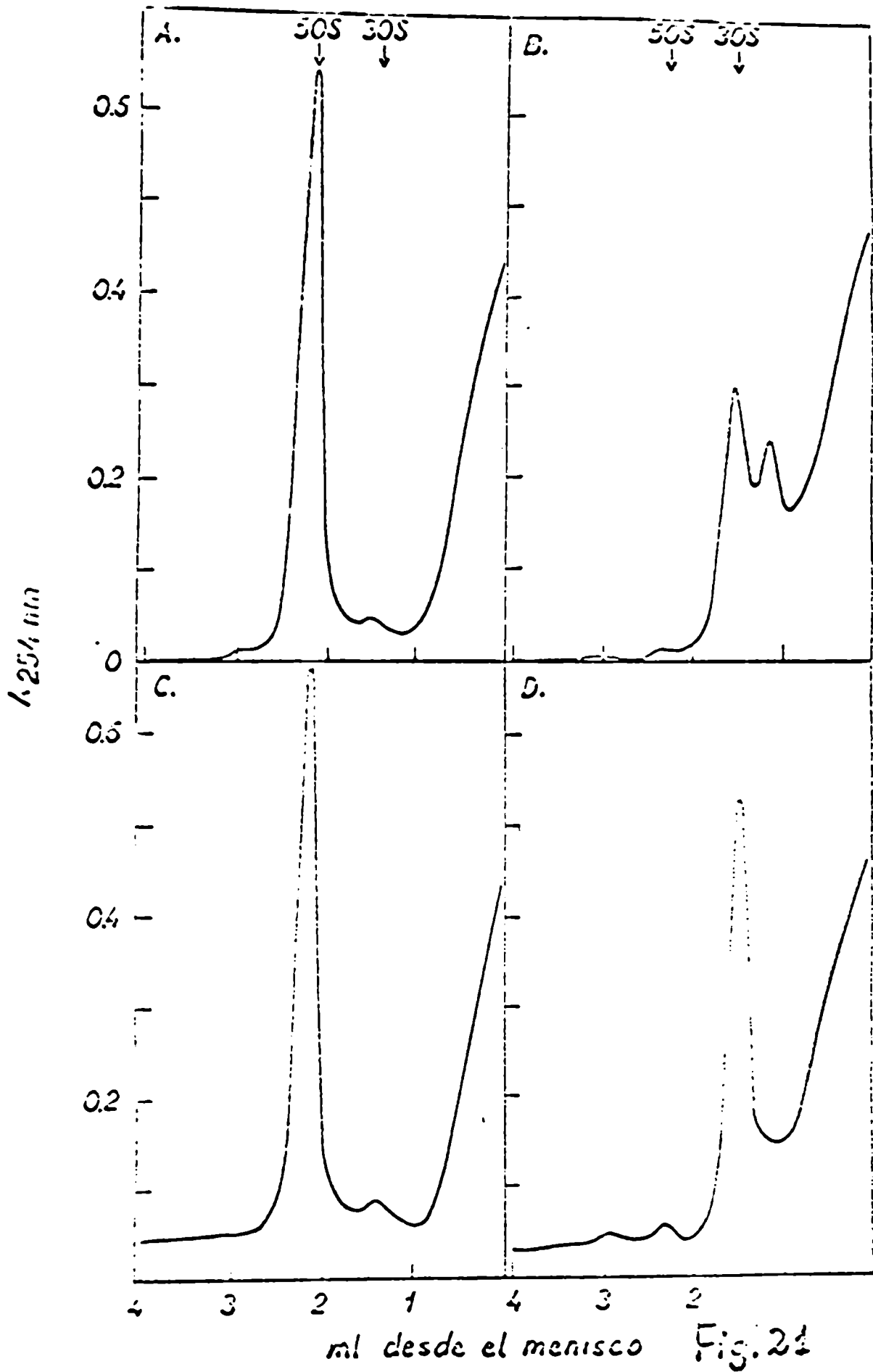


Fig. 20

Figura 20.- Perfiles obtenidos a diferentes concentraciones de Mg^{++} correspondientes a ribosomas aislados a partir de bacterias desarrolladas en medio M10 (A, B y C) o medio M10P (D, E y F). A y D se obtuvieron a 5 mM Mg^{++} , B y E a 1 mM Mg^{++} y C y F a 0.1 mM Mg^{++} .

Figura 21.- Análisis por centrifugación en gradientes de sacarosa de las subunidades ribosomales purificadas obtenidas a partir de cultivos bacterianos ayunados o desarrollados en presencia de putrescina. A y B son los perfiles correspondientes a las subunidades 50 S y 30 S respectivamente aisladas de cultivos desarrollados en ausencia de putrescina; C y D corresponden a los perfiles de las subunidades preparadas a partir de los cultivos suplementados con putrescina.



ml desde el menisco Fig. 24

Formación del complejo de iniciación usando como mensajero el trinucleótido AUG.

Los extractos de bacterias cultivadas en ausencia de putrescina mostraron la presencia de una subunidad 30-S deficiente. Además los experimentos de cinética de síntesis de polifenilalanina con los mismos extractos indicaron que dicha reacción era especialmente lenta en los primeros minutos (Fig. 15). Estos hechos nos hicieron estudiar la iniciación de la síntesis proteica en los extractos de ambos tipos de bacterias.

