

Tesis de Posgrado

Poliaminas : Su influencia sobre la fidelidad de la traducción y la acción de antibióticos

Nastri, Horacio Gabriel

1991

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:

Nastri, Horacio Gabriel. (1991). Poliaminas : Su influencia sobre la fidelidad de la traducción y la acción de antibióticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2419_Nastri.pdf

Cita tipo Chicago:

Nastri, Horacio Gabriel. "Poliaminas : Su influencia sobre la fidelidad de la traducción y la acción de antibióticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2419_Nastri.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Poliaminas: Su Influencia Sobre la Fidelidad de la
Traducción y la Acción de Antibióticos**

HORACIO GABRIEL NASTRI

Director: Dr. ISRAEL D. ALGRANATI

*Tesis.
2419
y. 2.*

Instituto de Investigaciones Bioquímicas-"Fundación Campomar"

Tesis realizada para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas.

1991.

A Marisa.
Aunque esta Tesis lleve mi nombre
nos pertenece a los dos, como toda
mi vida

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Israel D. Algranati por su constante apoyo, sus consejos y el tiempo brindado para mi formación y la concreción de este trabajo.

A las autoridades del IIB-"Fundación Campomar" por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

A la Dra. Sara H. Goldemberg por sus consejos y ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Cecilia Sánchez, Nelida González, Manuel García-Patrone y Carmela Sidrauski por los momentos compartidos.

A mis compañeros del Instituto y especialmente a mis amigos Eduardo Guillen, Cecilia Sánchez, Juan José Miret y Diana Tolmasky por los momentos de lucha compartidos.

A mis amigos Laura, Jorge, Pablo, Patricia, Marcelo y Daniel que me apoyaron a lo largo de todos estos años.

A todas las personas que me prestaron su computadora para poder escribir este trabajo: Mi hermano Javier; Nora y Gabriel, Laura Dada, Dr. Ricardo Wolosiuk; Dra. Clara Krisman y al Dr. Pedro Salas por ayudarme en el proceso de impresión.

A todo el personal del Instituto sin cuya tarea y apoyo este trabajo no podría haber sido realizado.

A mis padres y a toda mi familia por brindarme en todo momento el apoyo que me permitió llegar al fin

INDICE.

	página
<u>I-INTRODUCCION.</u>	
<u>1-Poliaminas</u>	1
1-1. Características generales.	1
1-2. Poliaminas en bacterias.	3
1-3. Distribución intracelular de las poliaminas.	5
1-4. Poliaminas poco frecuentes.	6
1-5. Poliaminas derivadas.	7
<u>2-Biosíntesis de poliaminas en bacterias.</u>	10
2-1. Biosíntesis de Putrescina.	10
2-2. Biosíntesis de espermidina.	11
2-3. Organización genética de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.	12
<u>3-Regulación de la biosíntesis de poliaminas en E.coli.</u>	14
3-1. Control por los niveles intracelulares de arginina y ornitina.	14
3-2. Regulación por niveles intracelulares de poliaminas.	15
3-3. Regulación por antizima.	16
3-4. Regulación por nucleótidos de guanina y AMPc.	18
3-5. Regulación por la osmolaridad del medio.	19
<u>4-Funciones celulares y moleculares de las poliaminas.</u>	20
4-1. Interacción de las poliaminas con el DNA.	22
4-1-1. Interacciones "in vitro".	22

4-1-2. Replicación del DNA en células intactas.	24
4-2. Interacción de las poliaminas con el RNA.	25
4-2-1. Estudios "in vitro".	25
4-2-2. Síntesis de RNA.	27
4-3. Biosíntesis de proteínas.	27
4-3-1. Efecto de las poliaminas sobre la estructura y propiedades de los ribosomas.	28
4-3-2. Biosíntesis de proteínas "in vivo".	29
4-4. Estructura y función de las membranas	30
<u>5-Antibióticos aminoglucósidos.</u>	31
5-1. Sitio de acción de la estreptomicina.	32
5-2. Captación de la droga.	33
5-3. Mecanismo de acción de la estreptomicina .	34
5-4. Resistencia a los antibióticos aminoglucósidos.	34
5-5. Otros antibióticos aminoglucósidos.	35
<u>6-Fidelidad de la síntesis proteica.</u>	36
6-1-Errores de lectura.	38
<u>7-Objetivos del presente trabajo.</u>	40
<u>II-MATERIALES Y METODOS.</u>	42
1-Cepas Bacterianas.	42
2-Medios utilizados.	42
2-1. Medio TYE	42

2-2. Medio mínimo	43
2-3. Medio Mops	43
3-Conservación de las cepas bacterianas.	43
4-Condiciones de cultivo.	44
5-Agotamiento de poliaminas de los cultivos bacterianos.	44
6-Síntesis de proteínas "in vivo"	44
7-Ayuno de aminoácidos	45
8-Niveles de captación de aminoácidos	45
9-Determinación de la velocidad de degradación de proteínas	46
9-1. Durante el transcurso de un ayuno de leucina o isoleucina.	46
9-2. Durante la presencia de estreptomicina (25 µg/ml).	47
10-Distribución intracelular de los péptidos nacientes en presencia de estreptomicina.	47
10-1. Soluciones para la lisis de bacterias	48
11-Acción de los antibióticos aminoglucósidos.	48
11-1. Reversibilidad de la acción de la estreptomicina	49
12-Análisis de proteínas por electroforesis.	49
12-1. Tratamiento de las muestras para electroforesis monodimensionales.	49
12-2. Tratamiento de las muestras para electroforesis bidimensional.	50
12-3. Electroforesis monodimensional.	51
12-4. Electroforesis bidimensional.	52
12-4-1. Isoelectroenfoque.	52
12-4-2. Segunda dimensión.	52
13-Infección de <u>E.coli</u> LM 27 con el bacteriófago MS 2.	53
14-Transformación con un plásmido que confiere resistencia a kanamicina.	54
15-Obtención rápida de DNA plasmídico .	55

16-Obtención de kanamicina fosfotransferasa	55
16-1. Determinación de actividad de kanamicina fosfotransferasa.	56
17-Obtención de RNA total de E.coli.	58
17-1. Análisis de la integridad del RNA.	59
17-2. Determinación de la concentración de RNA	59
17-3. Cuantificación de RNA mensajero por Dot-Blot.	59
17-3-1. Tratamiento de las muestras.	60
17-3-2. Hibridización.	61
17-3-3. Soluciones utilizadas en la electroforesis de RNA y en su cuantificación por Dot-Blot	61
18-Preparación del fragmento Hind III-Bgl II del plásmido pVK 102.	62
18-1. Marcación de la sonda producida con [³² P]dCTP y posterior purificación de la misma.	64
18-2. Determinación de la concentración de DNA de plásmido.	64
19-Determinación de la concentración de proteínas.	64
<u>III-RESULTADOS.</u>	65
1-Características del crecimiento de diferentes cepas de <u>E.coli</u> deficientes en poliaminas.	65
2-Efectos del ayuno de aminoácidos sobre la síntesis proteica en bacterias deficientes en poliaminas.	66
2-1. Capacidad de síntesis proteica durante el ayuno de aminoácidos.	69
2-2. Captación de aminoácidos.	71
2-3. Capacidad de síntesis proteica en cultivos realizados con diversas fuentes de carbono.	71
2-4. Determinación de los niveles intracelulares de proteólisis.	72

2-5. Análisis cualitativo de las proteínas sintetizadas durante los ayunos de aminoácidos.	74
2-6. Tiempo necesario de presencia de putrescina para alterar la respuesta al ayuno.	76
3-Influencia de poliaminas en la acción de antibióticos aminoglucósidos.	78
3-1. Efectos de la estreptomicina sobre la velocidad de crecimiento de células deficientes en poliaminas.	79
3-2. Síntesis de proteínas en presencia de estreptomicina.	81
3-3. Influencia de la velocidad de desarrollo celular sobre la acción de la estreptomicina.	83
3-4. Análisis de las proteínas sintetizadas en presencia de estreptomicina.	85
3-5. Influencia de la estreptomicina en la variación de los niveles intracelulares de proteólisis .	86
3-6. Influencia de la estreptomicina en la distribución intracelular de péptidos nacientes.	87
3-7. Efectos de la presencia de estreptomicina durante la síntesis proteica en bacterias infectadas con fagos.	88
3-8. Tiempo necesario de presencia de poliaminas para la acción de estreptomicina.	90
3-9. Reversibilidad de la acción de la estreptomicina.	92
3-10. Sensibilidad a otros antibióticos aminoglucósidos.	98
4-Influencia de los niveles endógenos de poliaminas en la resistencia a kanamicina codificada en plásmidos.	95
4-1. Velocidad de crecimiento de las cepas transformadas. Expresión de resistencia a kanamicina .	95
4-2. Capacidad de síntesis proteica de <u>E.coli</u> LM 27 pVK 102 y LM 53 pVK 102 en presencia de 50 μ g/ml de kanamicina.	96
4-3. Niveles de actividad de kanamicina fosfotransferasa.	98

4-4.Análisis de las proteínas producidas por la cepa E.coli LM 27 pVK 102 en presencia de kanamicina.	99
4-5.Niveles de RNA mensajero de la enzima kanamicina fosfotransferasa.	100
<u>IV-DISCUSSION</u>	104
1-Influencia de las poliaminas en la fidelidad de la traducción	105
2-Influencia de poliaminas en la acción de antibióticos aminoglucósidos.	110
3-Influencia de poliaminas en la expresión de resistencia a kanamicina	113
<u>V-CONCLUSIONES</u>	115
<u>VI-BIBLIOGRAFIA.</u>	116

ABREVIATURAS

aa ~ tRNA sintetasa

ADC

Bis acrilamida

Km

MGBG

Mops

NP-40

ODC

PAGE

SDS

Sm

β MSH

TCA

TEMED

Tris

Aminoacil tRNA sintetasa

Arginina Decarboxilasa

N,N'-metilen bisacrilamida.

Kanamicina sulfato

Metil glioxalbis(guanilhidrazona)

Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

Nonidet P-40

Ornitina Decarboxilasa

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Dodecil sulfato de sodio

Estreptomina sulfato

2-mercapto etanol

Acido tricloro acético

N,N,N',N'-Tetrametilen etilen diamina.

Tris(hidroximetil) aminometano

I-INTRODUCCION.

1-Poliaminas.

1-1. Características generales.

Las poliaminas son compuestos policatiónicos orgánicos presentes en la mayoría de los seres vivos, que participan en una gran variedad de procesos biológicos.

Las poliaminas más comunes, de mayor distribución en la naturaleza, son la putrescina, la espermidina y en menor medida la espermina.

Putrescina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Espermina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

La principal diferencia entre estos compuestos y los cationes inorgánicos, como el sodio, potasio y magnesio, es su naturaleza anfipática. Esta propiedad unida a la posibilidad de soportar una serie de acetilaciones y desacetilaciones, les permite a las poliaminas redistribuirse en medios hidrofílicos o hidrofóbicos.

Por otro lado, la cadena alifática de cuatro carbonos de la putrescina y las cadenas de la espermidina y la espermina, le confieren a estas sustancias una gran flexibilidad estructural lo que facilita la formación de asociaciones específicas con estructuras de diferente estereoquímica presentes en proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Como consecuencia de tal asociación se origina

una orientación espacial de las cargas positivas de las poliaminas dentro de límites bien definidos, las cuales pueden afectar específicamente a grupos orientados en forma apropiada en la misma macromolécula o en otra adyacente originando alteraciones en la conformación de las mismas.

Las poliaminas juegan un rol fundamental en los metabolismos celulares, siendo prueba de ello la necesidad de su presencia para el crecimiento óptimo tanto de células procariotas (1,2,3) como eucariotas (4,5). En algunas mutantes obtenidas en diversos organismos como Saccharomyces cerevisiae (6,7), Neurospora crassa (8) y Aspergillus nidulans (9), el requerimiento es absoluto y en ciertos organismos incapaces de producir estas sustancias, como Hemophylus parainfluenzae y Pasteurella tularensis, son necesarias como factores de crecimiento (10,11). Por otra parte se ha demostrado la importancia de las poliaminas en procesos tales como el crecimiento y proliferación de células animales (5), la fisiología del sistema nervioso (12), la proliferación tumoral (13) y la proliferación de parásitos como el Trypanosoma b. brucei (14).

Aunque es claro que la presencia de estas aminas es esencial para el crecimiento celular, aún no se han podido establecer completamente sus funciones "in vivo". Se reconoce que participan en una gran variedad de procesos biológicos tales como la síntesis de DNA, RNA y proteínas (15), la estabilidad de biomembranas (16), la transglutaminación (17) y la regulación de proteínas kinasas (11,18).

La presencia de poliaminas fue descrita originalmente en tejidos animales; sin embargo tanto la biosíntesis como los efectos fisiológicos de estas sustancias se dilucidaron primero en microorganismos.

Estudios realizados en células procariotas y eucariotas confirmaron la universalidad de la presencia de estas sustancias y de la mayoría de los pasos que llevan a su biosíntesis.

El uso de microorganismos para el estudio de estas aminas ha sido de gran utilidad debido a la posibilidad de llevar a cabo, en estos sistemas, análisis de tipo genético, metabólico y enzimático. En particular la obtención de cepas mutantes de Escherichia coli y de levadura incapaces de producir estas aminas, ha resultado ser una herramienta fundamental en el estudio de las funciones de estas poliaminas "in vivo".

1-2. Poliaminas en bacterias.

Las bacterias Gram negativas como Escherichia coli poseen altas concentraciones de poliaminas (19). En cepas de Escherichia coli B o K12 cultivadas en un medio mínimo a pH neutro y cosechadas en fase logarítmica media el contenido de putrescina es del orden de 13,1 $\mu\text{mol/gr}$ de células húmedas, mientras que el de espermidina es de 4,7 $\mu\text{mol/gr}$. De este modo la concentración intracelular de putrescina es aproximadamente 0,02 M y la de espermidina 0,006 M (20,21,22), las cuales resultan ser comparables a la concentración intracelular de Mg^{2+} (23).

En las circunstancias descritas anteriormente no es posible detectar putrescina ni espermidina libres en el medio así como tampoco otras diaminas o poliaminas en las células o en el medio de cultivo. En contraste a lo observado en levaduras o en tejidos animales la presencia de espermidina no es detectable en cultivos de E.coli desarrollados en un medio mínimo libre de poliaminas.

La concentración intracelular de poliaminas es profundamente afectada por las condiciones de crecimiento del cultivo, siendo importante entre otros factores el pH del medio, la aereación, la presencia de ciertos aminoácidos tales como la arginina y lisina, la osmolalidad del medio y la edad del cultivo (21,22,24). Cuando se desarrolla E.coli en un medio rico las concentraciones intracelulares de poliaminas son mucho mayores (19) debido tanto a la captación de poliaminas del medio como a la descarboxilación de los precursores acumulados ornitina y arginina. Se conoce la existencia de sistemas de transporte activo para putrescina y espermidina (20), los que incluso permiten la captación de espermina por E.coli a pesar que este catión normalmente está ausente en estas células. Recientemente se han obtenido mutantes de E.coli deficientes en el transporte de poliaminas (25), lo que permitió clonar y estudiar con mayor detalle los sistemas empleados por la célula para la captación de poliaminas. Existe un transporte relativamente inespecífico que es común para putrescina y espermidina y se ha descrito la existencia de otros dos sistemas de transporte exclusivos para putrescina

En las mutantes defectuosas en la síntesis de poliaminas desarrolladas en medio mínimo libre de aminas hay un marcado descenso o ausencia de putrescina y espermidina. Estas células, sin embargo, presentan pequeñas cantidades de cadaverina (1-5 diamino pentano) y de aminopropil cadaverina, las cuales normalmente no son producidas por Escherichia coli (1,26,27,). El significado fisiológico de estas aminas poco frecuentes se desconoce ya que no pueden reemplazar totalmente a las poliaminas clásicas en sus funciones (8), aunque la aminopropil cadaverina en particular, es considerada como una poliamina compensatoria ya que puede reemplazar a la espermidina "in vitro" y estimula el crecimiento "in vivo" (28).

1-3. Distribución intracelular de las poliaminas.

Hasta el momento no se ha podido demostrar que las poliaminas se localicen en estructuras intracelulares específicas. Durante la ruptura celular se origina una amplia redistribución de los cationes intracelulares y el carácter fuertemente básico de estos compuestos les permite formar complejos con los poliácidos intracelulares. De esta forma aunque ciertas organelas aisladas, como los ribosomas, contengan poliaminas no se puede afirmar categóricamente que este hecho refleje la distribución "in vivo" previa a la lisis (29). Estudios recientes realizados "in vivo" empleando técnicas de resonancia magnética nuclear han demostrado la asociación no covalente de poliaminas a estructuras celulares, posiblemente ribosomas o estructuras que contengan membranas (30). De esta forma se probó la existencia de complejos entre el tRNA y la espermidina "in vivo" (31). Los estudios llevados a cabo han demostrado la presencia de aproximadamente 13 sitios de interacción entre la espermidina y la molécula de tRNA, de los cuales solamente entre 2 y 4 moléculas de espermidina se encuentran asociadas por uniones de tipo electrostático de alta afinidad mientras que el resto presenta interacciones débiles debidas, principalmente, a uniones de tipo puente hidrógeno ubicadas en el espacio de localización de los contraiones del ácido nucleico.

En Escherichia coli se ha descrito la existencia de dos poblaciones de poliaminas con comportamiento independiente (32), una estable y otra (el 60% del contenido total de estas sustancias) que interviene activamente en el metabolismo de poliaminas y sufre un alto recambio. Esto indicaría que parte del contenido intracelular de estas aminas, la población estable, no se encuentra libre en la célula;

algo similar a lo que ocurre en el hongo Neurospora crassa donde la putrescina y su precursor, la ornitina, se encuentran localizadas en vacuolas (33-34).

A pesar del carácter fuertemente básico de estos compuestos y de la alta afinidad que poseen por los ácidos nucleicos se puede descartar que el total de las poliaminas esten localizadas en el núcleo, ya que se ha descrito que las minicélulas contienen una alta concentración de poliaminas a pesar de no poseer DNA (35).

1-4. Poliaminas poco frecuentes.

A pesar que en la mayoría de los microorganismos las únicas poliaminas presentes son putrescina, espermidina y espermina, día a día se describe un número creciente de organismos que contienen otros compuestos menos frecuentes.

En el organismo Thermus thermophilus (36,37,38) y en otras bacterias termófilas se describieron una serie de poliaminas nuevas .

<u>Nombre trivial</u>	<u>Estructura química</u>
Noespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
sym-Homoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Noespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Termoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Caldopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Homocaldopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Caldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Homocaldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Tris (3-aminopropil)amina	$(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3)_3\text{N}$
Tetrakis(3-aminopropil)amonio	$(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3)_4\text{N}^+$

Tabla I: Estructura de poliaminas poco frecuentes

En las bacterias termófilas extremas el contenido de poliaminas depende de la temperatura de desarrollo celular, predominando, a temperaturas elevadas, las tetra y penta aminas. Se desconoce la función de estas poliaminas raras en dichos organismos, aunque se piensa que podrían actuar estabilizando al DNA o a organelas como los ribosomas, frente a las altas temperaturas. Algunos de estos compuestos han sido detectados también en bacterias mesófilas, como en ciertos géneros de Rhizobium (39) en los cuales se postula su asociación con la adaptación celular durante el stress producido en el proceso de nodulación.

Un derivado de la putrescina, la hidroxiputrescina se aisló en Pseudomonas sp (40) y Pseudomonas acidovorans (41), demostrándose en el primer caso que esta sustancia es más eficiente que la putrescina para estabilizar la estructura de los ribosomas (42)

1-5. Poliaminas derivadas.

Generalmente las poliaminas se encuentran en forma libre, pero se las puede hallar como derivados acetilados, conjugados con otros compuestos químicos, formando parte de moléculas complejas o de alcaloides y unidas a estructuras macromoleculares (43,44).

Los principales derivados acetilados de las poliaminas son:

N¹-acetil espermidina
N⁸-acetil espermidina
N-acetil putrescina
N¹-N⁸diacetil espermidina

En bacterias se encontró acetilación significativa de las aminos sólo en las siguientes situaciones

1) Durante el almacenamiento del cultivo a bajas temperaturas donde hay producción de mono acetil putrescina y mono acetil espermidina (45).

2) Luego de adición al medio de cultivo de exceso de espermidina o espermina se induce la producción de monoacetil espermidina o monoacetilespermina.