Como se observa en la Tabla III la formación del complejo de iniciación fue aproximadamente 3 a 6 veces mayor con los ribosomas aislados de las bacterias desarrolladas en presencia de putrescina. Estos experimentos, junto con los anteriores, demuestran que los bajos niveles intracelulares de poliaminas provocan una deficiencia tanto estructural como funcional de la subunidad ribosomal 30-S.

TABLA III

Formación del complejo de iniciación usando como RNAm el triplete AUG y extractos o ribosomas bacterianos aislados de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina.

	Medio de cultivo a partir del cual se aislaron las fracciones S-30	Cantidad de extracto utilizado (UDO 260 nm)	Formación del complejo de iniciación F-met ³ H-tRNA-Rib-AUG cpm
Exp 1	MMO	1	1.300
	MMOP	1	7.100
	Medio de cultivo a partir del cual se aislaron los ribosomas	Cantidad de ribosomas utilizados (UDO 260 nm)	Formación del complejo de iniciación F-met ¹⁴ C-tRNA-rib-AUG cpm
Exp 2	MMO	1	31
		2	59
	MMOP	1	105
		2	300

Exp. 1: La mezcla de reacción se realizó en dos etapas como se ha descrito en materiales y métodos, y contiene 1 UDO de los extractos bacterianos S-30 preincubados y los demás componentes necesarios para la formación del complejo de iniciación. Las incubaciones se realizaron a 34° C y 25° C en la primera y segunda etapa respectivamente. El blanco de la reacción (realizado en ausencia de AUG) fue restado en todos los casos.

Exp. 2: La mezcla de reacción contiene las cantidades indicadas de ribosomas obtenidos a partir de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina, ¹⁴C formilmetionil-tRNA y los demás componentes ya descritos en materiales y métodos. Las incubaciones se realizaron a 24° C durante 20 minutos. El blanco de la reacción (realizado en ausencia de AUG) fue restado en todos los casos.

Las partículas ribosomales 30-S de ambos tipos de bacterias desarrolladas en medios MMO y MMOP se sometieron a un tratamiento con SDS para liberar el RNA ribosomal. Los productos de estas reacciones se analizaron por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, y se pudo observar que el RNA correspondiente a la subunidad 30-S de bacterias cultivadas en ausencia de putrescina presentaba un perfil totalmente difuso (Fig. 22B). Este resultado puede indicar una alteración de la estructura secundaria o una degradación del RNA ribosomal.

En el caso de la subunidad 30-S de bacterias desarrolladas en medio MMOP no se observa este fenómeno, apareciendo un pico nítido que corresponde al RNA ribosomal 16-S (Fig. 22 D).

Figura 22.- Análisis del RNA ribosomal correspondiente a las subunidades purificadas obtenidas a partir de cultivos desarrollados en presencia o ausencia de poliaminas. Subunidades purificadas preparadas de bacterias cultivadas en presencia o ausencia de putrescina, se trataron con sodio dodecil sulfato al 2 % como se ha descrito en materiales y métodos; las mezclas obtenidas que contienen el RNA liberado se analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa. A y B corresponden al RNA obtenido a partir de subunidades 50 S y 30 S respectivamente, de los cultivos desarrollados en medio MMQ; C y D corresponden al RNA obtenido de subunidades 50 S y 30 S respectivamente, de cultivos suplementados con putrescina.