3) También se han encontrado poliaminas acetiladas en células capaces de sobreproducir estas poliaminas (46)

Entre los principales compuestos conjugados que forman estas poliaminas se pueden mencionar:

1) glutationil-espermidina: este compuesto se aisló de cultivos de E.coli en fase estacionaria. Se desconoce cual es su función en este organismo (43).

2) Bis-glutationil espermidina: este compuesto se describió originalmente en Crithidia y Trypanosoma y recibió el nombre de tripanotona. Se postula que actúa como un cofactor en la reducción del glutation (47).

3) Las poliaminas o sus derivados forman parte de las estructuras de varios antibióticos, por ejemplo:

a) los aminoglicósidos bleomicina A5 y A6 (48)

b) las edeinas A y B. Estos antibióticos aislados y caracterizados de Bacillus brevis VM4, están formados por oligopéptidos lineales conjugados a espermidina (edeina A) o a guanil espermidina (edeina B) (42).

4) Varios sideroforos, como la agrobactina y parabactina, involucrados en el transporte de hierro de diversos microorganismos son derivados catecólicos de la amida terciaria de la treonil espermidina (49).

Se han encontrado macromoléculas que poseen alguna poliamina unida en forma covalente siendo los ejemplos más importantes:

1) la hipusina: en este caso la hidroxiputrescina se encuentra unida a un residuo de lisina de una proteína ácida de PM: 18000, la cual se identificó como un factor de iniciación de la síntesis proteica en eucariotes superiores (50)

2) la α -putrescinil timina: esta pirimidina modificada reemplaza el 50 % de los residuos de timina en el DNA del bacteriófago Φ W-14, y es el único ejemplo de unión covalente de una poliamina a un ácido nucleico (51).

2-Biosíntesis de poliaminas en bacterias.

La mayoría de los microorganismos bacterianos son capaces de producir solamente putrescina y espermidina, aunque existen excepciones como Acetobacteria spp capaz de sintetizar espermina (52). En cambio las levaduras, hongos, algunos protozoos eucarióticos así como las plantas y organismos superiores son capaces de producir las tres poliaminas principales (53)

En la Figura 1 se puede observar los diferentes caminos biosintéticos para la obtención de poliaminas dilucidados en microorganismos, plantas y organismos superiores. Día a día se amplian los conocimientos acerca de las estrategias empleadas por nuevos sistemas para la producción de estas aminas y la regulación de las enzimas involucradas.

2-1.Biosíntesis de Putrescina.

En bacterias la putrescina es producida por dos vías alternativas a partir de ornitina o arginina.

1) Por decarboxilación de la ornitina mediada por la enzima ornitina decarboxilasa (ODC).

2) Por acción de la arginina decarboxilasa (ADC) sobre la arginina se produce agmatina la cual sufre posteriormente la eliminación de urea mediada por la agmatina ureohidrolasa (agmatinasa) (54)

En Escherichia coli se ha descrito una forma inducible (55) y otra constitutiva de cada una de las decarboxilasas mencionadas.

Las formas inducibles son biodegradativas e inducidas por el desarrollo de las células en un medio semianaeróbico a pH ácido y por la presencia de un exceso de sustratos. Si bien estas enzimas han sido purificadas y caracterizadas (56,57,58) no se dispone información sobre la ubicación de sus genes en el genoma bacteriano, no habiéndose podido detectar la presencia de la ODC inducible en la mayoría de las cepas de E.coli K12 utilizadas comunmente en los laboratorios (59)

Cuando se desarrolla E.coli K12 en condiciones normales de cultivo a pH neutro, sólo se observa la presencia de las decarboxilasas constitutivas. Estas enzimas que han sido caracterizadas (52,60), purificadas a homogeneidad (61,62) y clonadas (63), requieren la presencia de fosfato de piridoxal y representan puntos de regulación en la biosíntesis de poliaminas ya que son inhibidas y su producción reprimida por las mismas poliaminas, especialmente por espermidina (16,64).

2-2.Biosíntesis de espermidina.

Como se observa en la Figura 1, la espermidina se produce por la transferencia de un grupo 3-aminopropilo a la putrescina, mediada por la enzima espermidina sintetasa. Estudios realizados "in vitro" han demostrado que esta enzima dimérica de 73.000 D de peso molecular puede utilizar también cadaverina y espermidina como sustratos para producir otras poliaminas, aunque con baja eficiencia (65).

El compuesto dador del grupo 3-aminopropilo es la S-adenosil metionina decarboxilada. Su importancia radica en que un bloqueo en la biosíntesis de este compuesto impide la producción de espermidina. La primera enzima involucrada en esta vía es la metionina adenosil transferasa, la cual incorpora

un grupo adenosilo cedido por la adenosina trifosfato (ATP) a la metionina. El mecanismo de la reacción, que ha sido estudiado en detalle mediante el uso de enzima purificada a homogeneidad, involucra la formación de un intermediario donde la enzima se encuentra unida a un grupo politrifosfato (66).

La S-adenosil metionina es posteriormente decarboxilada por la S-adenosil metionina decarboxilasa. Esta enzima, de 108.000 D de peso molecular está compuesta por seis subunidades idénticas, cada una unida a un grupo piruvoilo esencial y posee requerimiento de cationes divalentes. La S-adenosil metionina decarboxilasa obtenida de cualquier fuente no requiere fosfato de piridoxal, lo cual la diferencia de la mayoría de las decarboxilasas conocidas, existiendo evidencias de la formación de una base de Schiff entre la S-adenosil metionina y el grupo piruvoilo de la enzima (67).

2-3.Organización genética de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.

Los genes de todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas han sido localizados y mapeados en el genoma de Escherichia coli, tal cual se ve en la Tabla II

<u>Enzima</u>	<u>Gen</u>	<u>Ubicación en el mapa genético</u> (min)	<u>Ubicación en el mapa físico</u> (Kb)	<u>Referencias</u>
Ornitina decarboxilasa	speC	64	3123-3121	(68,69)
Arginina decarboxilasa	speA	63,5	3099-3097	(68,69)
Agmatinasa	speB	63,5	3097-3096	(68,69)
S-adenosil metionina transferasa	metK	63,7	3100-3101	(68,69)
S-adenosil metionina decarboxilasa	speD	2,9	137,5-140	(68,70)
Espermidina sintetasa	speE	2,9	137,5-140	(68,70)

Tabla II: Descripción de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas en E.coli.

Los datos presentados en la tabla II muestran que los genes responsables de la síntesis de putrescina se encuentran muy próximos entre sí, siendo su ubicación relativa en el genoma bacteriano:

metC glc speC metK speB speA serA (20,62,71).

Hay que tener en cuenta que a pesar de su proximidad estos genes no conforman un operon. En cambio los genes speD y speE forman parte de un operon con un promotor común (72,70).

Las enzimas mencionadas anteriormente han sido clonadas y expresadas mediante la utilización de plásmidos de alto número de copias, una técnica muy utilizada en los estudios sobre la regulación de estas enzimas y el metabolismo de poliaminas.

3.Regulación de la biosíntesis de poliaminas en E.coli.

Varios factores afectan la producción y los niveles intracelulares de poliaminas en E.coli aunque todavía no se conocen completamente los mecanismos involucrados. La regulación de la biosíntesis es necesariamente compleja debido al gran número de vías metabólicas involucradas, las cuales a su vez interactúan entre sí. Como se mencionó anteriormente existen dos caminos para la formación de putrescina, uno para la de S-adenosil metionina decarboxilada y otro para la producción de ornitina y su posterior conversión a arginina. A esto debe agregarse que algunos de los compuestos que intervienen en las reacciones anteriores, como arginina, metionina y S-adenosil metionina, participan en otras reacciones celulares y sus niveles son regulados por los productos finales de las mismas.

3-1.Control por los niveles intracelulares de arginina y ornitina.

La utilización de una u otra vía alternativa en la biosíntesis de putrescina estaría regulada parcialmente por el contenido endógeno de ornitina (30). En condiciones normales de cultivo, en medio mínimo sin poliaminas, es energéticamente favorable para el sistema producir putrescina por la decarboxilación de la ornitina. Si en cambio, las células se desarrollan en un medio suplementado con arginina, esta inhibe y reprime la producción de su precursor, la ornitina (32), debiendo utilizarse obligatoriamente la vía menos propicia de la arginina. Por otra parte la localización periplásmica de la arginina decarboxilasa facilita el acceso al sustrato por esta enzima (73).

De todas maneras, la síntesis total de poliaminas es considerable aún con niveles intracelulares muy bajos de ornitina y arginina, ya que mutantes de E.coli incapaces de producir ornitina, desarrolladas en quimiostato con cantidades limitantes de ornitina o arginina son capaces de mantener el nivel de poliaminas entre un 16% y un 50% de los valores normales. En esas condiciones entre un 9% y un 18% de los aminoácidos suministrados son convertidos en putrescina o espermidina (21).

El contenido endógeno de espermidina en las distintas condiciones descriptas se mantiene mucho más constante que el de putrescina. Al desarrollar las células en un quimiostato en condiciones limitantes para arginina, se observa que el contenido de putrescina disminuye un 97%, mientras que el de espermidina sólo lo hace un 35% (21). Lo mismo ocurre en mutantes auxótrofas para poliaminas en donde el contenido de espermidina se reduce sólo parcialmente (2,74)

3-2.Regulación por niveles intracelulares de poliaminas.

Los niveles de las propias poliaminas tienen efecto sobre las enzimas involucradas en su producción. Se puede afirmar por estudios realizados "in vivo" e "in vitro" que la putrescina y la espermidina ejercen funciones inhibitorias y represoras tanto sobre la ornitina decarboxilasa como sobre la arginina decarboxilasa (21). Estudios recientes indican que la amina con principal efecto regulador es la espermidina, la cual actúa principalmente sobre la S-adenosil metionina decarboxilasa (62). Esta afirmación se basa en los siguientes hechos:

a) en cepas sobre-productoras de putrescina los niveles intracelulares de esta amina se mantienen constantes por eliminación del exceso al medio de cultivo.

b) los excesos de espermidina, en cambio, no pueden ser excretados y sus niveles son regulados limitándose su síntesis por inhibición de la S-adenosil metionina decarboxilasa y en menor medida de las enzimas responsables de la síntesis de putrescina.

La regulación de los niveles de espermidina es fundamental, ya que si bien esta sustancia es necesaria para el crecimiento normal, altas concentraciones de la misma (mayores de 500 $\mu\text{g/ml}$) tienen efectos bactericidas en E.coli (75).

Los niveles intracelulares de ornitina también dependen del contenido intracelular de poliaminas. Trabajando con cepas de E.coli deficientes en la enzima ornitina decarboxilasa, Cataldi y col. demostraron que en estas bacterias la ausencia de poliaminas provoca la sobreproducción de ornitina, lo que indica que en el camino biosintético de este aminoácido existen uno o más pasos, aún no caracterizados, regulados por los niveles endógenos de estos poliaminas (76).

3-3.Regulación por antizima.

Canellakis y colaboradores (77,78,79) descubrieron en varias líneas celulares de mamíferos una proteína inducida por poliaminas con actividad inhibitoria sobre la ODC. Esta proteína, que se denominó antizima, es capaz de asociarse a la enzima e inhibirla reversiblemente en forma no competitiva. Las propiedades empleadas para identificar a una proteína como antizima son:

- 1) Inhibición independiente del tiempo y estequiométrica de la ornitina decarboxilasa.
- 2) Reversión de la acción ejercida sobre la ornitina decarboxilasa mediada por la acción de un inhibidor de la antizima denominado anti-antizima.

3) Propiedades fisicoquímicas como reversibilidad de la asociación con la ODC.

Otras propiedades comunes a varias antizimas son: el peso molecular, el comportamiento inmunológico y la alta velocidad de recambio.

Aunque las antizimas de la mayoría de los tejidos poseen un peso molecular comprendido entre 20.000 y 27.000 D, las antizimas de timo, bazo y glándula mamaria de rata poseen el doble de estos valores. No se conoce el motivo de esta heterogeneidad, pero podría deberse a agregación natural o artificial o a la asociación con alguna proteína diferente a la ODC.

Las antizimas poseen una vida media breve y la inducción de las mismas ha sido caracterizada como un proceso postranscripcional (80). Existen varios postulados sobre el rol fisiológico que cumplirían estas proteínas. Canellakis (79) propuso que la antizima podría facilitar la degradación de la ornitina decarboxilasa o favorecer el almacenamiento de la misma en una forma tal que pudiera ser utilizada durante una respuesta rápida a la falta de poliaminas. La evidencia disponible indica que se encuentra involucrada principalmente en la degradación de la ODC, al menos en células animales.

Hasta la fecha, a pesar de la amplia distribución de esta proteína en los distintos tejidos de animales (81,82), aves (83), plantas (84) y bacterias (78,85) sólo se ha logrado purificar la antizima de hígado de rata (86). El trabajo con esta proteína es complejo debido a los niveles celulares extremadamente bajos de la misma. Recientemente se logró clonar un DNA complementario de la antizima de hígado de rata y se probó la presencia de la misma y la conservación de su estructura con la evolución en especies diferentes de vertebrados (87-88).

En E.coli existen tres proteínas, una ácida y dos básicas con actividad de antizima cuyos niveles se incrementan en presencia de poliaminas (85). Las proteínas básicas se caracterizaron como las proteínas ribosomales S20/L26 y L34 (89).

Canellakis afirma que los niveles de estas proteínas se elevan en aquellas cepas capaces de sobreproducir ornitina decarboxilasa y que esta reacción es específica ya que los niveles de otras proteínas ribosomales no varían. Por otra parte, la sobreproducción de las proteínas S20/L26 y L34 origina una disminución en los niveles de ODC y en los de su RNA mensajero (90,91). Igarashi, sin embargo, sostiene que no es posible detectar regulación de la ODC por antizima en E.coli (64) y sugiere que el fenómeno descrito por Canellakis es un artificio originado por la sensibilidad de la ornitina decarboxilasa a una gran variedad de proteínas básicas (92). Si bien la discusión sigue abierta, hay que tomar en cuenta que la expresión en E.coli de la antizima de hígado de rata no produce variación alguna en los niveles intracelulares de poliaminas (78), aunque este hecho puede solo reflejar la falta de relación entre las antizimas de bacterias y de células animales.

3-4.Regulación por nucleótidos de guanina y AMPc.

Aunque no se ha establecido "in vivo" la importancia de estos compuestos en la biosíntesis de poliaminas, existen observaciones que merecen ser tomadas en cuenta.

-La ornitina decarboxilasa es estimulada "in vitro" por GTP (15,93) e inhibida y su síntesis reprimida por el ppGpp (84,94); otros estudios indican que la

producción de ppGpp es estimulada por poliaminas en aquellas mutantes deficientes en la mismas (95).

-Se han descrito ciertas evidencias sobre un control negativo del AMPc sobre la transcripción "in vivo" de la ornitina decarboxilasa, la arginina decarboxilasa y la agmatina ureohidrolasa en E.coli (96).

De todas maneras es necesario realizar estudios más completos para poder establecer el significado fisiológico de estas observaciones.

3-5.Regulación por la osmolaridad del medio.

Se ha descrito una relación entre la osmolaridad del medio de cultivo y el contenido de poliaminas en E.coli. A medida que la osmolaridad del medio disminuye a expensas del potasio, la síntesis y el contenido de putrescina aumenta, mientras que los niveles de espermidina permanecen constantes. Este fenómeno ocurre inmediatamente después de transferir las células a un medio de baja osmolaridad y dicha síntesis se produce por la vía de la ornitina decarboxilasa. Este proceso que se originaría por activación de enzima preexistente (97,98) no se ha caracterizado a nivel molecular.

4-Funciones celulares y moleculares de las poliaminas.

Las funciones fisiológicas de las poliaminas son conocidas solo parcialmente, aunque muchas de sus acciones han sido caracterizadas y se realizan grandes esfuerzos para dilucidar los mecanismos moleculares que relacionan la acción de estas sustancias con las funciones celulares.

Las formas protonadas de las poliaminas son de naturaleza catiónica; por este motivo las funciones que cumplen son comparadas comunmente con las de los cationes inorgánicos. La participación de las poliaminas en general no se considera en aquellos procesos que también pueden ser llevados a cabo por la presencia de cationes inorgánicos. A pesar de los esfuerzos empleados para identificar las funciones específicas donde las poliaminas no puedan ser reemplazadas por concentraciones fisiológicas de otros cationes, éstas no deben considerarse como las únicas importantes, ya que las poliaminas contribuyen en forma significativa al balance catiónico de la célula. Por otra parte las poliaminas participan junto con otros cationes en procesos que conservan la estructura y el funcionamiento normal de la célula.

La importancia relativa de cada ión en particular en los distintos procesos, no va a poder establecerse mientras exista la imposibilidad de determinar la concentración de cada especie en las diferentes localizaciones subcelulares.

La disminución extrema del contenido de poliaminas afecta la producción de proteínas, RNA y DNA. La influencia sobre estos procesos puede ser directa y específica o como consecuencia de procesos secundarios en el control del crecimiento celular.

Los datos experimentales han brindado respuestas a esta cuestión en un número limitado de casos. El crecimiento celular depende de distintas variables como el pH, la temperatura, la disponibilidad de factores de crecimiento y la presencia de nutrientes esenciales. Algunas de estas variables están directamente involucradas en la síntesis de macromoléculas y otras no. Cualquier factor que altere el crecimiento celular afectará finalmente la síntesis de proteínas, del RNA y de DNA. Al ser las poliaminas nutrientes esenciales, el efecto de la disminución de los niveles normales sobre la producción de macromoléculas podría ser considerado como parte de la respuesta general de la célula a la falta de los mismos. Entre el sitio de acción primario de estas aminas y el punto donde se observa el efecto podrían estar incluidos varios pasos metabólicos y/o regulatorios. Para resolver este problema se han empleado dos estrategias principales:

1- Estudiar la influencia de las poliaminas sobre la síntesis de macromoléculas "in vitro" y trasladar las conclusiones obtenidas a células intactas.

La validez de esta alternativa es limitada. Existe un gran número de experiencias que describen efectos de poliaminas sobre una gran variedad de sistemas "in vitro" (99,5,44) y si bien estos análisis muestran acciones potenciales de las poliaminas es difícil concluir si lo observado es fisiológicamente importante o solo producto de interacciones no específicas.

En general las conclusiones obtenidas a nivel molecular a partir de ensayos "in vitro" no son discriminadas de acuerdo a la fuente biológica utilizada en el estudio. Esto origina que resultados obtenidos en sistemas no microbiológicos sean comparados con los obtenidos con E.coli y viceversa.

2- Comparar los efectos producidos por la ausencia de poliaminas con los ocasionados por otras formas de limitación del crecimiento en células completas.

Los efectos provocados por la falta de poliaminas "in vivo" son difíciles de interpretar, ya que la eliminación de las aminas endógenas no ocurre rápidamente y mientras las reservas intracelulares se consumen pueden sobrevenir cambios importantes.

4-1 Interacción de las poliaminas con el DNA.

4-1-1 Interacciones "in vitro".

Las interacciones de las poliaminas y el DNA han sido descritas desde hace varios años. Diferentes autores han compilado datos sobre este tópico (45,100) los cuales pueden resumirse de la siguiente forma:

1) Las poliaminas se encuentran asociadas a ácidos nucleicos aislados a partir de virus, bacterias y células animales.

2) La putrescina y la espermidina son capaces, "in vitro", de provocar la precipitación del DNA, protegerlo de la desnaturalización ocasionada por calor, por la irradiación con rayos X o por ruptura mecánica. La interacción con poliaminas origina una elevación en la temperatura de disociación de las dos hélices del DNA y estudios de difracción de rayos X han probado la formación de complejos con el DNA .

La adquisición de estabilidad del DNA es atribuida a la neutralización de las cargas negativas con un consecuente aumento de la eficacia de fuerzas atractivas.

Diferentes autores (42,44,94,101) han sugerido que la presencia de poliaminas "in vivo" impediría que el DNA permanezca en solución y se encontraría formando parte de algún tipo de complejo precipitado.

De acuerdo a la teoría de Manning (102) de condensación contraiónica, la condensación se produciría al neutralizarse una fracción crítica de los grupos fosfato por grupos de carga contraria. La condensación del DNA se produce al neutralizar el 90% de las cargas. Existe controversia respecto a la naturaleza del ión responsable de la precipitación. Los primeros estudios afirmaban que no existía especificidad en el ión responsable ya que cationes inorgánicas trivalentes como el $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ podían reemplazar a la espermina y la espermidina a pesar de no estar estructuralmente relacionados (103). Estudios posteriores empleando espermidina, $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (100,104) y una serie de análogos de la espermidina (105) mostraron que la condensación del DNA no depende solo de la carga sino también de la estructura del catión. Es probable que existan interacciones específicas y otras no específicas superpuestas entre el DNA y las poliaminas que hacen muy complicada la observación aislada de cada tipo de interacción.

El tratamiento del DNA compactado con nucleasa micrococcal origina cortes a intervalos regulares (106), lo que sugiere la existencia de una estructura organizada. El análisis al microscopio electrónico de estas estructuras reveló una gran semejanza con ciertos materiales naturales como los virus. Un indicio de la importancia fisiológica de las interacciones entre el DNA y las poliaminas proviene del hecho que la concentración de espermidina o de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ necesarias para producir la precipitación del ácido nucleico es similar a la requerida para la producción del encadenamiento del DNA por la girasa (107). La compactación del DNA por los iones polivalentes podría ser necesaria para que transcurran ciertas reacciones enzimáticas y para el empaquetamiento del DNA en los fagos.

Concentraciones bajas de poliaminas incrementan la conversión de la forma B del DNA a la forma Z (108), lo que resulta de particular importancia, ya que varios

autores han postulado la participación de este tipo de transición en el control funcional del DNA (109).

Distintos trabajos han indicado que las poliaminas estimulan o inhiben, "in vitro", a varias enzimas involucradas en la síntesis o el metabolismo del DNA, aunque no se ha probado en forma concluyente que esto ocurra "in vivo". La evaluación de los resultados es complicada, ya que las poliaminas pueden reaccionar con el sustrato, el producto o la enzima. A veces las poliaminas ocasionan la precipitación del sustrato o del producto. Por otro lado muchos de los indicios originales han sido posteriormente invalidados al utilizar preparaciones enzimáticas más puras y encontrarse que los efectos observados eran secundarios o se debían a la contaminación con nucleasas o ATPasas.

4-1-2 Replicación del DNA en células intactas.

Diversas evidencias sugieren que las poliaminas se encuentran involucradas en la replicación del DNA en bacterias.

El ayuno de poliaminas en cepas de E.coli auxótrofas para estas sustancias durante la infección con el bacteriófago T4 produce un descenso en la acumulación del DNA (110). En células no infectadas la replicación óptima también depende de la presencia de poliaminas. En ausencia de estos compuestos la horquilla de replicación se mueve en forma más lenta que en los controles (111,112), mientras que no se observa variación en la iniciación de la replicación. Esto es inusual, ya que generalmente la velocidad de duplicación del DNA es regulada por la frecuencia de iniciación (113), lo que sugiere que en bacterias las poliaminas actúan como cofactores en la síntesis del DNA (103) y no como moléculas reguladoras.

La relación entre la acumulación de poliaminas y la síntesis del DNA se ha estudiado en diversos sistemas eucarióticos (5,114). Observaciones realizadas tratando células HeLa con un inhibidor de la adenosil metionina decarboxilasa, el metilglioxal bis(guanidilhidrazona) (MGBG), sugieren que la falta de poliaminas, a diferencia de lo que sucede en *E.coli*, afecta principalmente la iniciación y en menor medida la elongación (115). De todas maneras estos resultados deben confirmarse mediante la utilización de otros inhibidores, ya que el MGBG puede ejercer otros efectos no relacionados con la síntesis de poliaminas.

Si bien la disminución de los niveles de poliaminas inhibe la síntesis de DNA tanto en procariotes como en eucariotes, no existen evidencias de interacciones directas de las poliaminas en el sitio de replicación. Otras moléculas, además de la DNA polimerasa, pueden ser sitios de acción de las poliaminas. Proteínas como la DNA binding protein, helicasas, primasas o las topoisomerasas son los mejores candidatos a interactuar con las poliaminas e influir en la replicación (116).

4-2 Interacción de las poliaminas con el RNA.

4-2-1 Estudios "in vitro".

Existe un interés especial en el estudio de las interacciones de las poliaminas y los RNA de transferencia (tRNA) y el posible rol de la espermidina en el proceso de aminoacilación.

Las poliaminas pueden unirse, bajo distintas condiciones, a sitios específicos del tRNA (117). Aún en presencia de un exceso de poliaminas la relación molar entre estas sustancias y el tRNA no excede nunca el valor de 2-3 :1.

La espermina facilita la cristalización de los RNA de transferencia. Estudios cristalográficos han demostrado que dos moléculas de espermina son capaces de localizarse en sitios específicos, estabilizando la estructura secundaria y terciaria del tRNA (118).

El hecho que las poliaminas faciliten la cristalización de los tRNA podría no tener ningún significado fisiológico, ya que también se ha podido cristalizar ciertos tRNA en ausencia de estos cationes (119).

Se han caracterizado la presencia de dos sitios de unión a baja fuerza iónica (uno con alta y otro con baja afinidad), pero solo uno a alta fuerza iónica (de alta afinidad). El Na^+ y el K^+ inhiben la asociación de la espermina al RNA de transferencia ya que son capaces de formar una atmósfera de carga positiva que contrarresta la carga neta de la molécula de RNA. De todas maneras es probable que las poliaminas no sean esenciales para la función correcta de los tRNA. Las cepas de E.coli auxótrofas para estas sustancias son capaces de desarrollarse, en ausencia de las mismas, a una velocidad del 30 al 40% de los controles suplementados, a pesar que los niveles de poliaminas son de 2000 a 2500 veces menores (120). Esto hace que la relación entre moléculas de espermina y tRNA sea de 1/20, aunque esto no permite descartar una asociación funcional específica entre las poliaminas y los tRNA.

La espermidina se encuentra involucrada en el "splicing" de los tRNA de levadura, ya que incrementa la exactitud del corte en el procesamiento del RNA precursor (121).

La espermidina o la espermina son necesarias para la replicación y la estabilidad de los plásmidos "killer" a RNA doble cadena en S.cerevisiae (122,123).

4-2-2 Síntesis de RNA.

Las concentraciones fisiológicas de poliaminas estimulan la transcripción en sistemas eucariotes y procariotes "in vitro" (44,124). En estas condiciones la estimulación se produce a partir de DNA doble cadena, pero al mismo tiempo se induce inhibición a partir de DNA simple cadena (125). Como el templado de la RNA polimerasa es el DNA doble cadena es probable que las poliaminas faciliten la transcripción "in vivo". Los resultados experimentales sugieren, sin embargo, que no hay una influencia directa sobre la polimerasa sino que se afecta la conformación del templado, del producto o de ambos.

La síntesis total de RNA "in vivo" disminuye en ausencia de poliaminas en cepas de E.coli deficientes en la producción de las mismas. Al suplementarlas con estas sustancias la recuperación de la síntesis de RNA es posterior a la recuperación de la síntesis proteica (126). Entre las primeras proteínas inducidas se encuentran las subunidades β y β' de la RNA polimerasa (127). Russel sugirió que la ornitina decarboxilasa podía actuar como una subunidad regulatoria de la RNA polimerasa I (128); sin embargo estudios posteriores utilizando preparaciones enzimáticas de mayor pureza no lograron confirmar esta hipótesis (129).

4-3 Biosíntesis de proteínas.

Los primeros estudios realizados en sistemas libres de células demostraron que las poliaminas incrementan la velocidad de la síntesis de proteínas y son capaces de reemplazar, al menos parcialmente, al Mg^{2+} , tanto en extractos bacterianos como de mamíferos (4,130,131)

Practicamente todos los pasos involucrados en la síntesis proteica son estimulados por poliaminas "in vitro" (132-133).

La espermidina en bajas concentraciones estimula la reacción catalizada por la aminoacil tRNA sintetasa, aún en presencia de magnesio. Aparentemente las poliaminas no tienen acción sobre la enzima sino que alteran la conformación del *tRNA*.

4-3-1 Efecto de las poliaminas sobre la estructura y propiedades de los ribosomas.

Un hecho ampliamente caracterizado es que tanto las poliaminas como el Mg^{2+} se unen al ribosoma y facilitan la asociación de las subunidades ribosomales (133,134, 135).

Los ribosomas provenientes de cepas de *E.coli* que requieren poliaminas, desarrolladas en ausencia de las mismas, son menos activos en la síntesis proteica que los ribosomas normales, aún en presencia de concentraciones óptimas de Mg^{2+} (135) y además son menos efectivos en el proceso de iniciación de la traducción (136). Algranati y colaboradores demostraron que en ausencia de poliaminas las bacterias producen ribosomas ensamblados en forma defectuosa (15). Estas partículas al ser analizadas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa presentan un perfil alterado y una mayor disociación de sus subunidades (135). Los mismos autores utilizando mezclas heterogéneas de subunidades ribosomales provenientes de células desarrolladas en presencia o ausencia de poliaminas demostraron que el defecto radicaba en la subunidad 30 S del ribosoma procariótico (15,136). Posteriormente se determinó que las subunidades 30 S defectuosas

presentaban el RNA 16 S submetilado y contenían una cantidad de proteína ribosomal S1 menor que lo normal (137,138).

4-3-2 Biosíntesis de proteínas "in vivo".

La presencia de poliaminas afecta la fidelidad de la traducción en sistemas libres de células. Estos compuestos forman parte de las mezclas de reacción recomendadas para llevar a cabo la síntesis de proteínas "in vitro" (139). A concentración de Mg^{2+} subóptima los niveles fisiológicos de poliaminas aumentan la fidelidad (140); en cambio a altas concentraciones de Mg^{2+} estas poliaminas no producen ningún efecto o disminuyen la precisión de la traducción (132).

El estudio de la fidelidad de la síntesis de proteínas "in vivo" utilizando mutantes auxótrofos para poliaminas ha mostrado que las mismas inducen la disminución de ciertos errores que ocurren con alta frecuencia, pero parecerían ejercer poca influencia sobre los errores que ocurren con baja frecuencia (141).

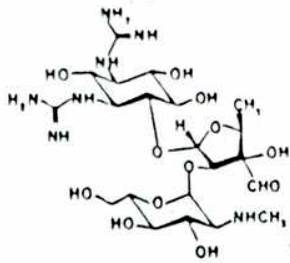
La ausencia de poliaminas "in vivo" afecta la iniciación y la elongación de la síntesis de proteínas en bacterias. Tanto la velocidad de elongación como la de iniciación se reducen en forma paralela con el descenso de la velocidad de crecimiento (142,143,144). Este hecho es inusual, ya que normalmente la velocidad de elongación es constante para cada célula sea procariota (145) o eucariota (146). Esto indicaría que "in vivo" las poliaminas afectan la síntesis de proteínas por una participación directa en la misma y no como un efecto secundario en los mecanismos de control del crecimiento celular.

4-4 Estructura y función de las membranas.

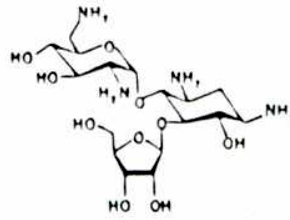
Cantidades pequeñas de espermidina pueden estabilizar osmóticamente a las células bacterianas. Este hecho fue una de las primeras evidencias de la existencia de interacciones entre las poliaminas y la pared o la membrana celular, hecho que fue confirmado por la protección de los protoplastos por los policationes. La espermidina no interfiere con la acción de la lisozima, pero previene la liberación de los componentes intracelulares al medio.

Tabor postuló la formación de complejos con grupos ácidos presentes en la membrana celular que reducirían las fuerzas repulsivas sin alterar las de cohesión, lo que estabilizaría a la membrana (147). Ciertos cationes inorgánicos producen efectos similares; sin embargo el Mg^{2+} no es capaz de proteger a los protoplastos de la lisis (148).

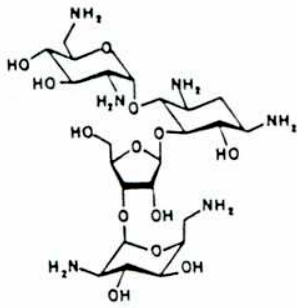
Los efectos de las poliaminas sobre las membranas de células eucarióticas han sido estudiados en forma intensiva demostrándose, entre otras propiedades, que la espermidina es capaz de inhibir la hemólisis de los eritrocitos resuspendidos en medio salino y que la membrana celular de las células rojas se estabiliza en presencia de poliaminas. Este efecto es específico de estas sustancias, ya que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} no son capaces de reemplazarlas, descartándose que la estabilización sea producida solamente por efectos de carga eléctrica.



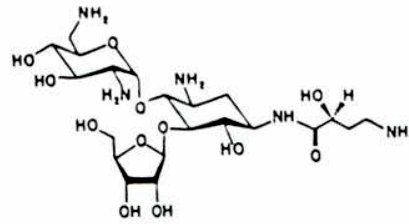
Estreptomicina



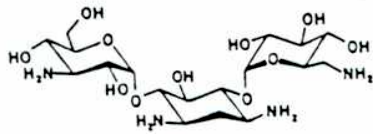
Ribostamicina



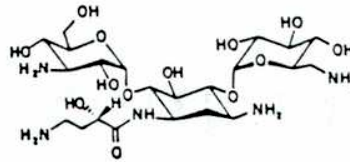
Neomicina B



Butirosina



Kanamicina A



Amicacina.

Figura 2: Estructura de los antibióticos aminoglucósidos más importantes.

5 Antibióticos aminoglucósidos.

Bajo la denominación de antibióticos aminoglucósidos se incluye a un grupo de compuestos con actividad bactericida que contienen un grupo inositol sustituido por uno o dos grupos amino o guanidino y varios azúcares; los más importantes se incluyen en la Figura 2.

Este grupo de drogas policatiónicas posee un mecanismo de acción común, siendo la estreptomicina el miembro más caracterizado y sometido al mayor número de estudios.

Durante la acción de estas drogas se observa un gran número de efectos pleiotrópicos, siendo los más importantes:

- Bloqueo ribosomal.
- Incorporación de aminoácidos incorrectos durante la síntesis de proteínas.
- Daño de la membrana celular.
- Captación irreversible del antibiótico.

El mecanismo de acción de la estreptomicina incluye varios pasos donde cada uno de los efectos enunciados posee un rol esencial y de similar importancia. En estas condiciones se observan ciertos efectos secundarios sobre la síntesis de RNA, DNA y poliaminas que son originados por la alteración de la síntesis de proteínas.

Para la acción irreversible de la droga se necesita de una síntesis proteica activa, ya que la presencia de cloramfenicol impide la acción de la estreptomicina (149). Sin embargo, sorprendentemente, la ausencia de un aminoácido esencial que normalmente bloquea la síntesis proteica, no evita la acción de la estreptomicina (150). La presencia del antibiótico favorece la incorporación incorrecta de

aminoácidos en lugar de los codificados por el RNA mensajero; de esta manera puede proseguir la síntesis proteica aún en ausencia de ciertos aminoácidos y producirse los efectos finales del antibiótico. Una confirmación de que el antibiótico favorece los errores de traducción es que concentraciones subletales de la droga inducen la supresión fenotípica de ciertas mutaciones auxotróficas en cepas sensibles (151).

5-1 Sitio de acción de la estreptomicina.

Distintas evidencias han indicado que el blanco de acción primario de la estreptomicina es el RNA ribosomal. Las pruebas de la existencia de interacciones entre el antibiótico y el RNA están basadas en que la droga no sólo es capaz de proteger a ciertas bases específicas del RNA 16S de modificaciones químicas (152), sino que es posible provocar el entrecruzamiento entre la molécula de estreptomicina y ciertas zonas del RNA (153).

Existen tres tipos de respuesta fenotípica a la presencia de la estreptomicina: sensibilidad, resistencia y dependencia. Experimentos de reconstitución han probado que el fenotipo de respuesta a la estreptomicina está determinado por alteraciones en la proteína ribosomal S12 (153,154). El hecho que una mutación que sólo altera al ribosoma confiera resistencia total a la droga permitió descartar la interacción directa del antibiótico con la membrana celular; sin embargo la existencia de siete copias del operón del RNA ribosomal en el genoma de *E.coli* ha impedido el aislamiento de cepas resistentes a la droga que posean solamente mutaciones en el RNA ribosomal.

Diferentes concentraciones del antibiótico originan efectos diversos a nivel ribosomal entre los que se incluyen la inducción de errores durante el proceso de traducción y el bloqueo del ribosoma.

La paradoja de los errores de traducción en contraposición al bloqueo ribosomal fue resuelta por Tai y colaboradores (155) al desarrollar un método que permitió distinguir los efectos sobre los ribosomas en elongación o en iniciación. A bajas concentraciones la estreptomina afecta principalmente a los polisomas que se encuentran traduciendo en forma activa, incrementando los niveles de errores de lectura, mientras que a concentraciones elevadas la droga es capaz de asociarse a todos los ribosomas, incluyendo a los que se encuentran iniciando y produce el bloqueo de la síntesis proteica (156,157). Ambos mecanismos de acción parecen involucrar blancos ribosomales superpuestos, ya que una sola mutación es capaz de conferir resistencia al antibiótico.

5-2 Captación de la droga.

La captación de la estreptomina por la célula bacteriana es un paso vital en la acción de la droga. Este proceso es bifásico (158). En un primer paso el antibiótico se adsorbe a la membrana celular y después de un período cuya duración es inversamente proporcional a la concentración de la droga, se produce un incremento rápido e irreversible de la penetración del antibiótico.

El cloramfenicol y las mutaciones en la proteína ribosomal S12 previenen el transcurso de la última etapa, lo que indicaría que no es el antibiótico el responsable del daño en la membrana sino algún producto de los ribosomas sensibles (158).

5-3 Mecanismo de acción de la estreptomicina.

El mecanismo de acción de la estreptomicina puede resumirse de la siguiente manera:

1) Pequeñas cantidades del antibiótico penetran a la célula, por un mecanismo aún desconocido y afectan a los ribosomas que se encuentran traduciendo, elevando los niveles de incorporación de aminoácidos erróneos.

2) Algunas de las proteínas defectuosas producidas son incorporadas en la membrana creando canales que permiten la entrada del antibiótico y provocan un proceso autocatalítico por el cual los niveles intracelulares mayores de la droga inducen una mayor producción de defectos en las proteínas sintetizadas con la consecuente formación de nuevos canales.

3) Los niveles intracelulares del antibiótico alcanzan valores suficientes para producir el bloqueo de la iniciación de la traducción.

4) Sobreviene el efecto letal de la droga por la captación continua de la misma y la irreversibilidad del bloqueo ribosomal.

5-4 Resistencia a los antibióticos aminoglucósidos.

La primer forma de resistencia encontrada para estos antibióticos es la producida por alteraciones de la proteína ribosomal S12, la que determina la respuesta del ribosoma a la estreptomicina (159). Posteriormente se caracterizó en cepas clínicas la existencia de ciertas enzimas, codificadas por plásmidos y localizadas en el periplasma, capaces de modificar al antibiótico e inactivarlo (160).

En las eubacterias se conocen tres tipos de mecanismos modificatorios:

- 1) Acetilación de los grupos amino.
- 2) Fosforilación de los grupos hidroxilos.
- 3) Adenilación de los grupos hidroxilos.

Los antibióticos modificados son incapaces de inducir errores durante el proceso de la traducción, lo que origina la inhibición de los pasos posteriores a la captación inicial de la droga.

5-5 Otros antibióticos aminoglucósidos.

Este grupo incluye entre otros compuestos a la neomicina, kanamicina, gentamicina, ligromicina B y otros antibióticos derivados de los mismos.

Estas sustancias poseen un mecanismo de acción similar a la estreptomicina, produciendo errores en la traducción, los que se manifiestan por la inducción de supresión fenotípica "in vivo" (161). Las características particulares de cada uno de estos antibióticos no son idénticas a las de la estreptomicina. Salvo la ligromicina B, el resto presenta más de un sitio de unión al ribosoma (162,163). Como resultado de esta propiedad es imposible obtener mutantes resistentes a estas drogas en un solo paso. Por otra parte los sitios de interacción con el ribosoma son diferentes a los utilizados por la estreptomicina, ya que no compiten y hasta estimulan levemente la asociación de la dihidroestreptomicina con su blanco (164).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a estos compuestos son similares a los observados para la estreptomicina, aunque la expresión de resistencia a uno en particular no implica resistencia general a todo el grupo.

6- Fidelidad de la síntesis proteica.