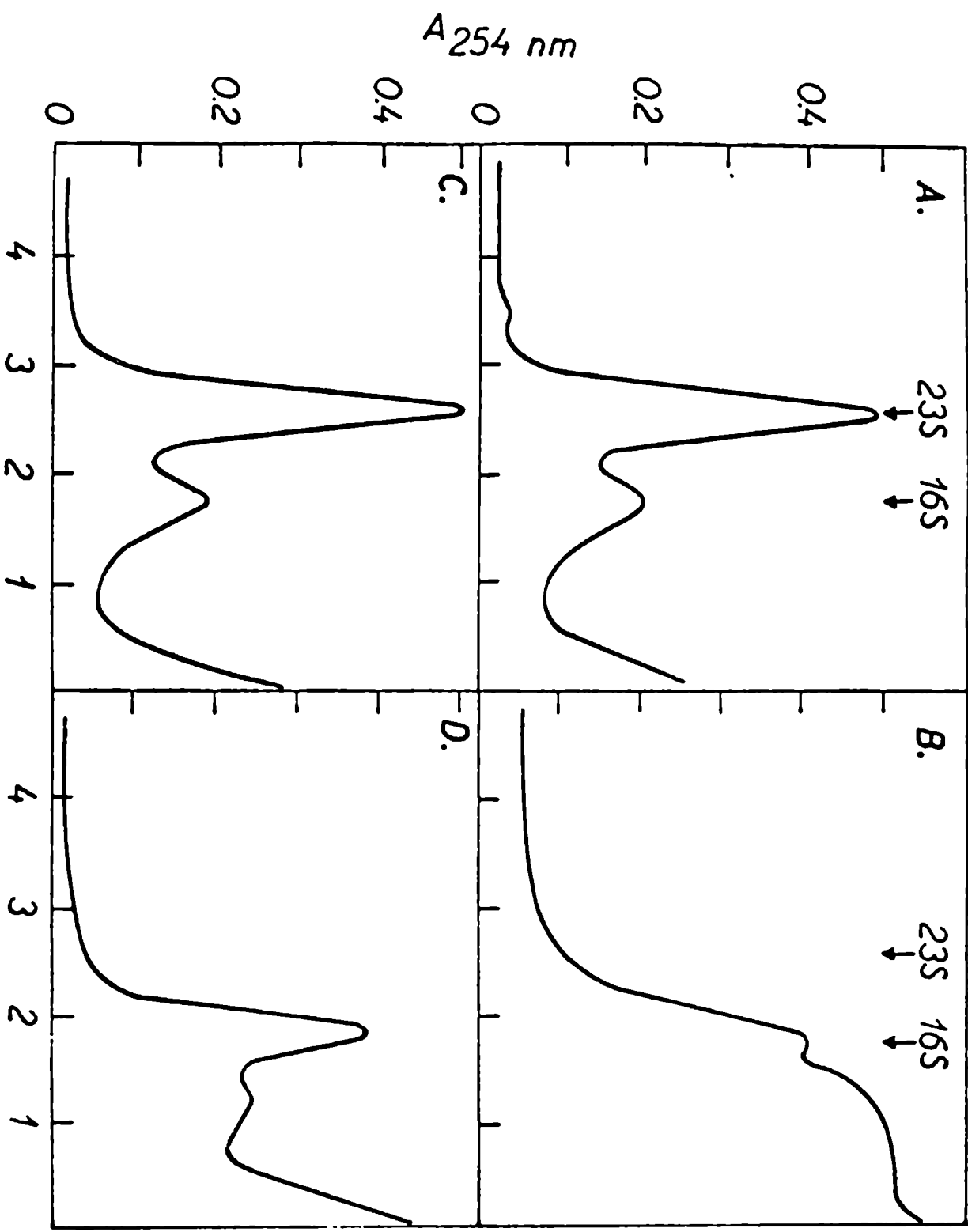


Fig. 22 ml desde el menisco

DISCUSSION

Las poliaminas son sustancias que desempeñan funciones de vital importancia en el metabolismo celular. Intervienen en múltiples reacciones que forman parte de los procesos biosintéticos de macromoléculas tales como DNA, RNA y proteínas, así como también en la estabilización de estructuras celulares tales como membranas, ribosomas, etc. Sin embargo, aún no se conoce si alguna de estas funciones es primaria y las otras secundarias, derivadas de ella, o si los efectos mencionados son independientes entre sí. El aislamiento de mutantes de Escherichia coli que requieren putrescina o espermidina para crecer normalmente permite estudiar un sistema en el cual se puede analizar, tanto "in vivo" como "in vitro", el efecto del agregado de poliaminas a cultivos previamente sometidos a un ayuno de estas sustancias. De esta manera hemos tratado de localizar el efecto biológico causado por la deficiencia de poliaminas en las células bacterianas.

Los resultados obtenidos "in vivo" (Fig. 10) para la síntesis de RNA y de proteínas indican que el agregado de putrescina a cultivos previamente sometidos a un ayuno de esta sustancia, provoca una estimulación inmediata de la síntesis proteica (medida por la incorporación de leucina radiactiva a polipéptidos), aún cuando la velocidad de crecimiento se mantiene inalterada durante 1 a 2 horas. Estos resultados no se observan al analizar la síntesis de RNA (incorporación de uracilo radiactivo), que se encuentra disminuida en los primeros 30 minutos posteriores al

agregado de putrescina; después de este período sobreviene una estimulación (Fig. 10). El tiempo de latencia que se observa antes de un real aumento en la síntesis del RNA provocado por el agregado de putrescina al medio de cultivo es de difícil interpretación, ya que para ambos cultivos (en ausencia o presencia de putrescina) el transporte del precursor radiactivo es idéntico (Fig. 12). Por otra parte, se ha demostrado (129) que el agregado de poliaminas a cultivos bacterianos en crecimiento puede producir un incremento del "pool" endógeno de uracilo; este hecho de expansión del "pool" podría explicar la disminución de la incorporación por un fenómeno de dilución del precursor radiactivo. Los resultados mencionados sugieren que el efecto estimulador sobre la síntesis de proteínas producido por el agregado de putrescina, es independiente de la síntesis del RNA ya que ésta no parece aumentar en el período inmediatamente posterior al agregado de poliaminas. Cuando se realizaron experimentos similares en presencia de rifampicina se observó que el agregado de putrescina en presencia del antibiótico provocaba una estimulación inmediata de la síntesis proteica, aún cuando la síntesis del RNA se había inhibido más del 90%, confirmándose de esta manera que el efecto estimulante que ejercen las poliaminas sobre la síntesis proteica es independiente de la síntesis del RNA. Si se analizan detalladamente los experimentos realizados en presencia de rifampicina se observa que la síntesis

proteica se detiene después de un período relativamente largo (Fig. 11 B). Este hecho podría indicar que existe alguna demora para que el antibiótico pueda ejercer su acción o bien que nuestra cepa bacteriana no es del todo sensible a la droga. Aunque se considere cualquiera de estas posibilidades los resultados indican que en los cultivos desarrollados en presencia de putrescina la rifampicina produce una mayor inhibición de la síntesis del RNA y simultáneamente aparece aumentada la síntesis proteica.