La fidelidad de los procesos involucrados en el flujo de información genética es crítica. Los niveles de errores de la replicación del DNA junto con los procesos asociados de prueba de lectura y reparación son del orden de 10^{-8} - 10^{-11} (165), lo que implica que en una célula de *E.coli* la mayoría de los genes se duplican libres de errores.

Para que el funcionamiento de la célula sea correcto cada uno de los pasos del flujo de información entre el DNA y las proteínas debe realizarse con un grado de fidelidad razonable, aunque este nivel no es obvio.

De los pocos estudios realizados sobre fidelidad de la transcripción se deduce que este proceso es menos preciso que la replicación, al menos por la ausencia de mecanismos de reparación. "In vivo" los errores cometidos durante la transcripción son del orden de 10^{-4} y dependen fuertemente del contexto (166).

El error típico durante la síntesis proteica es la incorporación de un aminoácido diferente al codificado por el mRNA. Este tipo de error puede sobrevenir por dos motivos diferentes:

a) La existencia de tRNA cargados con un aminoácido incorrecto, fenómeno denominado acilación o carga incorrecta.

b) La producción de apareamiento entre un codon y un anticodón no complementarios a nivel ribosomal lo que se conoce como errores de lectura.

Las aminoacil tRNA sintetasas (aa-tRNA sintetasa) reconocen a los sustratos con un alto grado de exactitud y poseen varios pasos de prueba posteriores a la reacción de acilación. Estudios cuidadosos sobre acilación incorrecta mostraron que la frecuencia de error es del orden de $4 \cdot 10^{-4}$ a $4 \cdot 10^{-5}$ (167,168).

Los primeros estudios sobre errores en la traducción, así como muchos de los trabajos más importantes realizados en este campo para analizar los parámetros cinéticos involucrados y los modelos de prueba de los errores que ocurren a bajas frecuencias se realizaron exclusivamente "in vitro" (169). Estos estudios poseen la limitación de representar situaciones no fisiológicas, ya que las concentraciones empleadas de sales, sustratos y cofactores pueden no ser exactamente las presentes en la célula. Por este motivo los resultados obtenidos "in vitro" deben ser correlacionados con lo que sucede realmente "in vivo".

La incorporación errónea de aminoácidos durante la síntesis proteica es difícil de detectar, ya que las proteínas producidas poseen esencialmente los mismos pesos moleculares y composición de aminoácidos que la proteína correctamente sintetizada. Este tipo de error puede detectarse con relativa facilidad si la sustitución involucra a un aminoácido normalmente ausente en la proteína u origina un cambio en el comportamiento electroforético o cromatográfico de la proteína.

Una vez determinada la existencia del error hay que estudiar el proceso que lo indujo.

En E.coli existen ciertas mutantes ribosomales que son de gran ayuda en este tipo de investigaciones (170). Las mutantes resistentes a la estreptomycin poseen la proteína ribosomal S12 (rpsL) alterada, lo cual no solo le confiere resistencia a la droga, sino que produce una menor tendencia a cometer errores durante la traducción tanto "in vitro" como "in vivo". Por el contrario el fenotipo RAM, de ambigüedad ribosomal (rpsD), antagoniza con la restricción rpsL y origina ribosomas que producen errores de traducción con mayor frecuencia que la normal por tener alterada la proteína S₄.

Dado que la tendencia a la incorporación de aminoácidos erróneos es directamente influenciada por las alteraciones ribosomales en cepas isogénicas puede afirmarse el rol central del ribosoma en los procesos involucrados.

6-1-Errores de lectura.

El nivel promedio de errores de lectura se estima entre 10^{-4} y 10^{-3} (171), aunque este dato puede llevar a confusión ya que está basado en promedios de un número de aminoácidos estudiados en un número limitado de proteínas. Es de esperar que la frecuencia de error para cada uno de los 61 codones con sentido varíe en un amplio rango, dependiendo de cada codon e influido fuertemente en cada caso por el contexto presente. Según Kurland (172) las discrepancias entre las frecuencias de errores observadas es un reflejo de la falta de uniformidad de los errores de traducción.

La selección de los tRNA por los ribosomas transcurre en varios pasos. El modelo propuesto originalmente por Ninio (173) y posteriormente reformado para incorporar nuevas evidencias, establece que el proceso de selección de los tRNA se divide en dos partes: la discriminación inicial está determinada por el tiempo disponible para la expresión de las diferencias de estabilidades entre las interacciones codon-anticodon. Si este tiempo disminuye por la existencia de algún tipo de mutación hay una disminución consecuente en la fidelidad de la selección del aminoacil-tRNA. La discriminación inicial puede ser mejorada, elevando la selectividad del proceso original, por uno o más pasos de pruebas de lectura irreversibles que involucran la hidrólisis de GTP en forma previa a la formación del enlace peptídico.

Las mutaciones RAM y la estreptomycinina impiden las pruebas de lectura sin alterar la selección original, lo que eleva la frecuencia de errores sin modificar la velocidad de elongación (174). Por el contrario, si la mutación hace más estricta la prueba de lectura, mejora la fidelidad de la síntesis. Sin embargo, ésta no puede incrementarse más allá de ciertos niveles, ya que originaría una disminución en la eficiencia de la síntesis proteica con una consecuente menor velocidad de crecimiento celular.

Se han descrito otros procesos capaces de reducir el número de errores cometidos en la síntesis proteica:

a) Procesos de Edición: Los peptidil ~ tRNA son capaces de disociarse del ribosoma durante la síntesis proteica (175). Este fenómeno universal produce la disociación preferencial de los peptidil ~ tRNA erróneos, lo que evita completar la síntesis de proteínas defectuosas (176).

b) Respuesta Estricta: El ayuno de aminoácidos esenciales incrementa los niveles de errores de lectura. En E.coli este aumento es mucho menor en cepas salvajes que en aquellas mutantes deficientes en la respuesta estricta. Esta respuesta es un mecanismo general que se produce por el ayuno de un aminoácido e involucra la síntesis del nucleótido ppGpp. Esta sustancia es la responsable de la disminución de errores durante el ayuno de aminoácidos (177) e inhibiría la síntesis de proteínas, permitiendo que los niveles relativos de tRNA correctamente cargados sean suficientes para prevenir la incorporación de aminoácidos erróneos (178). Otros modelos proponen que este nucleótido induce la transición entre estados de baja y alta exactitud, (179) modificando de esta forma la fidelidad de la traducción.

7- Objetivos del presente trabajo.

A pesar de los importantes esfuerzos realizados durante los últimos años para dilucidar las funciones fisiológicas de las poliaminas, éstas se han caracterizado sólo parcialmente. Las poliaminas participan en un gran número de procesos celulares relacionados entre sí y es difícil estudiar en forma aislada la influencia de los policationes sobre cada uno de los procesos afectados.

Por otra parte, los estudios sobre las interacciones de las poliaminas con diversos componentes celulares así como los efectos sobre distintas reacciones metabólicas estudiadas "in vitro" pueden no reflejar exactamente las situaciones que transcurren "in vivo", ya que la influencia de las poliaminas dependen, entre otros factores, de la fuerza iónica del medio y de la concentración de ciertos iones (44-180).

Para el estudio de las funciones de las poliaminas "in vivo " se cuenta en la actualidad con dos herramientas fundamentales como son la disponibilidad de mutantes incapaces de producir estos policationes y el uso de inhibidores específicos de la biosíntesis de los mismos (55-181). De esta forma se puede regular casi a voluntad los niveles endógenos de las poliaminas y correlacionarlos con las alteraciones particulares de las diversas funciones celulares.

Las células con contenidos endógenos de poliaminas extremadamente bajos presentan diversas alteraciones en los procesos de replicación, transcripción y traducción. Nuestro interés se ha centrado en el estudio de la importancia de las poliaminas en la síntesis proteica. Empleando como modelo de trabajo cepas de E.coli deficientes en la biosíntesis de poliaminas se pudo probar que las células

desarrolladas en ausencia de estas sustancias contienen ribosomas defectuosos con propiedades alteradas (15-136).

Las poliaminas cumplen diversos roles fundamentales en la traducción, entre las cuales se incluye el aumento de la fidelidad. Sin embargo "in vitro" los efectos de las poliaminas sobre la precisión de la síntesis proteica dependen fundamentalmente de las concentraciones de Mg^{2+} empleadas en el ensayo (130-138). Por estos motivos se decidió medir la fidelidad de la traducción "in vivo" y estudiar sus variaciones en bacterias sometidas o no a un ayuno de poliaminas.

Algranati y col. demostraron que la presencia de las poliaminas origina un aumento en la fidelidad de lectura en aquellos codones en que normalmente se comete una alta frecuencia de errores, mientras que no influye en la lectura de los codones que normalmente se traducen con un alto grado de exactitud (141).

Se decidió investigar diversos aspectos de la síntesis de proteínas en células sometidas a condiciones que provocan un aumento en la frecuencia de errores de traducción y analizar la influencia de la presencia o ausencia de poliaminas.

Para aumentar los niveles basales de errores durante la síntesis de proteínas se recurrió a las siguientes estrategias:

- a) Someter a las células al ayuno de diversos aminoácidos esenciales.
- b) Emplear ciertos antibióticos que favorecen el reconocimiento imperfecto entre codón y anticodón.

Estos estudios realizados en sistemas "in vivo" contribuirán a aumentar el conocimiento de la acción de las poliaminas sobre la maquinaria de síntesis proteica.

II-MATERIALES Y METODOS.

1-Cepas Bacterianas.

Se utilizaron las siguientes cepas de E.Coli auxotróficas para poliaminas :

- a) E.Coli BGA 8 :[*spe B spe C thi thr leu lac sup sm^S*](134)
- b) E.Coli LM 53 :[Δ (*spe A spe B*) Δ (*spe C glc*) Δ *spe D thi thr pro leu his sup E44 sm^S F'*]
(141)
- c) E.Coli LM 27 :[*spe B spe C thi thr leu his sm^S F' lac⁺*](141)

Las cepas LM 27 y BGA 8 son incapaces de producir putrescina pero contienen algo de espermidina. La cepa LM 53 es incapaz de biosintetizar ninguna poliamina.

2-Medios utilizados.

2-1.Medio TYE : posee una composición en gr/100ml

Bactotryptona	0,8
Bacto extracto de levadura	0,5
NaCl	0,5

2-2. Medio mínimo (MM)(182): posee una composición en gr/100ml:

$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$: 0,92; KH_2PO_4 : 0,3; Na_3 Citrato.2 H_2O : 0,047; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 0,01; $(NH_4)_2SO_4$: 0,1; glucosa: 0,4; tiamina: 0.0004 y aminoácidos requeridos por la mutante utilizada: 0,005 .

En los casos necesarios el medio se suplementó con putrescina (MM+P):

0,001 gr/100 ml y espermidina: 0,001 gr/100 ml.

2-3. Medio Mops: Su composición en gramos cada 100 ml es: Buffer Mops: 8,37;

tricina: 0,72; KCl: 3,73; NH_4Cl : 0,53; KH_2PO_4 : 0,027; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,123;

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 0,027 y 0,005 de los aminoácidos requeridos por la mutante utilizada.

En los casos necesarios el medio se suplementó con putrescina (Mops+P):

0,001 gr/100 ml y espermidina: 0,001 gr/100 ml.

3- Conservación de las cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas se almacenaron en medio conteniendo 15% de glicerol a $-70^\circ C$ de la siguiente manera:

Se inocularon 5 ml de medio TYE con muestra proveniente de una colonia aislada en placa y se cultivó durante la noche a $37^\circ C$. 0,85 ml de este cultivo se transfirieron a un tubo que contenía 0,15 ml de glicerol esteril y el contenido se mezcló utilizando un vortex.

Las células se congelaron rápidamente en N_2 líquido y se conservaron a $-70^\circ C$.

4-Condiciónes de cultivo.

Los cultivos se desarrollaron aeróbicamente a 37 °C con agitación rotatoria en baño de agua.

El crecimiento bacteriano se siguió midiendo la variación de la absorbancia a 490 nm en función del tiempo. Los valores de absorbancia se correlacionaron con el número de células viables plaqueando diluciones de los cultivos bacterianos en agar nutriente. Un valor de $A_{490}=0,2$ equivale a 1.10^8 cel/ml.

5-Agotamiento de poliaminas de los cultivos bacterianos.

Alícuotas de cultivos desarrollados durante la noche en medio TYE se diluyeron cuatrocientas veces en medio mínimo (MM) y se incubaron a 37 °C con agitación por un lapso de 10 a 12 generaciones. Estos cultivos libres de poliaminas se preservaron en medio líquido a 4 °C y se utilizaron por varias semanas como inóculos para todos los experimentos realizados sobre bacterias en fase logarítmica media de crecimiento.

6-Síntesis de proteínas "in vivo"

Para determinar la cinética de la síntesis proteica en cultivos en desarrollo exponencial se agregó [^{35}S]metionina ($5 \mu\text{Ci/ml}$, $40 \mu\text{M}$) y se tomaron muestras de 0,5 ml que se diluyeron con 0,5 ml de una solución de metionina 0,8 mM que contenía $5 \mu\text{g}$ de albúmina bovina. Se agregó 0,5 ml de NaOH 1 M y se incubó por 30 minutos a 37°C para descargar los tRNA. Las

proteínas se precipitaron agregando ácido tricloroacético frío (10% de concentración final) y dejando las células a 0°C durante 30 minutos (134). Después de filtrar por papel de vidrio Whatman GF/C se determinó la radiactividad incorporada en el material insoluble con un contador de centelleo líquido utilizando Tolueno-PPO-dimetil POPOP como mezcla centelladora (183).

La capacidad de la síntesis proteica se determinó por la incorporación de radiactividad al material insoluble en TCA 10% luego de un pulso de 2 min con aminoácidos marcados.

7- Ayuno de aminoácidos

El ayuno de isoleucina se indujo por la adición de valina (500 $\mu\text{g/ml}$) que inhibe la primer enzima del camino biosintético de la isoleucina.(184).

El ayuno de otros aminoácidos esenciales para cada cepa bacteriana se realizó filtrando las células a través de Millipore (0,45 μm de tamaño de poro) y resuspendiéndolas en medio mínimo sin suplementar con uno de los aminoácidos requeridos.

8- Niveles de captación de aminoácidos

Cultivos en crecimiento exponencial se trataron con cloramfenicol (200 mg/ml) para inhibir la síntesis de proteínas. Luego de 15 minutos en presencia del antibiótico se agregó el aminoácido radiactivo (0,1-0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 40 μM concentración final) cuya captación se deseaba medir y se prosiguió la incubación. Cada 5 minutos se tomaron alícuotas de 0,5 ml de cultivo que se diluyeron

inmediatamente con 3 ml de medio de cultivo suplementado con 100 μg del mismo aminoácido sin marcar. La suspensión se filtró por Millipore (0,45 μm de diametro de poro), se lavó con 3 ml de medio y los filtros se secaron al aire. La radiactividad incorporada por las células se determinó con un contador de centelleo líquido empleando tolueno PPO-dimetil POPOP como mezcla centelladora.

9-Determinación de la velocidad de degradación de proteínas

9-1.Durante el transcurso de un ayuno de leucina o isoleucina.

Cultivos desarrollados en presencia o ausencia de poliaminas se incubaron a 37°C con [^{14}C]fenilalanina (0,25 $\mu\text{Ci/ml}$, 1 μM concentración final) por 10 min. Luego de agregar un exceso de 500 veces de fenilalanina fria se filtró por Millipore (0,45 μm de diametro de poro) y las bacterias se resuspendieron en los siguientes medios:

a) suplementado con todos los aminoácidos requeridos.

b) en medio no suplementado con leucina.

c) suplementado con todos los aminoácidos requeridos y agregando valina para provocar un ayuno de isoleucina. En todos los casos se continuó la incubación a 37°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Las muestras se precipitaron con TCA 10% y después de centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm en una microcentrífuga se determinó la acción proteolítica cuantificando la fracción de radiactividad liberada al sobrenadante utilizando Tolueno-Triton X100 como mezcla centelladora (185).

9-2. Durante la presencia de estreptomina (25 $\mu\text{g/ml}$).

Se incubaron cultivos desarrollados en ausencia o presencia de poliaminas con [^{14}C]fenilalanina (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 2 μM concentración final) por 10 minutos luego de los cuales se agregó un exceso de 500 veces del aminoácido sin marcar. Inmediatamente se filtraron las células por Millipore (0,45 μm de diámetro de poro), se resuspendieron en medio mínimo adicionado o no con 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y se prosiguió la incubación. Se determinó la variación de los niveles de radiactividad soluble en TCA 10% tal como se describió previamente.

10. Distribución intracelular de los péptidos nacientes en presencia de estreptomina.

Con el propósito de determinar la proporción de péptidos sintetizados que son liberados a la fracción soluble o que permanecen asociados a los ribosomas luego de 45 minutos de acción de estreptomina (25 $\mu\text{g/ml}$), se incubaron los cultivos con [^{35}S]metionina (0,8 $\mu\text{Ci/ml}$, $7 \cdot 10^{-9}$ M) por 30 segundos. Luego se agregó un exceso de metionina fría ($4 \cdot 10^{-4}$ M) y se prosiguió la incubación. Después de 5 minutos se volcó 25 ml de cultivo sobre 20 ml de medio congelado para detener la síntesis proteica en forma rápida. Las células se centrifugaron a 8000 rpm por 15 minutos y se lisaron en forma suave (74,186). Para ello se resuspendieron en 0,2 ml de solución de sacarosa 25% y se trataron por 5 minutos con lisozima 0,5 mg/ml. Finalmente se completó la ruptura de las bacterias con deoxicolato de sodio 0,01% hasta que se observaron hilos de DNA que se degradó por agregado de 0,035 mg/ml de DNasa libre de RNasa en presencia de $(\text{AcO})_2\text{Mg}$ 15 mM.

Se determinó la absorbancia de la muestra a 260 nm y una alícuota equivalente a 1,5 unidades (A_{260}) se analizó por centrifugación en un gradiente lineal de sacarosa (14-45%) durante 95 minutos en un rotor Spinco SW 50.1 a 45.000 rpm. El perfil de las partículas ribosomales en el gradiente se estudió determinando la absorción a 254 nm con un analizador ultravioleta ISCO y la distribución de péptidos marcados se analizó midiendo la radiactividad asociada en las distintas fracciones utilizando Bray como mezcla centelladora (187).

10-1. Soluciones para la lisis de bacterias:

- a) Sacarosa 25% en tris HCl 0,01 M pH 7,8
- b) Lisozima 2,5 mg/ml en tris HCl 0,12 M pH 7,9; EDTA 4 mM.
- c) Deoxicolato de sodio: 2,6% en tris HCl 0,012 M pH 7,9

11- Acción de los antibióticos aminoglucósidos.

Los efectos de los antibióticos aminoglucósidos en diferentes cepas de E.coli se estudiaron analizando las variaciones de ciertos procesos como la velocidad de crecimiento, la cinética y la capacidad de síntesis proteica, la inducción de la transcripción y de la traducción de enzimas en cultivos realizados en presencia de distintas concentraciones de la droga.

11-1. Reversibilidad de la acción de la estreptomicina

Para analizar la reversibilidad de la acción de la estreptomicina, cultivos con o sin poliaminas en crecimiento exponencial se trataron con dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico. A los 60 min del agregado las células se filtraron por Millipore (0,45 μm de diametro de poro), se lavaron dos veces con medio libre de estreptomicina y se resuspendieron en el volumen original de medio fresco. A una alícuota de cada una de estas suspensiones se agregó antibiótico y se prosiguió la incubación de todas las muestras determinandose el crecimiento celular y las variaciones en la síntesis de proteínas.

12- Análisis de proteínas por electroforesis.

Las proteínas producidas por los cultivos bacterianos en las diferentes condiciones se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida mono y bidimensionales.

Con este objetivo las células se incubaron con [^{35}S] metionina (20 $\mu\text{Ci/ml}$; 0,2 μM) por tiempos variables según se indica en cada experimento. Los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos, se lavaron con medio que contenía metionina fría y se lisaron como se describe a continuación.

12-1.Tratamiento de las muestras para electroforesis monodimensionales.

Las células se resuspendieron en 50 μ l de cracking buffer(188) con urea y se calentaron a 100 °C por 5 minutos. Las muestras así tratadas se conservaron a -20 °C.

Cracking Buffer.

Urea	6M
glicerol	10%
Tris pH 6,8	0,025 M
SDS	2%
β MSH	0,13 M
azul de bromo fenol	0,01%

Antes de desarrollar la electroforesis se determinó la radiactividad insoluble en TCA 10% a 0 °C por μ l de muestra.