Los estudios realizados sobre la síntesis de polipéptidos utilizando sistemas libres de células con mensajeros naturales o artificiales (Figs. 13 y 17) han permitido analizar el proceso de traducción de una manera completamente independiente de la transcripción. Así se pudo demostrar una mayor actividad en las fracciones (S-30) aisladas de las bacterias cultivadas en presencia de poliamina. En todos estos experimentos se utilizaron iguales cantidades de RNA exógeno para la síntesis polipeptídica, y los resultados confirmaron los obtenidos en los experimentos "in vivo". Cuando se analizaron las cinéticas de incorporación de fenilalanina se encontró que ambos extractos presentaban un comportamiento diferente. En la fracción S-30 obtenida de bacterias desarrolladas en ausencia de putrescina la síntesis de polipéptidos se iniciaba con un retraso en los primeros minutos de la reacción y luego se detenía rápidamente.

Ambos efectos no fueron observados en los extractos de bacterias cultivadas en presencia de poliaminas e indicarían posibles alteraciones tanto a nivel de la iniciación como de la elongación de la síntesis proteica. La diferencia de actividad para ambos extractos no se debe a un distinto nivel en la activación de los aminoácidos (Fig 16). Por lo tanto debe reflejar alguna modificación producida en los ribosomas y/o factores solubles por los bajos niveles intracelulares de poliaminas. Los valores obtenidos para la síntesis de polipéptidos en sistemas reconstituídos con ribosomas y fracciones sobrenadantes S-150 demostraron que la diferencia de actividad provocada por la presencia o ausencia de poliamina en los medios de cultivos, se debe a algún daño que se localiza a nivel de las partículas y/o de los factores solubles unidos a ellas (Tabla I). Los valores de síntesis de polifenilalanina en sistemas en los que se utilizaron mezclas de subunidades purificadas que provenían de cultivos bacterianos desarrollados en presencia o ausencia de putrescina, indicaron claramente que la disminución de la actividad de síntesis proteica se debía a una diferencia localizada a nivel de la subunidad 30-S aislada de los cultivos sometidos a un ayuno de poliaminas (Tabla II). Las partículas 50-S obtenidas de las mismas células tenían una capacidad sintética normal. Estos experimentos y los de formación del complejo de iniciación (Fmet- tRNA - ribosoma) (Tabla III) demostraron que en ausencia de poliaminas se pro-

ducen subunidades 30-S funcionalmente deficientes. Estas subunidades también presentan anormalidades estructurales que se han podido detectar por estudios de sedimentación en gradientes de sacarosa. Cuando los extractos de bacterias cultivadas en presencia o ausencia de putrescina se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa que contenían diversas concentraciones de magnesio se pudo observar que a bajos niveles de este catión divalente la subunidad ribosomal pequeña aislada de las células desarrolladas en medio MMO aparecía como un pico asimétrico o doble en los perfiles ribosomales (Fig. 20). Estos mismos resultados se obtuvieron al analizar por centrifugación en gradientes de sacarosa cada una de las subunidades ribosomales purificadas (Fig. 21). El RNA ribosomal de las partículas 30-S defectuosas también mostró anormalidades al ser analizado en gradientes de sacarosa. Los perfiles correspondientes eran difusos, lo que indicaba que el RNA 16-S estaba parcialmente degradado o tenía alterada su estructura secundaria. Estos resultados no se observaron con los RNA aislados de las subunidades 30-S puras obtenidas a partir de los cultivos desarrollados en presencia de putrescina. Los estudios descritos parecen indicar que las poliaminas intervienen directamente en el ensamblado de las subunidades ribosomales determinando posiblemente la correcta interacción del RNA ribosomal y las proteínas. Asimismo estabilizarían la estructura secundaria del RNA ribosomal, lo que con-

tribuiría a protegerlo de la acción de las nucleasas.

En muchos laboratorios se han realizado gran cantidad de experimentos con el fin de lograr el ensamblado de las subunidades ribosomales a partir de sus componentes estructurales (RNA y proteínas). Nomura y col. (130) incubaron a 40 °C durante 30 minutos una mezcla de reacción que contenía RNA ribosomal 16-S y las 21 proteínas purificadas de la subunidad 30-S. En estas condiciones lograron la reconstrucción de esta partícula ribosomal, que resultó activa en una serie de reacciones tales como la síntesis proteica con mensajeros artificiales y naturales, la unión del aminoacil-tRNA, etc. Kopylov y col. (131) demostraron que la estructura secundaria del RNA ribosomal cumple una función decisiva en el ensamblado de las partículas ribosomales, pues de ella depende que se produzca o no la unión de las proteínas al RNA. Nierhaus y col. (132) lograron reconstruir la partícula ribosomal 50-S utilizando para esto las dos especies del RNA (23 S y 5 S) y las 34 proteínas estructurales; esta reacción se realizó en dos etapas: durante la primera de ellas se incubó la mezcla 20 minutos a 40 °C y en la segunda se elevó la temperatura a 50 °C durante 90 minutos en presencia de altas concentraciones de magnesio. Los experimentos realizados por Hosokawa y col. (133) en la reconstrucción de la subunidad 50-S demostraron el papel fundamental que pueden desempeñar las poliaminas en el ensamblado de dicha subunidad. A diferencia

de los experimentos realizados por Nierhaus estos investigadores lograron el rearmado de la subunidad 50-S incubando a 40 °C en una sola etapa a partir de una mezcla de reacción que contenía todos los componentes estructurales y concentraciones óptimas de cationes inorgánicos. En estas condiciones más cercanas a las fisiológicas, el agregado de poliaminas producía partículas ribonucleoproteicas de coeficiente de sedimentación similar al de las subunidades 50-S purificadas; por el contrario la falta de poliaminas en este sistema llevó invariablemente a la formación de partículas de bajo coeficiente de sedimentación. En todos los estudios mencionados, así como también en los descritos en este trabajo se destaca el papel fundamental que desempeña la estructura secundaria del RNA en el ensamblado de las subunidades ribosomales. Posiblemente en los experimentos "in vitro" la temperatura elevada permite que el RNA adopte la configuración adecuada para la reacción del ensamblado de las subunidades, mientras que "in vivo" cumplirían la misma función las concentraciones de cationes inorgánicos y de poliaminas. Por lo tanto el ayuno de estas sustancias provoca en las bacterias alteraciones de los mecanismos biosintéticos y/o de ensamblado de la subunidad 30-S, de tal manera que se producen partículas ribosomales anormales.

En bacterias normales los ribosomas que en un instante dado no participan de la síntesis proteica se encuentran en equilibrio

con las subunidades 30-S y 50-S libres. Este equilibrio está fuertemente desplazado hacia las partículas 70-S debido posiblemente a la gran afinidad mutua que poseen las dos subunidades ribosomales. Cuando las necesidades fisiológicas determinan un mayor flujo de subunidades a los agregados polirribosómicos para aumentar la síntesis proteica, la acción del factor disociante permite la utilización de los monómeros ribosomales desplazando el equilibrio hacia las subunidades.

Por otra parte algunos estudios realizados en *B. stearothermophilus* (86) permitieron aislar un factor asociante de subunidades ribosomales que contiene poliaminas como componentes activos. Este hecho, que confirma las ya conocidas propiedades asociantes de las poliaminas (105), sugirió la posibilidad de que estas cationes orgánicas participen en la regulación del equilibrio $70\text{ S} \rightleftharpoons 30\text{ S} + 50\text{ S}$.

Las investigaciones descritas en este trabajo, utilizando cepas bacterianas deficientes en la biosíntesis de poliaminas permitieron confirmar esta hipótesis. Cuando estas bacterias son sometidas a un ayuno de poliaminas, el nivel intracelular de estas sustancias disminuye hasta valores muy bajos, y no sólo aparecen partículas 30 S deficientes, sino que también disminuye notablemente la afinidad mutua de las subunidades ribosomales por lo que el equilibrio entre monómeros y subpartículas se desplaza hacia la disociación. Cuando se agrega poliaminas a los cultivos

de las bacterias deficientes se provoca un cambio rápido de la distribución ribosomal (Fig. 3) produciéndose un aumento en la cantidad de monómeros 70 S y una normalización de las partículas 30 S. El perfil ribosomal de las bacterias deficientes cuyos cultivos han sido suplementados con putrescina, se vuelve prácticamente idéntico a la distribución obtenida en la cepa silvestre de E.coli. Por otra parte cuando los ribosomas obtenidos de cultivos desarrollados en ausencia de putrescina se dializan contra soluciones "buffer" que contienen una concentración fisiológica de espermidina, parte de las subunidades se asocian y se observa una distribución de ribosomas similar a la obtenida de bacterias cultivadas en presencia de poliaminas (Fig. 8). Además los ribosomas sometidos al tratamiento de diálisis se vuelven más resistentes a la disminución de los niveles de Mg ++ (Figs. 7 y 9). La alteración del perfil ribosomal producido por el ayuno de putrescina es específica de esta deficiencia, como lo demuestran los experimentos en los que se elimina de los medios de cultivo la glucosa o la fuente de nitrógeno, manteniendo en ambos casos la presencia de poliamina. En estas condiciones se obtiene los perfiles característicos del medio MMOP completo (Fig. 6).

Experimentos recientes han demostrado que ambas subunidades ribosomales son capaces de unir espermidina; sin embargo sólo una pequeña cantidad de la poliamina unida a la partícula 30 S es

activa en la asociación de las subunidades (M. García-Patrone y I. D. Algranati). De acuerdo con estos resultados se ha postulado la existencia de dos sitios de unión para la espermidina en la partícula 30 S. El sitio A correspondería a la poliamina que es activa en la asociación, y el sitio B uniría espermidina que no interviene en la asociación. La partícula 50 S presenta sitios de unión del tipo B. Es factible suponer que el agregado de poliaminas a un cultivo de bacterias deficientes, previamente sometidas a un ayuno, aumenta rápidamente los niveles endógenos de estas sustancias, permitiendo un correcto ensamblado de las partículas ribosomales y la saturación de los sitios específicos de unión. Esto lleva a la asociación de subunidades y al restablecimiento de un equilibrio normal entre monómeros 70 S y subpartículas ribosomales.