12-2.Tratamiento de las muestras para electroforesis bidimensional.

Las células se resuspendieron en 40 μ l de buffer de lisis (189) y se rompieron por congelamiento en N₂ líquido y descongelamiento a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió seis veces y las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Buffer de Lisis.

MgAco ₂	1 mM
DNasa	80 µg/ml
RNasa	80 µg/ml
Tris pH 7,5	2mM

12-3.Electroforesis monodimensional.

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida con concentraciones que variaron entre 12,5 y 20% utilizando las condiciones descritas por Fling y colaboradores (190) y empleando un gel concentrador con 5% de poliacrilamida. En algunos casos las electroforesis se realizaron en presencia de urea 6M.

Las muestras tratadas como se indicó anteriormente se diluyeron con Cracking Buffer de modo de poder sembrar en cada carril volúmenes de muestras iguales con contenidos equivalentes de radiactividad .

Al finalizar el desarrollo de las electroforesis los geles se fijaron y tiñeron al mismo tiempo por tratamiento con una solución de Coomassie blue R 250 0,25% en metanol/ácido acético/H₂O :: 45,5/9/45,5. Luego de 30 minutos se eliminó la solución colorante y se lavó el gel con una solución decolorante de metanol/acético/H₂O 20/7,5/72,7. Los geles así tratados se secaron al vacío sobre papel Wathman 3 MM y luego se expusieron en contacto con placas radiográficas a -70 °C.

12-4. Electroforesis bidimensional.

12-4-1. Isoelectroenfoque.

La primera dimensión se realizó empleando el método de electroforesis en gradiente de pH sin equilibrio (NEPHGE)(189) en tubos de vidrio de 12 cm de largo por 3 mm de diámetro. Los geles, que contenían, 4% Acrilamida/bisacrilamida (32:1), 9,2 M urea, 2% Nonidet P-40 (NP-40); 1,6% anfolitos pH 7-10 y 0,4% anfolitos pH 3-10 se polimerizaron por 2 hs (bajo agua) con persulfato de amonio y TEMED como sistema catalizador .

La electroforesis se realizó llenando el reservorio inferior de la cuba con NaOH 0,02 M y el superior con H_3PO_4 0,01 M.

Las muestras se diluyeron en buffer de lisis suplementado con urea 9,8 M, siendo la concentración final de la misma 8,5 M y se cubrieron con 20 μ l de una solución de urea 8 M y anfolitos 1%.

El ánodo se conectó al compartimento superior de la cuba y se desarrolló la electroforesis por 3,5 hs a 400 volts sin realizar el preenfocado de los anfolitos.

Al finalizar los geles se desplazaron del interior de los tubos cuidadosamente por presión y se conservaron a -20 °C.

12-4-2. Segunda dimensión.

Los geles desarrollados en la primera dimensión se equilibraron por 30 minutos en buffer de muestra con SDS a temperatura ambiente y se colocaron en forma horizontal sobre geles de poliacrilamida al 18% con urea 6M semejantes a los

monodimensionales. Ambos geles se unieron empleando una solución de agarosa 0,5% disuelta en el buffer de muestra con SDS.

Al finalizar la corrida electroforética los geles se fijaron incubandolos 30 minutos en 25% de isopropanol, 7,5% de ácido acético. Después de enjuagar exhaustivamente para eliminar el ácido los geles se prepararon para su fluorografía tratándolos con una solución de salicilato de sodio 1M (191) por 30 minutos. Inmediatamente los geles se secaron al vacío a 60°C y se autorradiografiaron a -70°C.

Buffer de muestra con SDS

glicerol	10% (p/v)
SDS	2,3% (p/v)
β MSH	5% (v/v)
Tris HCl pH 6,8	0,0625 M

13-.Infección de *E.coli* LM 27 con el bacteriófago MS 2.

Las bacterias se cultivaron aeróbicamente en medio MOPS que contenía los agregados descritos en cada caso. Al alcanzar el cultivo una concentración de $2 \cdot 10^8$ células/ml (D.O. 490= 0,4) se infectó con el virus MS 2 a una multiplicidad de 10 partículas virales por célula; 5 minutos después de la infección se agregó rifampicina (200 μ g/ml) para detener selectivamente la transcripción del RNA del huésped y en ciertos casos a los 10 minutos de la infección se agregó 12,5 μ g/ml de estreptomicina. Se marcaron las proteínas producidas entre los 30 y 60 minutos post-infección por

incubación con [^{35}S] metionina (50 $\mu\text{Ci/ml}$, 0,6 μM). Las muestras se trataron como se indicó previamente para su análisis electroforético.

14- Transformación con un plásmido que confiere resistencia a kanamicina.

Las cepas de *E.coli* LM 27 y LM 53 fueron transformadas con el plásmido pVK 102 (192), cuyo mapa se observa en la Figura 3.

Este plásmido de 23 kilobases confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y tetraciclina y es comunmente utilizado como vector de clonado.

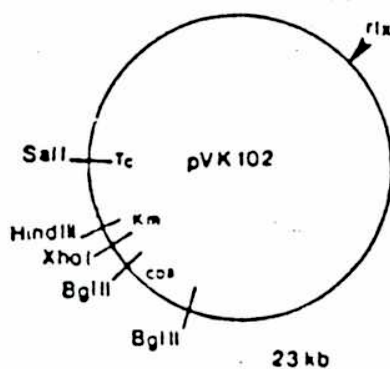


Figura 3: mapa genético del plásmido pVK 102

Las cepas bacterianas mencionadas previamente se transformaron empleando el método del CaCl_2 descrito por Dagert y Ehrlich (193). Las transformantes se seleccionaron por la expresión de resistencia a tetraciclina y las colonias aisladas fueron replaqueadas y seleccionadas nuevamente por resistencia a los dos antibióticos. Se comprobó la retención de los marcadores auxotróficos originales en las colonias aisladas, replicandolas en agar mínimo con o sin poliaminas y los aminoácidos treonina, leucina, histidina y prolina.

15-Obtención rápida de DNA plasmídico.

La presencia del plásmido en las cepas transformadas se comprobó mediante el aislamiento de DNA plasmídico por la técnica de Birnboim y Doly (194). Se inocularon ocho mililitros de medio LB suplementados con tetraciclina con bacterias provenientes de una colonia resistente a los antibióticos. Después de incubar durante la noche a 37 °C, las células se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante aspirando cuidadosamente para evitar que quede medio de cultivo en el precipitado. Las bacterias se resuspendieron en 90 μ l de lisozima 4mg/ml en Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM empleando un vortex; 100 μ l de esta suspensión se transfirieron a un tubo limpio al que se agregó 200 μ l de una solución de SDS 1% en NaOH 0,2 N, agitando inmediatamente y dejando en hielo por 10 minutos. Posteriormente se agregó 150 μ l de NaAcO 3M pH 4,8 y dejó otros 15 minutos en hielo. Se centrifugó 5 minutos en microcentrifuga y el sobrenadante se precipitó a -20 °C con 1 ml de etanol. El DNA se resuspendió en 200 μ l de H₂O y luego de agregar 100 μ l de NH₄AcO 7,5 M se reprecipitó a -70 °C por agregado de 2 volúmenes de etanol 100%. Finalmente las muestras se resuspendieron en 40 μ l de H₂O y se conservaron a -20 °C.

16-Obtención de kanamicina fosfotransferasa

Células de *E.coli* LM 27 y LM 53 transformadas o no con el plásmido pVK 102 se desarrollaron por diferentes tiempos en presencia de 50 μ g/ml de kanamicina. Fracciones de 20 ml de estos cultivos se cosecharon por centrifugación,

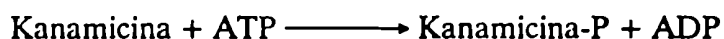
las células se lavaron con 2 ml del buffer A y finalmente se resuspendieron en 1 ml del mismo buffer. Las muestras se sonicaron en hielo por 2 minutos usando pulsos de 30 segundos con intervalos de 15 segundos y finalmente, los extractos se centrifugaron durante 30 min a 30.000 g. Los sobrenadantes se dializaron por cuatro horas a 4 °C contra el buffer A y la fracción dializada, que se utilizó como fuente de enzima, se conservó a -70 °C .

Buffer A:

Tris HCl	10 mM pH=7,5
MgCl ₂	10 mM
NH ₄ Cl	25 mM
βMSH	0,6 mM

16-1. Determinación de actividad de kanamicina fosfotransferasa.

Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato a los antibióticos neomicina o kanamicina, produciendo la inactivación de los mismos.



La actividad enzimática se determinó por la transferencia de ³²P al antibiótico a partir de τ [³²P]ATP (195).

Una alícuota de la fracción enzimática que contenía 1 μg de proteína se diluyó a 40 μl, se mezcló con un volumen igual de la solución de reacción y se incubó a 37 °C. Al cabo de 30 minutos los tubos de reacción se

centrifugaron 15 segundos en una microcentrífuga y se tomaron muestras de 15 μ l del sobrenadante que se depositaron sobre trozos de 1 cm² de papel Whatman P81 que se sumergieron inmediatamente en 500 ml de agua a 100 °C por 2 minutos para inactivar a la enzima. Estos filtros se lavaron a continuación dos veces con agua a temperatura ambiente, se secaron al aire y se determinó la radiactividad retenida en los mismos por centelleo líquido. El carácter catiónico de la molécula de antibiótico le confiere tanto a éste como a las formas fosforiladas del mismo la propiedad de quedar retenidos en el papel de fosfocelulosa luego de los lavados, mientras el ATP, que posee carga negativa, no se retiene y es eliminado.

Solución de reacción:

ATP	0,1 mM
Kanamicina	1 mg/ml
NaF	10 mM
BSA	50 mg/ml
[³² P]ATP	4.10 ⁵ cpm/ml
buffer B	1/5.

Buffer B :

Tris HCL	333 mM
MgCl ₂	210 mM
NH ₄ Cl	2 M

El pH se ajusta a 7,1 con ácido málico 1M

17-Obtención de RNA total de E.coli.

El RNA total de E.coli se aisló empleando un método de purificación rápido que evita la centrifugación en un gradiente de CsCl (196).

Se cosecharon 20 ml de cultivo por centrifugación a 4 °C y 16000 rpm por 30 min. El precipitado de bacterias se resuspendió en 2 ml del medio original y se centrifugaron alícuotas que contenían 1.10^9 células en microcentrífuga por 30 minutos a 14.000 rpm y 4 °C .

El precipitado se resuspendió en 0,2 ml de buffer STET, utilizando un vortex para acelerar el proceso. A continuación se agregó 12,5 μ l de una solución de lisozima 5 mg/ml (en Tris HCl 10 mM, pH 8) preparada en el momento y se agitó suavemente por inversión durante 10 segundos. La mezcla se hirvió durante un minuto, se agregó 75 μ l de EDTA 0,5 M frío y se dejó reposar en hielo por 10 minutos. El DNA cromosomal se separó centrifugando por 20 min a 14.000 rpm y 4 °C. El RNA presente en el sobrenadante, se precipitó haciendo la solución 2,5 M en NH_4AcO , incubando 15 min en hielo y centrifugando en microcentrífuga a 14.000 rpm por 20 min. y 4 °C (197). El precipitado obtenido se lavó con etanol 70% a -20 °C y se secó al vacío a temperatura ambiente.

El sobrenadante, que contiene el DNA plasmídico, se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol. Ambas fracciones se resuspendieron en 20 μ l de agua y se conservaron a -70 °C.

Buffer STET:

Sacarosa	8%
Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA	50 mM
Tritón X 100	5%

17-1. Análisis de la integridad del RNA.

La integridad de los RNA obtenidos, así como la ausencia de contaminación con DNA, se analizó por electroforesis en gel de agarosa 0,8% en buffer TBE 0,5X (198). Se tomó como criterio de integridad de las muestras la visualización bajo luz ultravioleta de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales de 23 S y 16 S.

17-2. Determinación de la concentración de RNA

La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm, sabiendo que un valor de absorbancia igual a 1 corresponde a una concentración de 40 μg de RNA/ml (198).

17-3. Cuantificación de RNA mensajero por Dot-Blot.

Los niveles de RNA mensajero para la enzima kanamicina fosfotransferasa se dosaron por hibridización con la sonda de DNA específico marcada con [^{32}P]. La sonda se fabricó de modo tal que se debe aparear con una secuencia interna del RNA que se deseaba cuantificar.

El RNA a dosar, previamente desnaturalizado, se diluyó en forma sucesiva y las muestras se depositaron sobre un filtro de nitrocelulosa, el RNA se fijó a la membrana y luego se realizó la hibridización, según se detalla a continuación (199).

17-3-1. Tratamiento de las muestras.

Las muestras de RNA se desnaturalizaron de la siguiente manera: se agregaron 43,5 μ l de la mezcla desnaturalizante a 10 μ g de RNA en un volumen de 15 μ l y se incubó la mezcla por 15 minutos a 65 °C. Luego de agregar 117 μ l de buffer SSC 20X frío, incubar en baño de hielo y realizar cuatro diluciones sucesivas (1/3) de cada muestra con buffer SSC 15X, se aplicaron las mismas sobre la membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato de "manifold". Antes de la aplicación de las muestras el filtro de nitrocelulosa se equilibró por 30 min. en 20X SSC y se lavó 2 veces con 10X SSC.

Al finalizar la operación el filtro se secó por succión con vacío durante 5 min. y luego se calentó a 80 °C por 2 hs. para fijar el RNA al mismo.

Mezcla desnaturalizante

Formamida	30 μ l
Formaldehido 37%	10,5 μ l
20X SSC	3 μ l

17-3-2. Hibridización.

Se realizó un tratamiento de prehibridización por 30 min a 65 °C en presencia de 5X SSPE, solución Denhardt 5X, SDS 0,5% y 0.1 mg/ml de DNA de esperma de salmón. Luego se hibridizó con la misma solución agregando la sonda radiactiva e incubando durante la noche a la misma temperatura.

Los filtros se lavaron dos veces en 2X SSPE, 0,1% SDS por 10 minutos a temperatura ambiente, una vez en 1X SSPE, SDS 0,1% a 65 °C por 15 minutos y una vez en 0,1X SSPE, SDS 0,1% a 65 °C por 10 minutos.

Los filtros se secaron y se autorradiografiaron a -70°C. La radiactividad asociada a cada muestra se determinó recortando los trozos correspondientes de los filtros y utilizando un contador de centelleo líquido.

17-3-3. Soluciones utilizadas en la electroforesis de RNA y en su cuantificación por

Dot-Blot

-TBE 5X:

Tris	54 g
Acido Borico	27,5 g
EDTA 500 mM pH 8	20 ml

Llevar a 1 litro.

-Buffer TE

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

-20X SSC

NaCl	3 M
Na ₃ Citrato	0,3 M

-20X SSPE

NaCl	3,6 M
Fosfato de Na	0,2 M
EDTA pH 7	0,02 M

-Solución Denhardt 100X

BSA	2%
Ficoll	2%
PVP(polivinilpirrolidona)	2%

18-Preparación del fragmento Hind III-Bgl II del plásmido pVK 102.

Para determinar la presencia del RNA mensajero en estudio se utilizó como sonda radiactiva el fragmento obtenido con las enzimas de restricción HindIII y Bgl II a partir del plásmido pVK 102 .

Para la obtención del fragmento, se trataron 45 μ g de DNA del plásmido con 10 unidades enzimáticas de las enzimas Hind III y Bgl II en un volumen final de 100 μ l por 3 hs. a 37°C en las condiciones indicadas por el proveedor de las enzimas (Boehringer Mannheim). Se analizaron 3 μ l de la mezcla de reacción por electroforesis en agarosa y se observó la producción de los cortes deseados. Al completar la reacción se agregaron 10 μ l de NaAcO 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto precipitándose el DNA a -70 °C. El precipitado se resuspendió en 30 μ l de buffer TE y se sembró toda la muestra en un minigel de agarosa.

Se localizó la banda de interés empleando luz ultravioleta y se cortó la sección del gel que la contenía con la ayuda de un escalpelo, colocándola dentro de una bolsa de dialisis que contenía buffer TBE 0,5X. El DNA se electroeluyó del gel por

30 minutos con la misma intensidad de corriente que la utilizada durante la electroforesis (200)

La solución se recuperó de la bolsita de dialisis y el DNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol resuspendiendolo finalmente en 20 μ l de buffer TE. Como se puede observar en la Figura 4 la concentración del fragmento obtenido se estimó por electroforesis en agarosa de una alícuota del mismo y comparando la intensidad de la banda teñida con bromuro de etidio con la producida por una muestra de fago de concentración conocida tratada con Hind III . De la misma manera se comprobó que la fracción aislada contenía solamente el fragmento deseado.

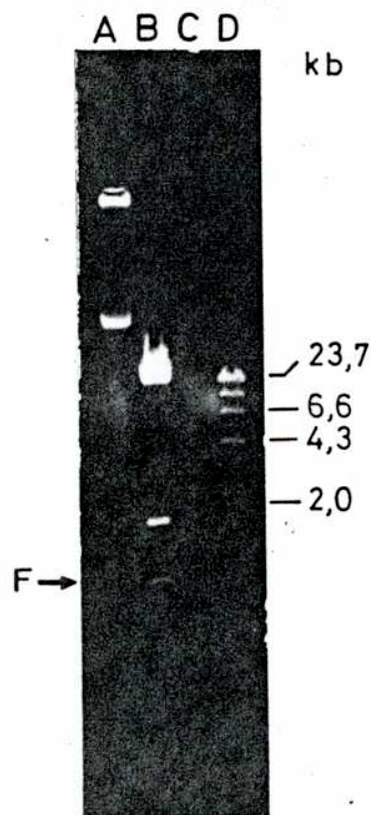


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % del fragmento Hind III-Bgl II obtenido a partir del plásmido pVK 102.

El fragmento purificado como se describió previamente se analizó por electroforesis junto con los siguientes controles: A: plásmido pVK 102; B: plásmido pVK 102 tratado con las enzimas Hind III-Bgl II, C: fragmento purificado, D: DNA de fago tratado con Hind III.

18-1. Marcación de la sonda producida con [³²P]dCTP y posterior purificación de la misma.

La sonda obtenida se marcó con ³²P por el método de "Random primed DNA labeling" siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). En el ensayo se trataron aproximadamente 60 ng de DNA durante la noche a temperatura ambiente, siendo la eficiencia de la incorporación del 55%. En general la muestra marcada tenía una actividad específica de $0,3 \cdot 10^9$ DPM/ μ g.

La sonda marcada se purificó de los deoxirribonucleótidos radiactivos no incorporados mediante cromatografía en columna de Sephadex G-50 (medium) (1 ml) equilibrada en buffer TE (201).