CONCLUSIONES

Se han postulado múltiples funciones biológicas para las poliaminas. Los resultados aquí presentados demuestran que, además de las funciones ya conocidas (5), estas sustancias ejercen un efecto directo sobre la síntesis proteica, que es independiente de cualquier otro efecto que pueda ocurrir a nivel de la transcripción de los RNA mensajeros. La acción de las poliaminas en el proceso de traducción está íntimamente vinculado con el ensamblado y/o biosíntesis de las subunidades ribosomales (en especial la partícula 30 S).

En las cepas bacterianas auxótrofas para poliaminas, los bajos niveles de putrescina y espermidina producen la aparición de subunidades 30 S estructural y funcionalmente anormales, y el desplazamiento hacia la disociación del equilibrio existente entre monómeros 70 S y subpartículas ribosómicas.

Guillermo Echeverría

G. Algranati

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dudley, H.W. y Rosenheim, O. (1925) Biochem. J. 19: 1934.
- 2) Dudley, H.W., Rosenheim, O. y Starling, W.W. (1927) Biochem. J. 21: 97.
- 3) Harrison, G.A. (1931) Biochem. J. 25: 1885.
- 4) Rosenthal, S.M. y Tabor, C.W. (1956) J. Pharmacol. 116: 131.
- 5) Cohen, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- 6) Tabor, H.S., M. Rosenthal y C.W. Tabor (1958) J. Biol Chem. 233: 907.
- 7) Morris, D.R. y A.B. Pardee (1966) J. Biol Chem. 241: 3129.
- 8) Stevens, L. (1970) Biol. Rev. 45: 1.
- 9) Rosenheim, O. (1924) Biochem. J. 18: 1253.
- 10) Hershey, A.D. (1957) Virology 4: 237-64.
- 11) Ames, B.N., D.T. Dublin y Rosenthal, S.M. (1958) Science, 127: 814-16.
- 12) Ames, B.N. y D.T. Dublin (1960) J. Biol Chem. 235: 769-75.
- 13) Tabor, H., Tabor, C.M. (1964) Ann. Rev. Pharmacol. 16: 247-94.
- 14) Tabor, H. (1960) Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 382-85.
- 15) Johnson, H.G. y M.K. Bach (1968) Arch. Biochem. Biophys. 128: 113-23.
- 16) Michaels, R., y T.T. Tchen (1968) J. Bacteriol. 95: 1966-67.

- 17) Tabor, H. (1962) *Biochemistry* 1: 496.
- 18) Quigley, J.W. y S.S. Cohen (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 2450.
- 19) Bachrach, U. (1970) *Ann. Rev. Microbiol.* 24: 109.
- 20) Mahler, H.R. y B.D. Mehrotra (1963) *Biochim. Biophys Acta* 68: 211.
- 21) Mandel, M. (1962) *J. Mol. Biol.* 5: 435.
- 22) Mager, J. (1955) *Nature* 176: 933.
- 23) Mager, J. (1959) *Biochim. Biophys. Acta.* 36: 429.
- 24) Tabor, C.W. (1960) *Biochim. Biophys Res. Commun.* 2: 117.
- 25) Buchrach, N. y I. Cohen (1961) *J. Gen. Microbiol.* 26: 1-9.
- 26) Fitz-James, P.C. (1958) *J. Bact.* 75: 369.
- 27) Salton, M.R.J. y R.W. Horne (1951) *Biochim Biophys Acta*, 7: 177.
- 28) Grossowicz, N. y M. Ariel (1963) *J. Bact.* 85: 293.
- 29) Stevens, L. (1969) *Biochem J.* 113: 117.
- 30) Cohen, S.S. y J. Lichtenstein (1960) *J. Biol. Chem.* 235: 2112.
- 31) Cohen, S.S. (1970) *Ann. Rev. of N.Y. Acad. Science* 171: 169.
- 32) Calderera, C.M., B. Barbiroli, G. Moruzzi (1965) *Biochem. J.* 97: 84-88.
- 33) Moruzzi, G., B. Barbiroli, C.M. Calderera (1968) *Biochem. J.* 107: 609-13.
- 34) Cohen, S.S. (1970) *Advances in Enz. Regul.* 10: 207.

- 35) Maestre, N. (1967) J. Mol. Biol. 23: 323.
- 36) Rogers, G.T., T.L.V. Ulbrich, y Wszez (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27:372.
- 37) Abraham, K.A. (1968) European J. Biochem.5: 143.
- 38) Fox, C.F., R.I. Gumpert y S.B. Weiss (1965) J.Biol.Chem.240:2101.
- 39) Petersen, E.E. H. Kröger y U. Hagen (1968) Biochim. Biophys. Acta 161: 325.
- 40) Bachrach, U. y A. Weinstein (1970) J. Gen. Microbiol. 60: 159.
- 41) Calderera, C.M. (1969) J. Neurochem. 16: 309.
- 42) Raina, A., J. Jänne, y M. Siimes (1966) Biochim. Biophys. Acta 123: 197.
- 43) Shimizu, H. Y. Kakimoto, I. Sano, (1965) Nature, 207; 1196-97.
- 44) Jänne, J., A. Raina y M. Siimes (1964) Acta Physiol. Scand. 62: 352-58.
- 45) Pegg, A.E., H.G. Williams (1969) J. Biol. Chem. 244: 682-93.
- 46) Jänne, J. y A. Raina (1969) Biochim. Biophys. Acta, 174: 769.
- 47) Dion, A. y E. Nerbst (1970) Ann N.Y. Acad. Sci. 171: 723.
- 48) Raina, A. y S. S. Cohen (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. 55: 1587.
- 49) Cohen, S.S., N. Hoffner, M. Jansen, M. Moore y A. Raina (1967) Proc. Nat. Acad. Sci.57: 721.
- 50) Hirschfield, I.N. H.J. Rosenfeld, Z. Leifer y W.K. Maas (1970) J. Bact. 101: 725.

- 51) Morris, D.R. y C.M. Jorstad (1970) J. Bact. 101: 731.
- 52) Srinivasan, P.R., D.V. Young y W.Maas (1973) J. Bact. 116: 648.
- 53) Moller, M.L., K. Kim (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 46.
- 54) Cocucci, S. y N. Bagni (1968) Zife. Sci. 7: 113.
- 55) Friedman, S.M. I.B. Weinstein (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. 52: 988.
- 56) Martin, R.G. y B.N. Ames (1962) Proc. Nat. Acad. Sci. 48: 2171.
- 57) Nakamoto, T. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. 59: 238.
- 58) Hurwitz, C. y C L. Rosano (1967) J. Biol Chem. 242: 3719.
- 59) Igarashi, K., K. Hikami, K. Suwara y S. Horose (1973) Biochim. Biophys Acta:292: 325.
- 60) Takeda, Y. (1969) Biochim. Biophys Acta, 179: 232.
- 61) Hoagland, M., L. Hecht, y J. Scott (1958) J. Biol. Chem. 231:241.
- 62) Berg, P. (1961) J. Biol. Chem. 236: 200.
- 63) Bluestein, H.G. C.C. Allende, J.E. Allende y G.L. Cantori (1968) J.Biol. Chem. 243: 4693.
- 64) Eldred, E.W. y P.R. Schimmel (1972) Biochemistry,11: 17.
- 65) Takeda, Y. K. Igarashi (1969) Biochem. Biophys. Res. commun. 37: 917.
- 66) Igarashi, K., y Takeda, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta,213:240.

- 67) Loftfield, R.B., I.N. Lövgren, y J. Heinson (1975) J. Biol. Chem. 250: 3854.
- 68) Chakraburttty, K., C.F. Midelfort, A. Steinschneider, y A. H. Mehler (1975) J. Biol. Chem. 250: 3861.
- 69) Mildelfort, C.F., K. Chakraburttty, A. Steinschneider, y A.H. Mehler (1975) J. Biol. Chem.; 250: 3866.
- 70) Santi, D.V., R.W. Webster (1975) J. Biol. Chem. 250: 3874.
- 71) Takeda, Y., y T. Ohnishi (1975) J. Biol. Chem. 250: 3878.
- 72) Igarashi, K., K. Matzusaki y Y. Takeda (1971) Biochim. Biophys. Acta, 254: 91.
- 73) Pastuszyn, A., y R.B. Loftfield (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun 47: 775.
- 74) Loftfield, R.B. y Eigner, E.A. (1967) J. Biol. Chem. 242: 5355.
- 75) Takeda, Y. (1969) Biochim. Biophys. Acta, 182: 258.
- 76) Takeda, Y., I. Suzuka y A. Kaji (1968) J. Biol. Chem. 243: 1975.
- 77) Kaji, H., I. Suzuka, A. Kaji (1966) J. Biol. Chem. 241: 1251.
- 78) Tanner, M.J.A. (1967) Biochemistry, 6: 2686.
- 79) Liquori, A.M., L. Constantino, V. Crescenzi, V. Elia, R. Puliti, V. Vitagliano (1967) J. Mol. Biol. 24: 113.
- 80) Kurland, C.G. (1960) J. Molec. Biol. 2: 83.
- 81) Rosset, R., R. Monier, (1963) Biochim. Biophys Acta, 68: 653.

- 82) Brownlee, G.G., B.G. Barrel, (1967) Nature 215: 735.
- 83) Hardy, S.J.S., G.G. Kurland, G. Mora, P. Voynov (1969) Biochemistry, 9: 2897.
- 84) Kurland, G.G. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41: 391.
- 85) García Patrone, M., N.S. González y I.D. Algranati (1973) Biochim Biophys Acta, 229: 452.
- 86) García Patrone, M., (1973) Tesis doctoral: Ciclo Ribosomal y Factor Asociante de Subunidades Ribosomales.
- 87) García Patrone, M., N.S. González, I.D. Algranati (1971) Proc. Natl Acad. Sci. 68: 2822.
- 88) Tissieres, A., J.D. Watson, D. Schlessinger, R. Hollingworth. (1959) J. Mol. Biol. 1: 221.
- 89) Rival, M., M. Herzberg, y H. Greenshpan (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 34: 261.
- 90) Hindley, J., y D. H. Staples (1969) Nature 224: 964.
- 91) Haselkorn, R., L. Rothman-Dennos (1973) Ann. Rev. Biochem. 42: 397.
- 92) Gilbert, W. (1963) J. Mol. Biol. 6: 389.
- 93) Sabol, S., M. Sillero, K. Iwasaki, S. Ochoa (1970) Nature, 228: 1269.
- 94) Dubnoff, J.S., U. Maitra (1971) Proc. Natl Acad. Sci. 68: 318.
- 95) Gorini, L. (1971) Nature, New Biol. 234: 261.