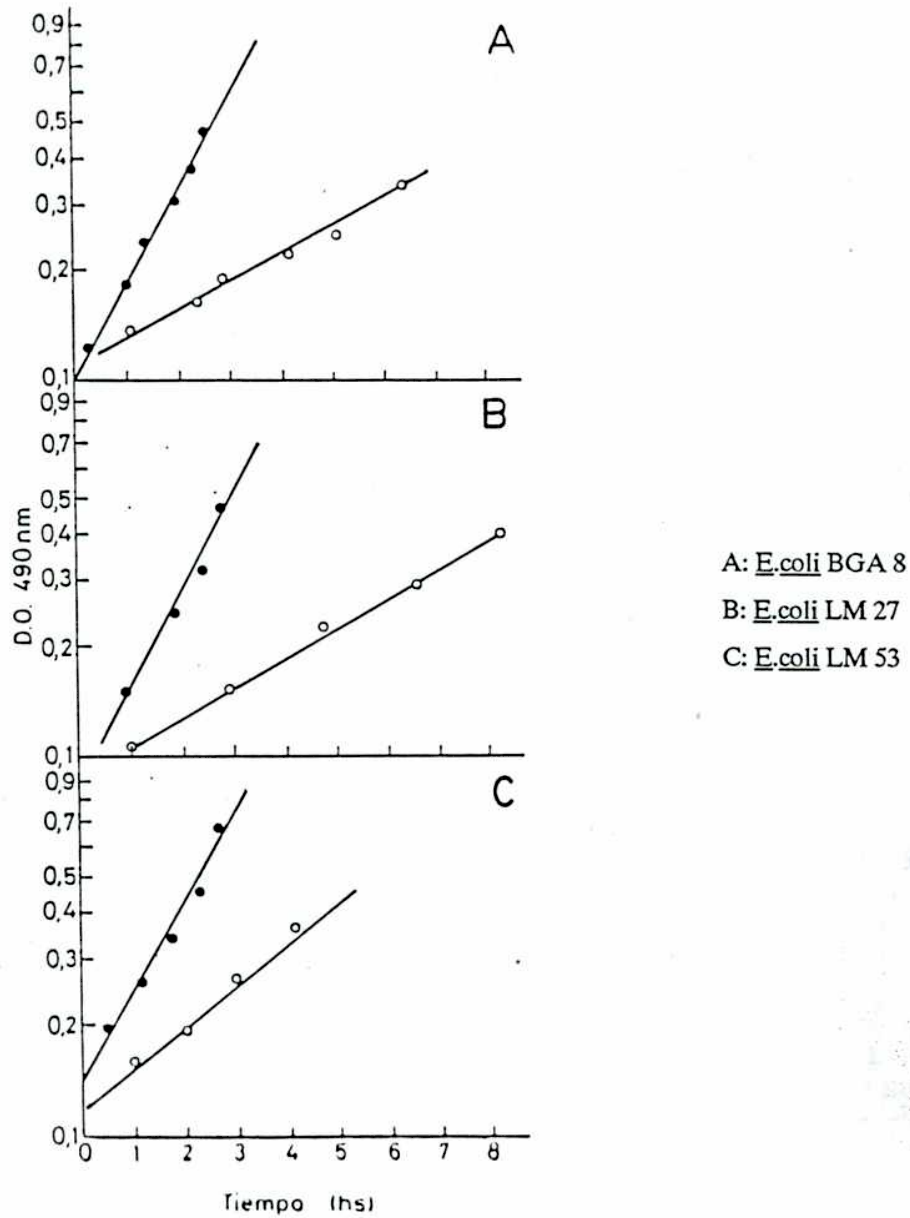
18-2. Determinación de la concentración de DNA de plásmido.

La concentración de DNA plasmídico se determinó por absorbancia a 258 nm, sabiendo que un valor de absorbancia de 0,024 corresponde a una concentración de DNA de 1μ g/ml.

19. Determinación de la concentración de proteínas.

Las concentraciones de proteínas presentes en las muestras se determinaron utilizando el método descrito por Lowry y colaboradores (202)

Figura 5: Curvas de crecimiento de diferentes cepas de E.coli auxótrofas para poliaminas cultivadas en presencia o ausencia de estas sustancias.



El crecimiento bacteriano se siguió determinando la absorción a 490 nm (A_{490}) de cultivos cultivados en presencia ● o ausencia ○ de poliaminas.

III-RESULTADOS.

1-. Características del crecimiento de diferentes cepas de E.coli deficientes en poliaminas.

Las poliaminas son compuestos esenciales para el desarrollo celular. Las cepas de E.coli deficientes en la biosíntesis de estas sustancias pueden multiplicarse en su ausencia aunque, como se observa en la Figura 5, lo hacen con una velocidad de crecimiento menor que en presencia de las mismas, siendo esta disminución una característica particular de cada cepa.

En la Tabla III se incluyen los tiempos de duplicación de las cepas de E.coli auxótrofas para poliaminas utilizadas en el presente trabajo cultivadas en medio mínimo suplementado o no con poliaminas.

cepa bacteriana	tiempo de duplicación	
	en presencia de poliaminas (min)	en ausencia de poliaminas (min)
<u>E.coli</u> BGA 8	65	250
<u>E.coli</u> LM 27	65	210
<u>E.coli</u> LM 53	70	150

Tabla III: Tiempos de duplicación de diferentes cepas de E.coli deficientes en la biosíntesis de poliaminas cultivadas en presencia o ausencia de estas sustancias.

2.-Efectos del ayuno de aminoácidos sobre la síntesis proteica en bacterias deficientes en poliaminas.

Las células bacterianas son capaces de coordinar un gran número de reacciones bioquímicas en respuesta a un cambio nutricional. Uno de los factores que inician este tipo de regulación es la disminución drástica de la disponibilidad de algún aminoácido necesario para la síntesis de proteínas. En el laboratorio se puede lograr el ayuno de un aminoácido esencial mediante el empleo de diferentes estrategias tales como: privar a las células de algún aminoácido por el cual posean requerimientos, utilizar análogos de aminoácidos capaces de interferir en la biosíntesis de los productos naturales o por inducir la de inhibición, por el producto final de un camino biosintético, en la producción de ciertos aminoácidos . Otra alternativa con similares efectos es impedir la reacción de aminoacilación mediante el empleo de mutantes que contengan alguna aa-tRNA sintetasa termosensible trabajando a una temperatura mayor que la restrictiva.

La falta de un aminoácido esencial produce, entre otras alteraciones, una rápida disminución del desarrollo celular y la inhibición de la síntesis de proteínas. En estas condiciones, aunque a menor velocidad, la síntesis de proteínas "de novo" todavía continua a un nivel significativo. La síntesis residual observada en ausencia de un aminoácido esencial puede deberse a la producción de proteínas que carecen del aminoácido faltante, a la síntesis de nuevas proteínas a partir de los aminoácidos liberados por proteólisis inducida por la falta del aminoácido esencial o por la incorporación errónea de otros aminoácidos en reemplazo del ausente.

La primera hipótesis podría descartarse en muchos casos ya que los niveles de síntesis residual parecen ser independientes de la naturaleza del aminoácido ausente

(203), aunque la respuesta al ayuno está fuertemente influenciada por la naturaleza estricta o relajada de la cepa en estudio (204). En las células relajadas (rel^-) las alteraciones de la síntesis de proteínas son dependientes del aminoácido ausente, mientras que en las cepas estrictas (rel^+) el comportamiento es independiente de la naturaleza de cada aminoácido.

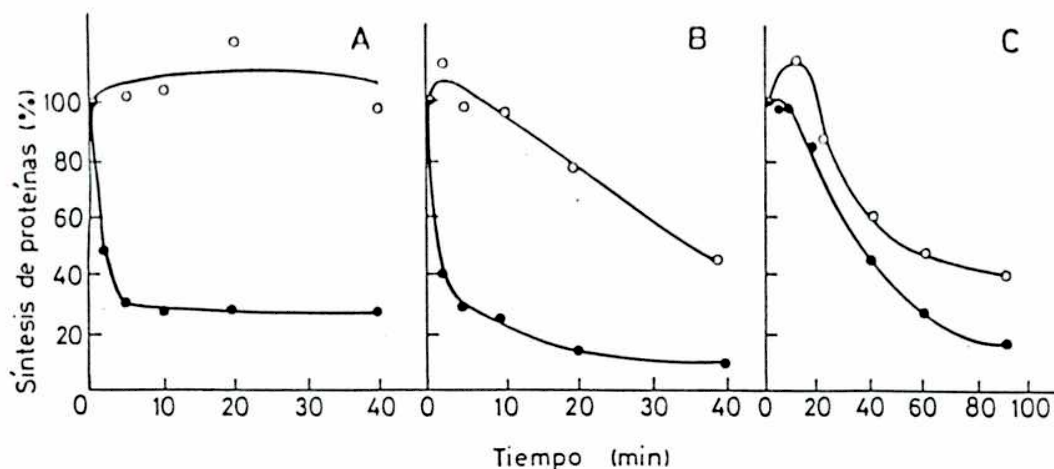
En nuestro caso se analizó la influencia de la presencia de poliaminas sobre distintos aspectos de la síntesis de proteínas llevada a cabo durante el ayuno de diversos aminoácidos esenciales. Se investigó en particular si los niveles de síntesis residual pueden tomarse como una medida indirecta de la fidelidad de la traducción.

Se estudiaron los efectos del ayuno de un aminoácido esencial sobre la síntesis total de proteínas en diversas cepas de E.coli auxótrofas para poliaminas cultivadas en presencia o ausencia de estas sustancias.

En la Figura 6 se observan los niveles remanentes de síntesis proteica cuando las células de las cepas de E.coli BGA 8 y LM 27 son sometidas a un ayuno de isoleucina, leucina o histidina comparados con los niveles de los correspondientes controles no ayunados.

Los cultivos desarrollados con niveles normales de poliaminas son más sensibles a la falta de cualquier aminoácido esencial, observándose una rápida inhibición de la síntesis de proteínas al inducir el ayuno. En ausencia de poliaminas la respuesta depende del aminoácido faltante, notándose una gran variación que va desde la total insensibilidad a la falta de isoleucina a diversos grados de inhibición durante los ayunos de leucina e histidina.

Figura 6: Síntesis de proteínas durante el ayuno de diferentes aminoácidos esenciales.

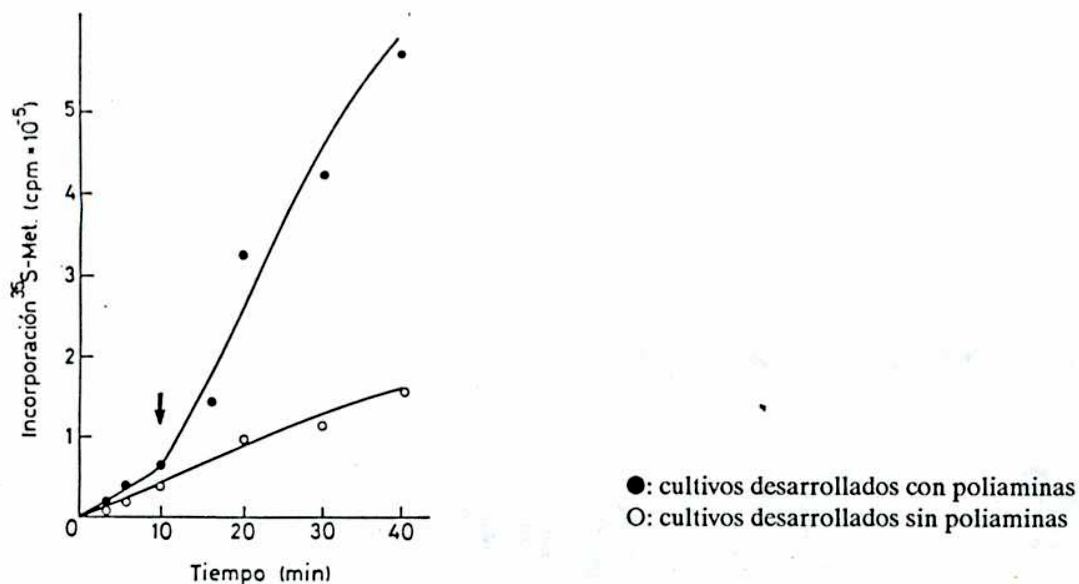


Cultivos de *E. coli* desarrollados en presencia ● o ausencia ○ de poliaminas fueron sometidos al ayuno de diferentes aminoácidos tal como se describió en materiales y métodos. Se cuantificó la síntesis de proteínas mediante la incorporación de [³⁵S] Metionina al material insoluble en TCA 12% a partir del comienzo del ayuno. Los valores presentados son relativos a un control no ayunado.

- A: *E. coli* BGA 8 sometida a ayuno de isoleucina
 B: *E. coli* BGA 8 sometida a ayuno de leucina
 C: *E. coli* LM 27 sometida a ayuno de histidina

Como podría esperarse, al analizar estos resultados, la Figura 7 muestra que la interrupción del ayuno de isoleucina por el agregado exógeno del aminoácido origina un marcado e inmediato incremento de la síntesis de proteínas sólo en los cultivos suplementados con poliaminas, mientras que los desarrollados en ausencia de estas sustancias no sufren ninguna variación por agregado del aminoácido.

Figura 7: Síntesis de proteínas por *E.coli* BGA 8 durante la reversión del ayuno de isoleucina.



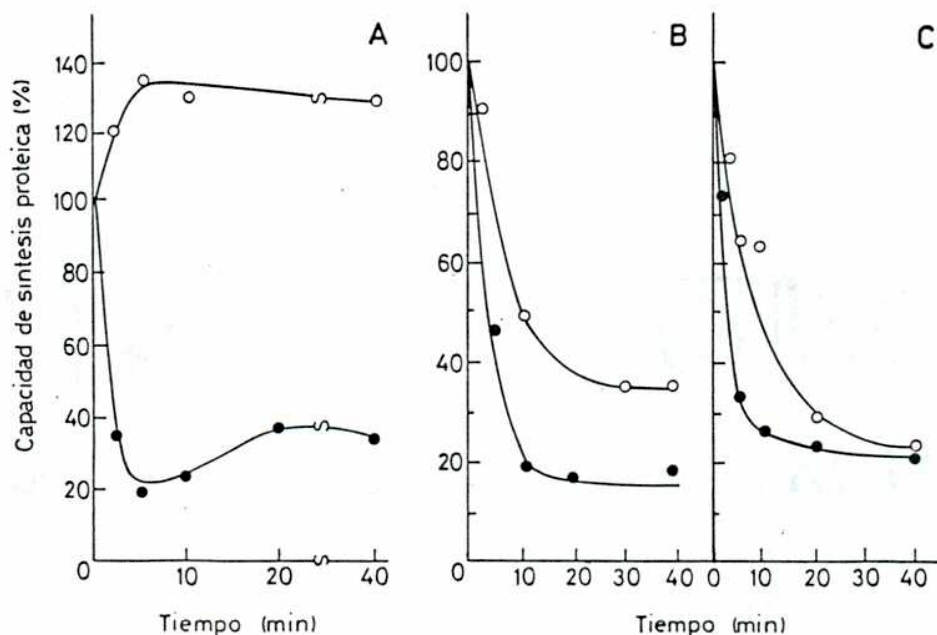
Se determinó la síntesis de proteínas a partir del comienzo de un ayuno de isoleucina como se indicó en la figura 6. Luego de 10 minutos de ayuno se finalizó el mismo suplementando los cultivos con el aminoácido ausente.

2-1. Capacidad de síntesis proteica durante el ayuno de aminoácidos.

Se definió como capacidad de síntesis proteica de un cultivo a la cantidad total de proteínas sintetizadas durante dos minutos por una alícuota del mismo. Sus valores se determinaron incubando las células con $[^{35}\text{S}]$ metionina y midiendo la cantidad de radiactividad incorporada en la fracción insoluble en TCA 12% a 0°C . La determinación de la variación de la capacidad de síntesis proteica luego de diferentes tiempos de ayuno de un aminoácido brinda información sobre las alteraciones del mecanismo de traducción durante el proceso de ayuno .

Como se observa en la Figura 8 la disminución de la capacidad de síntesis de proteínas durante la ausencia de un aminoácido esencial es, en todos los casos, mayor y más rápida en los cultivos desarrollados en presencia de poliaminas, siendo este efecto independiente del aminoácido ausente. En ausencia de poliaminas no solo se observa una menor sensibilidad a la falta de cualquier aminoácido sino que existe una marcada dependencia de la respuesta con cada aminoácido en particular.

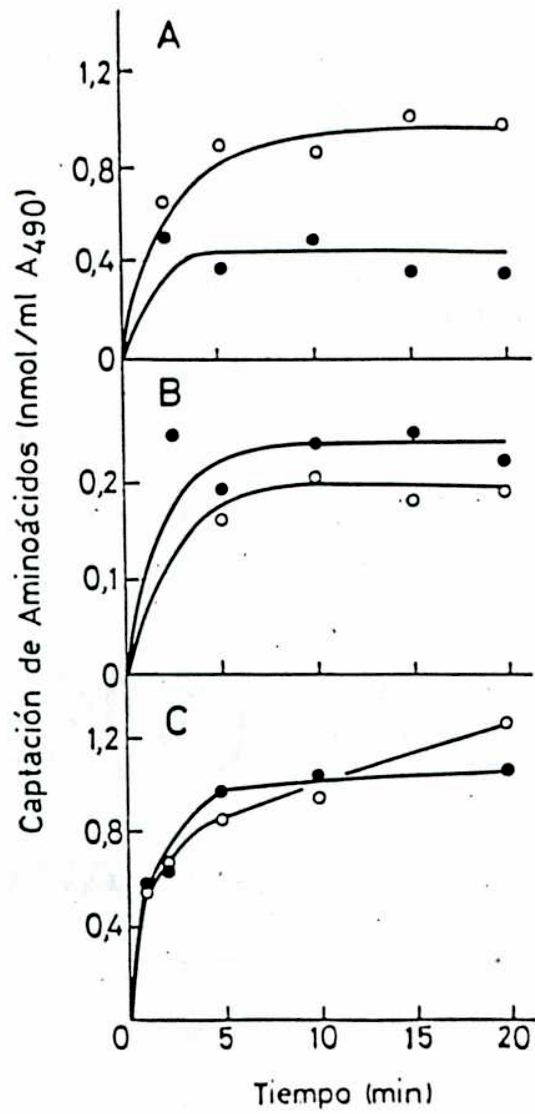
Figura 8: Variación de la capacidad relativa de síntesis proteica durante el transcurso de un ayuno de diversos aminoácidos.



La capacidad de síntesis proteica se determinó por la incorporación de [^{35}S] Metionina al material insoluble en TCA 12% durante un pulso de 2 minutos en cultivos desarrollados con ● o sin ○ poliaminas. Los valores obtenidos se expresan en porcentajes de los correspondientes a los de un control no ayunado.

- A: *E. coli* BGA 8 sometida a ayuno de isoleucina
- B: *E. coli* BGA 8 cultivada sin leucina
- C: *E. coli* LM 27 cultivada sin histidina

Figura 2: Captación de diversos aminoácidos por células de *E.coli* BGA 8 desarrolladas en presencia ● o ausencia ○ de poliaminas



A: captación de valina
B: captación de isoleucina
C: captación de metionina

2-2. Captación de aminoácidos.

Las menores sensibilidades a la falta de ciertos aminoácidos esenciales que muestran los cultivos desarrollados en ausencia de poliaminas respecto de los suplementados con estos poliaminas podría deberse a diferentes niveles en la captación de aminoácidos por parte de las células cultivadas en las distintas condiciones. Como se observa en la Figura 9, la captación de los distintos aminoácidos es independiente del contenido endógeno de poliaminas. En algunos casos, como con la captación de valina que es el aminoácido que causa el ayuno de isoleucina, es mayor en los cultivos desarrollados en ausencia de poliaminas, que sin embargo son refractarios a la falta de este aminoácido.

2-3. Capacidad de síntesis proteica en cultivos realizados con diversas fuentes de carbono.

Para descartar que la resistencia de la síntesis de proteínas a la falta de ciertos aminoácidos esenciales de los cultivos desarrollados sin poliaminas fuera sólo una consecuencia de su menor velocidad de duplicación, se decidió cultivar células de E.coli BGA 8 suplementadas con poliaminas utilizando fuentes de carbono alternativas a la glucosa como glicerol o succinato de sodio. En estos casos en que, pese a contener poliaminas, la velocidad de crecimiento del cultivo es menor, se puede analizar los efectos producidos por el ayuno de isoleucina sobre la síntesis de proteínas .

En la Tabla IV puede observarse la variación de los tiempos de duplicación de E.coli BGA 8 cultivada en distintas fuentes de carbono.

<u>Fuente de Carbono</u>	<u>Tiempo de duplicación</u> (min)
glucosa	70
succinato de sodio	110
glicerol	85

Tabla IV: tiempos de duplicación de E.coli BGA 8 desarrollada con diversas fuentes de carbono.

Se determinó la capacidad de síntesis proteica durante el transcurso del ayuno de isoleucina en los cultivos realizados en presencia de putrescina y desarrollados en succinato de sodio como fuente de carbono y se comparó con el comportamiento observado cuando la fuente de carbono era glucosa. Como se ve en la Figura 10 la falta del aminoácido mencionado afecta en forma similar a la síntesis proteica de las células desarrolladas en cualquiera de los dos medios. Esto demuestra que la sensibilidad al ayuno es independiente de la velocidad de crecimiento celular, pero está directamente relacionada con los niveles de poliaminas que poseen las bacterias.