- 96) Monro, R.E., (1967) J. Mol. Biol. 26: 147.
- 97) Vasquez, D. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34:369.
- 98) Fuller, W., A. Hugson (1967) Nature, 215: 817.
- 99) Mangiarotti, G., D. Schessinger (1966) J. Mol. Biol. 20: 123.
- 100) Koheler, M. (1968) J. Mol. Biol. 36: 371.
- 101) Algranati, I.D., N.S. González y E.G. Bade (1969) Proc. Natl Acad. Sci. 62: 574.
- 102) Azzam, M.E., Perazzolo, C.A. y Algranati, I.D. (1972) Febs Letters, 21: 165.
- 103) Kaempfer, R. (1971) Proc. Natl Acad. Sci. 68: 2458.
- 104) Algranati, I.D. N.S. Gonzalez, M. Garcia Patrone, C.A. Perazzolo y M. E. Azzam (1971) Internat. Symp on protein Synthesis and Nucleic Acids. La Plata -
- 105) Norton, J.W., V. Erdmann y E.J. Herbst (1968) Biochim. Biophys Acta. 155: 293.
- 106) Stevens, L. (1967) Biochem. J. 104: 43 P.
- 107) Stevens, L., M.R. Morrison (1968) Biochem. J. 108: 633.
- 108) Tabor, C.W. y P.D. Kellogg (1967) J. Biol Chem. 242: 1044.
- 109) Colbourn, J.L., B.H. Witherspoon, E.J. Herbst (1961) Biochim. Biophys Acta 42: 422.
- 110) Weiss, R.L. y D.R. Morris (1970) Biochim. Biophys. Acta 204:502.

- 111) Weiss, R.L. y D.R. Morris (1973) *Biochemistry* 12: 435.
- 112) Weiss, R.L. y D.R. Morris (1973) *Biochemistry* 12: 442.
- 113) Weiss, R.L. y D.R. Morris (1973) *Biochemistry* 12: 450.
- 114) Igarashi, K., K. Sugawara y S. Hirose (1975) *J. Biochem.* 77: 753.
- 115) Miskin, R., A. Zamir y D. Elson (1970) *J. Mol. Biol.* 54: 355.
- 116) Zamir, A. R. Miskin y D. Elson (1971) *J. Mol. Biol.* 60: 347.
- 117) Igarashi, K., K. Hara, Y. Takeda (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 897.
- 118) Igarashi, K., K. Sugawara, I. Izumi, C. Nagayama y S. Hirose, (1974) *Eur. J. Biochem.* 48: 495.
- 119) Young, D.V. y P.R. Srinivasan (1972) *J. Bacteriol.* 112: 30.
- 120) Modolell, J. (1971) En J.A. Last y A.V. Laskin (Ed.) *Protein biosynthesis in bacterial systems*. Macel Dekker Inc. New York, P. 1-65.
- 121) Eisenstadt, J.M., P. Lengyel (1966) *Science* 154: 524.
- 122) Hill, W.E., G.P. Rossetti, y K.F. Van Holde (1969) *J. Mol. Biol.* 44: 263.
- 123) Campbell, P.N. y J.R. Sargent (1967) p. 299-311. En P.N. Campbell y J.R. Sargent (Ed.) *Techniques in protein biosynthesis*. Vol. 1. Academic Press Inc., London.
- 124) Lowry, O.H., N.J., Rosenbrough, R.J. Farr, R.J. Randall (1951) *J. Biol Chem.* 193.

- 125) Schlessinger, D., M. Uno, L. Silengo (1974) *Biochemistry* 13: 4268.
- 126) Algranati, I.D., P. Lergyel (1966) *J. Biol Chem.* 241: 1778.
- 127) Algranati, I.D., (1970) *FEBS Lett.* 10: 153.
- 128) Szer, W. (1969) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 35: 653.
- 129) Morris, D.R. (1972) En D.H. Russell (Ed.) *Polyamines in normal and neoplastic growth*. P. 111-122. Raven Press - New York.
- 130) Held, W., S. Mizushima, y M. Nomura (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 5720.
- 131) Kopylov, A.M., N. Vchichkova, A. Bogdanov, S.K. Vasidenco (1975) *Molecular Biology Reports*, 2: 95.
- 132) Nierhaus, K.H., F. Dohne (1974) *Proc. Natl Acad. Sci.* 71: 4713.
- 133) Hosokawa, K., Y. Kiho, L.K. Migata (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 4135.