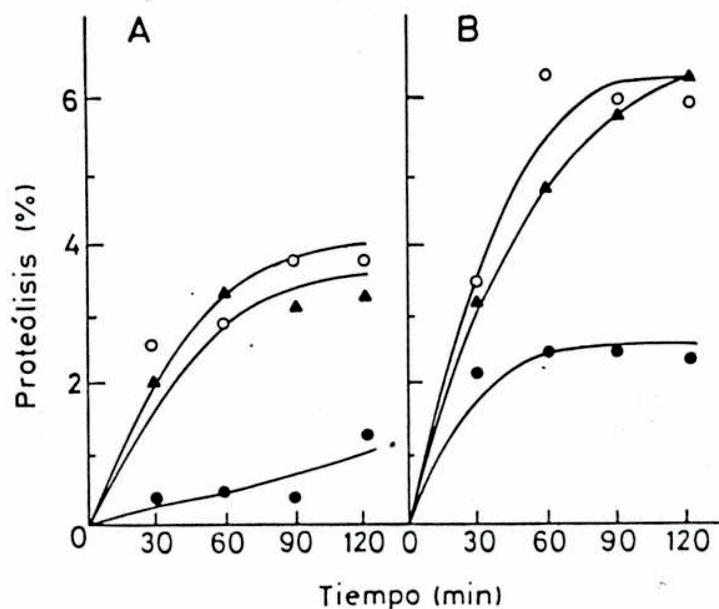
2-4. Determinación de los niveles intracelulares de proteólisis.

La respuesta de la síntesis proteica a la falta de ciertos aminoácidos está claramente determinada por los niveles intracelulares de poliaminas. En células con un contenido endógeno normal de poliaminas se produce una rápida inhibición de la traducción la cual es independiente del aminoácido faltante. En cambio las células con contenidos de poliaminas anormalmente bajos son relativamente insensibles al ayuno, siendo su comportamiento altamente dependiente del aminoácido ausente.

Este comportamiento podría justificarse si en las células no suplementadas con poliaminas existieran altos niveles de degradación proteica durante el ayuno, lo que elevaría los niveles intracelulares de aminoácidos libres disponibles para su reutilización en la síntesis de nuevas proteínas.

En la Figura 11 se observa que los niveles basales de proteólisis son mayores en los cultivos desarrollados sin poliaminas. Al someter a las células a un ayuno de isoleucina o de leucina existe un incremento de dos a tres veces en los niveles de degradación de proteínas el cual es independiente del contenido endógeno de poliaminas y del aminoácido faltante.

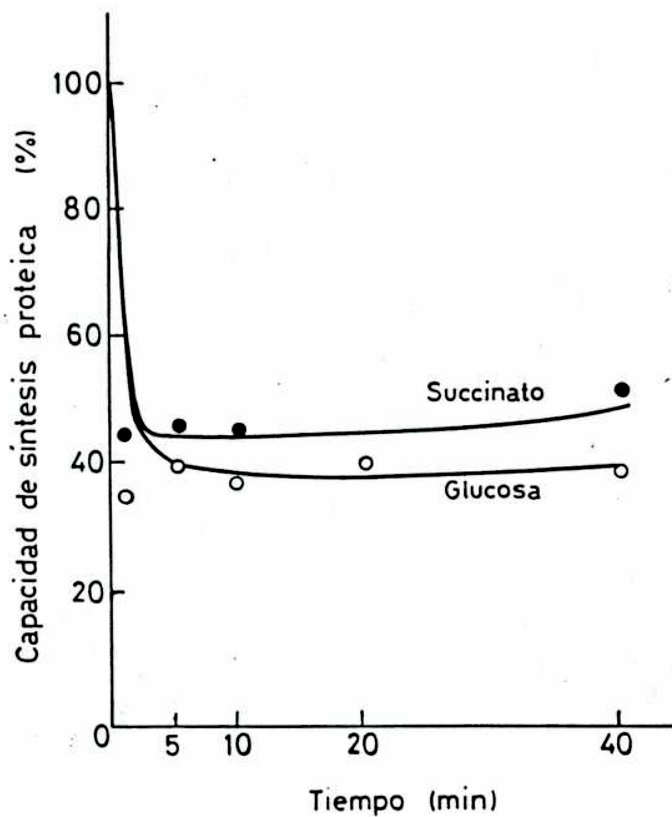
Figura 11: Variación de la proteólisis intracelular durante el transcurso del ayuno de un aminoácido esencial en células auxótrofas para poliaminas.



Los niveles de proteólisis se determinaron como se describió previamente en materiales y métodos en cultivos de *E. coli* BGA 8 suplementados (A) o no (B) con poliaminas durante el ayuno de leucina o isoleucina.

- : control sin ayunar
- : células sometidas al ayuno de leucina
- ▲: células sometidas al ayuno de isoleucina

Figura 10: Capacidad relativa de síntesis proteica durante el ayuno de isoleucina en E.coli BGA 8 suplementadas con poliaminas y desarrolladas con diferentes fuentes de carbono.



●: succinato de sodio
○: glucosa.

Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de los correspondientes a un control no ayunado.

2-5. Análisis cualitativo de las proteínas sintetizadas durante los ayunos de aminoácidos.

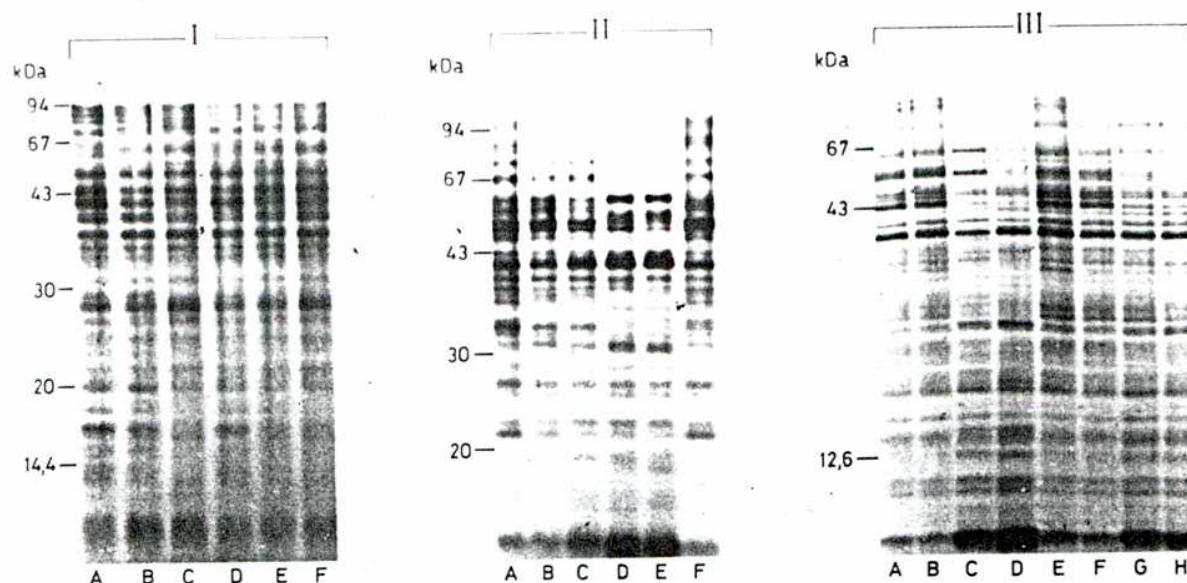
La síntesis de proteínas llevada a cabo por las células desarrolladas en presencia o ausencia de poliaminas durante el ayuno de un aminoácido, podrían diferir solamente en los niveles cuantitativos o también en la naturaleza de los péptidos que se producen en las diversas condiciones.

Para distinguir entre estas dos alternativas se analizaron las proteínas producidas por los cultivos suplementados o no con poliaminas luego de diferentes tiempos de ayuno de varios aminoácidos esenciales. Las células sometidas a los ayunos se marcaron con [³⁵S] metionina y las proteínas radiactivas formadas se estudiaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Al analizar las autorradiografías de los geles, Figura 12, se puede notar que la falta de un aminoácido esencial en los cultivos suplementados con poliaminas induce una disminución general de las proteínas de alto peso molecular y la acumulación de péptidos de menor tamaño. Los perfiles electroforéticos producidos por las células desarrolladas en estas condiciones varían dependiendo del aminoácido esencial que se ha eliminado del medio.

En ausencia de poliaminas, en cambio, las alteraciones inducidas por la falta de un aminoácido son menores y se mantiene aunque algo reducida la producción de péptidos de alto peso molecular.

Durante la falta de isoleucina no se observan cambios apreciables en las proteínas producidas por las células privadas del aminoácido respecto a las de células suplementadas con el mismo, tanto en los cultivos realizados en ausencia o

Figura 12: Perfiles electroforéticos de los péptidos producidos durante el ayuno de diversos aminoácidos esenciales por células de *E.coli* auxótroficas para poliaminas.



I- *E.coli* BGA 8 sometida al ayuno de isoleucina.

A,B,C: Células desrrolladas sin poliaminas
 D,E,F: Células desarrolladas con poliaminas
 A,D : Controles sin ayunar
 B,E : Péptidos producidos luego de 5 min.de ayuno
 C,F : Péptidos producidos luego de 15 min. de ayuno.

II- *E.coli* LM 27 sometida al ayuno de leucina.

A,B,C: Células desrrolladas sin poliaminas
 D,E,F: Células desarrolladas con poliaminas
 A,F : Controles sin ayunar
 B,D :Péptidos producidos luego de 5 min. de ayuno-
 E,F :Péptidos producidos luego de 15 min. de ayuno

III- *E.coli* LM 27 sometida al ayuno de histidina.

A,B,C,D : Células desarrolladas con poliaminas
 E,F,G,H.: Células desrrolladas sin poliaminas
 A,B,E,F: Controles sin ayunar
 C,G : Péptidos producidos luego de 15 min. de ayuno
 D,H : Péptidos producidos luego de 60 min. de ayuno

Las células sometidas al ayuno de los aminoácidos indicados en cada caso se marcaron con [³⁵S] Metionina (20 μ ci/ml, 0,2 μ M) por 5 min. Las muestras se analizaron por PAGE-SDS empleando las siguientes concentraciones de poliacrilamida: I:18%; II:12,5%; III:20% como se describió en materiales y métodos

presencia de poliaminas, lo cual concuerda con lo descrito previamente por O'Farrell (178) para células protótrofas para poliaminas.

Al someter al ayuno de leucina a las células suplementadas con poliaminas se observa una disminución en la producción de péptidos de alto peso molecular y la acumulación de péptidos de 62 y 42 kD de peso molecular que podrían ser proteínas inducidas por las condiciones de stress (205). En cambio en las células desarrolladas sin poliaminas el perfil de péptidos sintetizados no se modifica al eliminar la leucina del medio.

En el caso de la histidina se analizó las diferencias en las proteínas producidas luego de 15 y 60 minutos de la eliminación del aminoácido. A pesar de que la capacidad de síntesis proteica luego de 60 minutos de ayuno de histidina se encuentra inhibida por igual tanto en los cultivos adicionados con poliaminas como en los desarrollados en ausencia de estos compuestos (Figura 8), existen diferencias en las proteínas sintetizadas por los cultivos realizados en las distintas condiciones luego de ese lapso de ayuno. En los cultivos desarrollados sin poliaminas los perfiles electroforeticos son similares luego de 15 o 60 minutos de ayuno, mientras que en los cultivos suplementados con los policaciones es posible observar una disminución progresiva en la producción de proteínas de alto peso molecular a medida que se prolonga el ayuno, junto con la acumulación de péptidos de bajo peso molecular. Por otra parte se visualiza la inducción de péptidos de 62 y 55 kD de peso molecular durante los primeros momentos del ayuno cuya producción disminuye a tiempos de ayuno mayores.

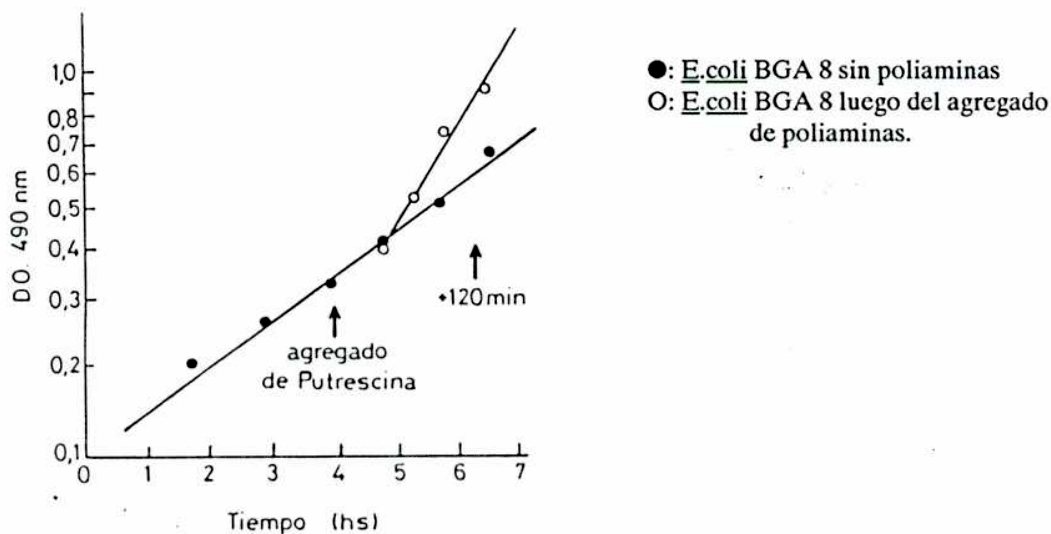
Las diferencias entre los perfiles electroforeticos indicaría que en ausencia de poliaminas existen mayores niveles de reemplazo del aminoácido que falta por otros no codificados por el RNA mensajero, lo que permitiría completar la producción de

péptidos de alto peso molecular. En cambio en presencia de poliaminas la acumulación de polipéptidos de bajo peso molecular sería un indicio de un alto grado de terminación prematura del proceso de traducción provocada por el ayuno del aminoácido.

2-6. Tiempo necesario de presencia de putrescina para alterar la respuesta al ayuno.

Al suplementar con poliaminas un cultivo que se encuentra desarrollando en ausencia de estas sustancias se produce una rápida aceleración de la velocidad de crecimiento. Como se ve en la Figura 13, luego de 60 minutos del agregado de putrescina ya es posible notar una disminución en los tiempos de duplicación del cultivo que alcanza la misma velocidad de desarrollo que un cultivo suplementado originalmente con poliaminas.

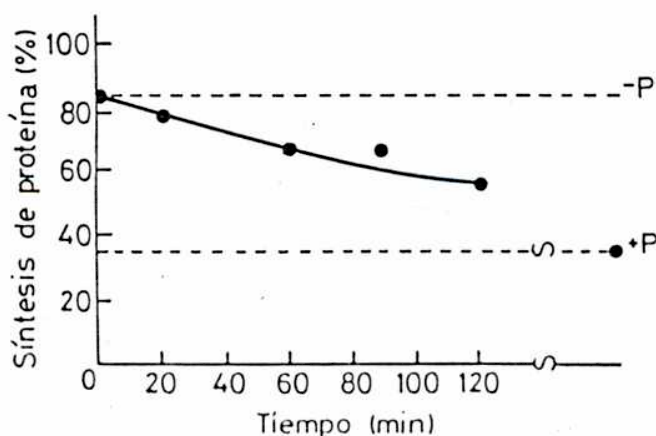
Figura 13: Alteración de la curva de crecimiento de *E.coli* BGA 8 cultivada sin poliaminas por el agregado de putrescina.



Los cultivos se desarrollaron en ausencia de poliaminas siendo suplementados con putrescina (0,05 mg/ml) en el momento indicado.

Al analizar los niveles de la síntesis de proteínas durante un ayuno de 20 minutos de leucina luego de diferentes tiempos del agregado de putrescina, Figura 14, se nota que la transición del fenotipo de resistencia al de sensibilidad a la falta del aminoácido es más lenta que el cambio en la velocidad de crecimiento, ya que luego de dos horas de presencia de las poliaminas la inhibición de la traducción durante el ayuno es intermedia entre las características de un cultivo suplementado y otro sometido al ayuno de poliaminas. Estos resultados indicarían que las respuestas de las células frente al ayuno de un aminoácido dependen del contenido endógeno de poliaminas durante la biosíntesis de los ribosomas y no de la concentración intracelular de estos policationes durante la traducción.

Figura 14: Síntesis de proteínas en cultivos sin poliaminas durante un ayuno de leucina e influencia del agregado de poliaminas.



Cultivos desarrollados en ausencia de poliaminas se suplementaron con putrescina (0,05 mg/ml) como se describió en la figura 13. Luego de incubar las células por diferentes períodos en presencia de poliaminas se determinó la síntesis de proteínas durante un ayuno de 20 min. de leucina y se expresó como porcentajes de los valores correspondientes a los cultivos no ayunados.

- P: cultivo original sin poliaminas
- +P: cultivo desarrollado por varias generaciones en presencia de poliaminas

3-Influencia de poliaminas en la acción de antibióticos aminoglucósidos.

Los resultados obtenidos durante el ayuno de aminoácidos esenciales son un fuerte indicio de que la presencia de poliaminas es responsable del aumento en la fidelidad de la traducción.

Los antibióticos aminoglucósidos son drogas cuyo sitio de acción primario es el ribosoma bacteriano e inducen la producción de altos niveles de errores de traducción como uno de sus primeros efectos. Debido a las acciones aparentemente contrapuestas que producirían estas sustancias y las poliaminas se decidió estudiar si estas últimas pueden alterar la acción de la estreptomycinina y de otros antibióticos aminoglucósidos relacionados.

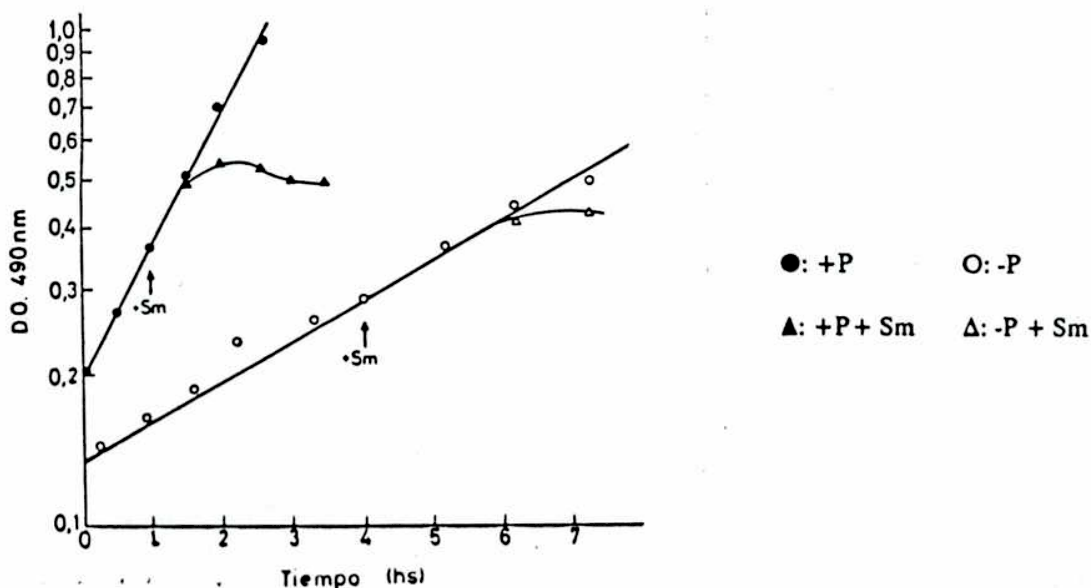
Estudios previos realizados en el laboratorio (206) empleando la cepa E.coli BGA 8 indicaron que los niveles endógenos anormalmente bajos de poliaminas que presentan las células incapaces de biosintetizar estas sustancias dificultan la acción correcta de los antibióticos aminoglucósidos. De esta forma se ha descrito que la cepa E.coli BGA 8 sufre un cambio fenotípico, ya que aunque genéticamente es sensible a la estreptomycinina se comporta como moderadamente resistente al antibiótico cuando se desarrolla en ausencia de putrescina.

Se decidió investigar si este comportamiento frente a la estreptomycinina y otros antibióticos aminoglucósidos era particular de la cepa BGA 8 o constituye una característica general de las células con bajos contenidos endógenos de poliaminas.

3-1. Efectos de la estreptomicina sobre la velocidad de crecimiento de células deficientes en poliaminas.

La presencia de estreptomicina origina una disminución en la velocidad de duplicación de las células sensibles a esta droga. Al estudiar la acción de este antibiótico sobre la cepa *E.coli* BGA 8 se observó que el grado de inhibición de la duplicación celular dependía del contenido endógeno de poliaminas. En la Figura 15 se puede ver las alteraciones de las curvas de crecimiento al tratar los cultivos de *E.coli* BGA 8 con 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Las células desarrolladas en ausencia de poliaminas sufren una menor inhibición que aquellas suplementadas con los policationes.

Figura 15: Influencia de la presencia de estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$) sobre el crecimiento de *E.coli* BGA 8



E.coli BGA 8 se cultivó en ausencia de putrescina. En los momentos indicados por las flechas cada uno de los cultivos se dividió en dos fracciones, se agregó antibiótico a una de ellas y se siguió el desarrollo bacteriano por varias horas.

Se analizó si el agregado de estreptomicina a otras cepas de *E.coli* sensibles al antibiótico y deficientes en el contenido de poliaminas producía una respuesta similar a la mostrada por la cepa BGA 8. Como se ve en la Figura 16 una dosis tan baja de estreptomicina como 5 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de afectar el desarrollo de los cultivos suplementados con putrescina en la cepa de *E.coli* LM 27. En cambio en las células desarrolladas en ausencia de estas sustancias se requieren dosis mayores o tiempos de acción más largos para poder observar una inhibición del crecimiento.

Este mismo comportamiento es también el característico de otras cepas auxótrofas para poliaminas no relacionadas con las anteriores, como *E.coli* LM 53 y EWH 319, lo que indica que esta respuesta es una consecuencia general originada por la ausencia de poliaminas intracelulares.

Figura 16: Alteración de las curvas de crecimiento de *E.coli* LM 27 desarrollada en presencia (A) o ausencia de poliaminas (B) al ser tratadas con diferentes dosis de estreptomicina

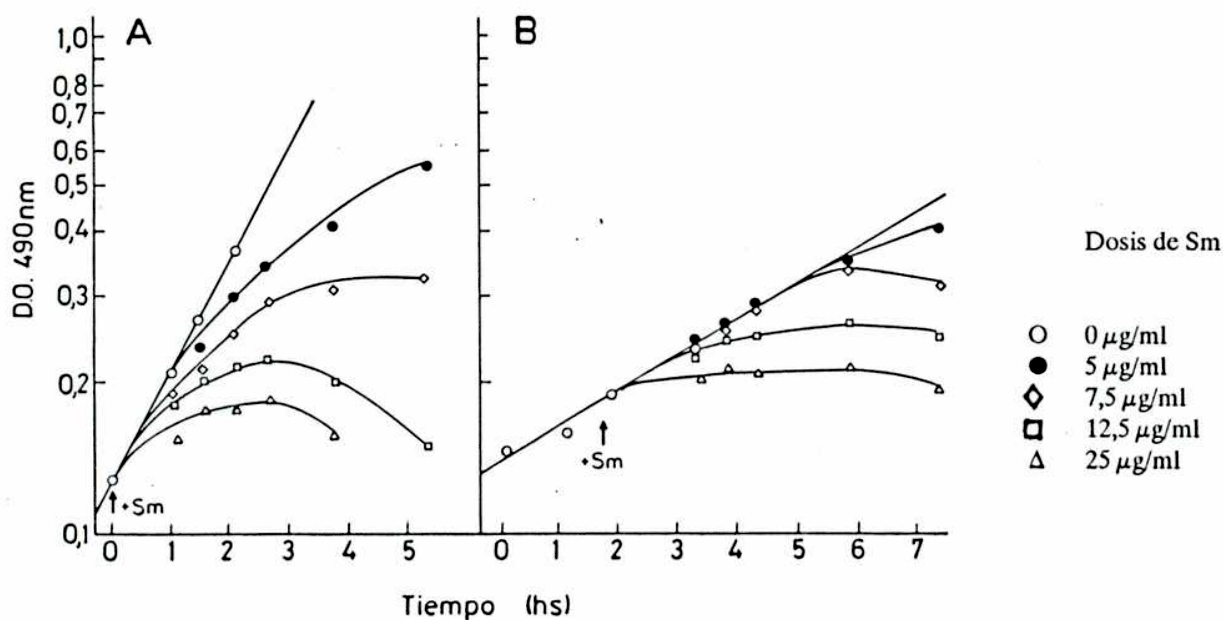
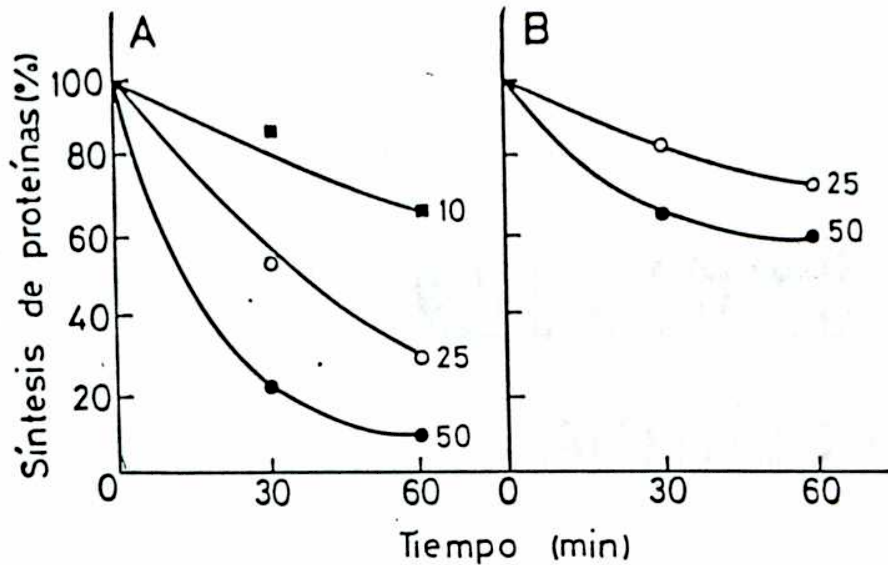


Figura 17: Síntesis de proteínas de *E.coli* BGA8 en presencia de diferentes dosis de estreptomicina.



Cultivos de *E.coli* BGA 8 desarrollados en presencia (A) o ausencia (B) de poliaminas fueron tratados con distintas dosis de estreptomicina. Luego de incubar 20 min. para permitir la captación del antibiótico, se agregó [³⁵S] Metionina, determinándose la incorporación de radiactividad al material insoluble en TCA 12 % luego de 30 y 60 min. de incubación. Los datos presentados son relativos a los valores de los controles cultivados en ausencia del antibiótico.

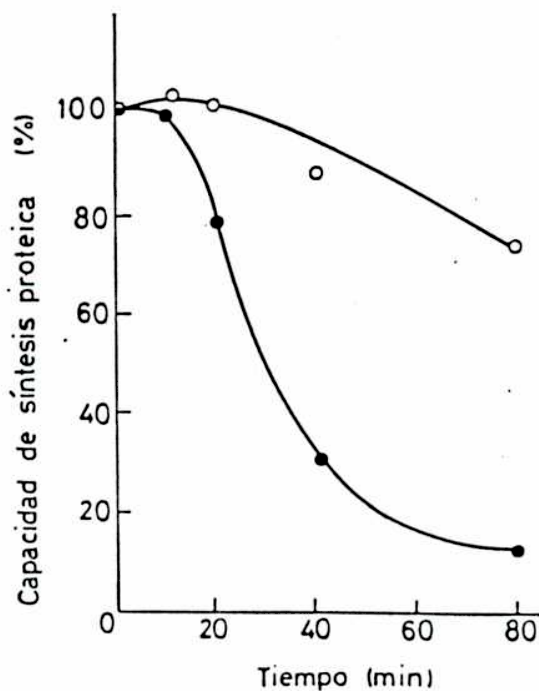
Dosis de estreptomicina

- 10 µg/ml
- 25 µg/ml
- 50 µg/ml

3-2. Síntesis de proteínas en presencia de estreptomicina.

La presencia de estreptomicina provoca una disminución en los niveles de síntesis proteica en las células sensibles a esta droga. En la Figura 17 se observa que en la cepa BGA 8 distintas dosis del antibiótico inhiben con mucha mayor eficiencia la síntesis de proteínas de las bacterias desarrolladas en presencia de poliaminas. La alteración de la capacidad de síntesis de proteínas por la presencia de $25 \mu\text{g/ml}$ del antibiótico (Figura 18) es mayor y más rápida en las células suplementadas con poliaminas.

Figura 18: Efectos de la presencia de estreptomicina ($25 \mu\text{g/ml}$) sobre la capacidad de síntesis proteica de E.coli BGA 8 .



Cultivos de E.coli BGA 8 desarrollados en presencia ● o ausencia ○ de poliaminas se trataron con $25 \mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y se determinó la capacidad de síntesis proteica luego de diferentes tiempos de acción de la droga.

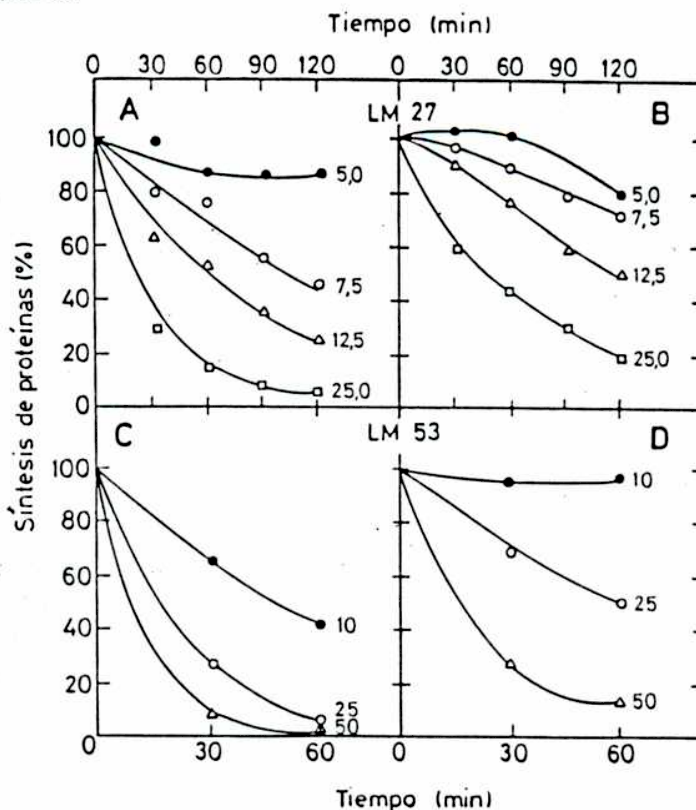
Este efecto diferencial de la droga sobre los cultivos desarrollados en presencia o en ausencia de poliaminas ya había sido descrito tiempo atrás en el laboratorio (134) y pudo demostrarse que es un comportamiento general de las bacterias auxótrofas para poliaminas. Como se muestra en la Figura 19 la cinética de la síntesis de proteínas se altera en menor medida en los cultivos desarrollados sin poliaminas, tanto en la cepa LM 27 como en la cepa LM 53. Los niveles de sensibilidad a la droga son característicos de cada una de las cepas estudiadas, pero en todos los casos existe menor sensibilidad al antibiótico en los cultivos con bajos contenidos endógenos de poliaminas.

Figura 19: Efecto de la presencia de diferentes dosis de estreptomicina en la síntesis de proteínas en *E.coli* LM 27 y LM 53

E.coli: LM 27 cultivada con (A) o sin (B) poliaminas .

E.coli: LM 53 cultivada con (C) o sin (D) poliaminas.

En la figura se indica las dosis de estreptomicina ($\mu\text{g/ml}$) empleadas en cada caso. Se procedió como se indicó en la figura 16.



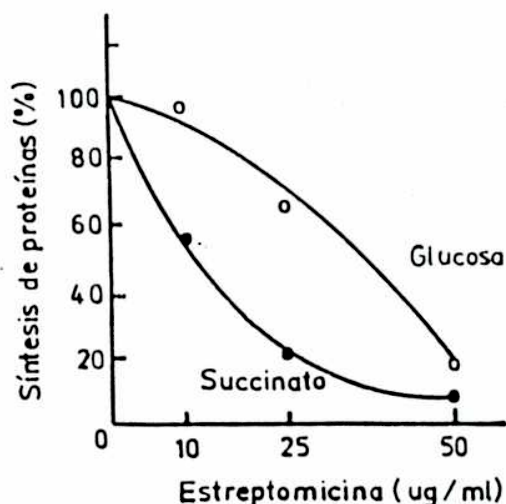
3-3. Influencia de la velocidad de desarrollo celular sobre la acción de la estreptomycin.

La menor acción de la estreptomycin sobre las células desarrolladas en ausencia de poliaminas podría ser sólo una consecuencia de la menor velocidad de crecimiento celular en estas condiciones. Con el objetivo de analizar esta hipótesis se estudió el efecto de la presencia de estreptomycin sobre la síntesis de proteínas en cultivos de *E.coli* BGA 8 suplementados con poliaminas y desarrollados en fuentes de carbono distintas de glucosa, en que la velocidad del crecimiento celular es menor.

Se midió la inhibición de la síntesis de proteínas luego de 30 minutos de tratamiento con diferentes dosis de estreptomycin en células desarrolladas en medios con glucosa o succinato. Como se observa en la Figura 20 todas las dosis de estreptomycin ensayadas redujeron la síntesis de proteínas en mayor grado cuando los cultivos fueron desarrollados con succinato como fuente de carbono, a pesar que en este medio el tiempo requerido para la duplicación es prácticamente el doble del observado en medios con glucosa.

Figura 20: Síntesis de proteínas remanentes en *E.coli* BGA 8 suplementada con poliaminas cultivadas con diversas fuentes de carbono luego de 30 min. en presencia de diferentes dosis de estreptomycin

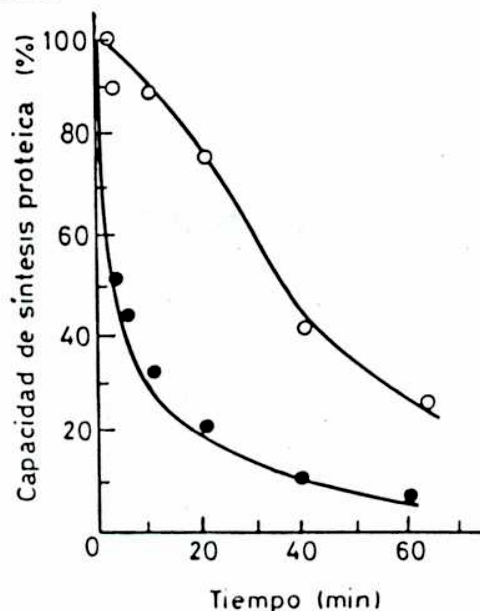
Medio de cultivo con Succinato de sodio (●) o glucosa (○) como fuente de carbono. La medida de la síntesis proteica se realizó como se describió en la figura 16.



Este hecho se confirmó al estudiar la variación de la capacidad de síntesis proteica luego de diferentes tiempos de tratamiento con $25 \mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. En la Figura 21 puede observarse que en los cultivos desarrollados con succinato, no solo hay una mayor inhibición de la síntesis de proteínas sino que esta reducción ocurre más rápido que en los cultivos desarrollados con glucosa.

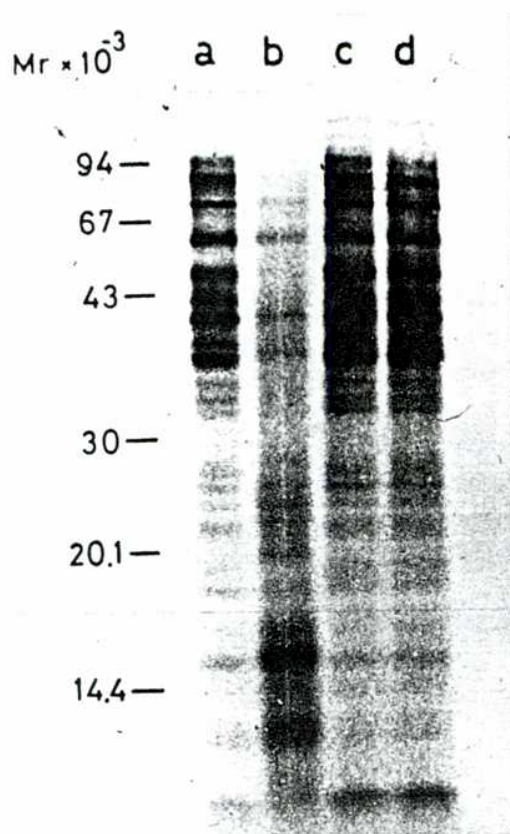
De esta manera se pudo demostrar que las diferentes respuestas de una misma cepa bacteriana al ser tratada con estreptomicina dependen de las concentraciones intracelulares de poliaminas y no de la velocidad de crecimiento del cultivo.

Figura 21: Capacidad de síntesis proteica de *E.coli* BGA 8 suplementada con poliaminas en presencia de estreptomicina. Influencias de la fuente de carbono.



Cultivos de *E.coli* BGA 8 se desarrollaron en presencia de putrescina con glucosa ○ o succinato ●. Cuando los cultivos alcanzaron una A_{490} de 0,2 se les agregó estreptomicina ($25 \mu\text{g/ml}$) y se continuó la incubación para permitir la captación de la droga. Luego de 20 min. de presencia de la droga se agregó [^{35}S] Metionina, determinándose la capacidad de síntesis proteica como se describió en materiales y métodos. Los datos se expresaron como porcentajes de los valores correspondientes a un control no tratado con el antibiótico.

Figura 22: Perfil electroforético de los péptidos producidos por *E.coli* BGA 8 en presencia de estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$)



Células de *E.coli* BGA 8 se cultivaron en presencia o ausencia de poliaminas. Cuando los cultivos alcanzaron una $A_{490} = 0,2$ se agregó estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$). Luego de 45 min en presencia del antibiótico se marcaron las muestras por 5 min. agregando [^{35}S] Metionina. Los extractos bacterianos se analizaron por electroforesis (PAGE-SDS 20%) procesándolos como se indicó en materiales y métodos.

A,B: cultivos con poliaminas; C,D: Cultivos sin poliaminas

A,C: Controles no tratados con antibiótico; B,D: Cultivos tratados con estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$)

3-4. Análisis de las proteínas sintetizadas en presencia de estreptomicina.

Los polipéptidos producidos en presencia de estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$) por las bacterias E.coli BGA 8 cultivadas con o sin poliaminas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Como puede observarse en la Figura 22 la presencia de estreptomicina no produce alteraciones en el perfil electroforético de las proteínas sintetizadas por las células desarrolladas en ausencia de putrescina. Al mismo tiempo los niveles de capacidad de síntesis de proteínas residuales luego de la acción del antibiótico son aproximadamente un 90 % respecto de los del control (Figura 18).

En contraste, la presencia del antibiótico produce cambios notorios en el perfil electroforético de los polipéptidos formados en bacterias desarrolladas con poliaminas. La presencia de la droga origina una marcada disminución en la producción de polipéptidos de alto peso molecular y la acumulación de péptidos de bajo peso molecular.

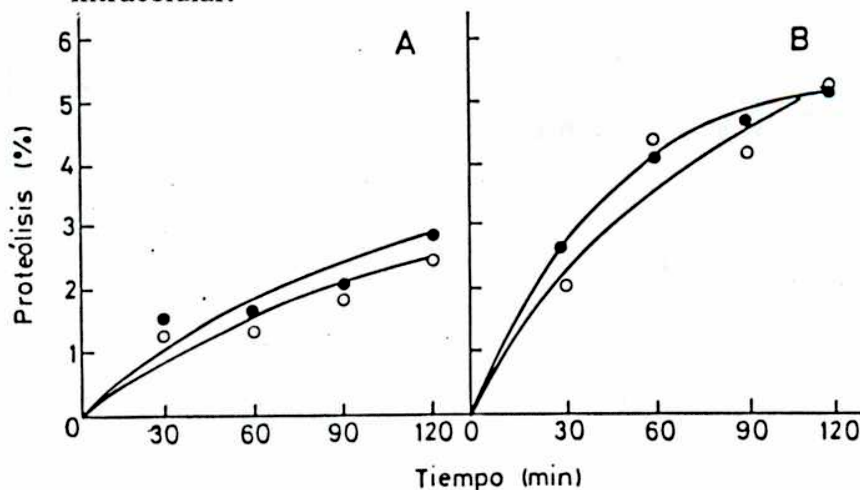
Este fenómeno puede producirse fundamentalmente por dos motivos: un aumento en los niveles de proteólisis intracelular o la interrupción del proceso de síntesis debido a un bloqueo del ribosoma o a la liberación prematura de péptidos incompletos durante la traducción.

3-5. Influencia de la estreptomycin en la variación de los niveles intracelulares de proteólisis.

Se estudió si la presencia de estreptomycin originaba una variación en los niveles intracelulares de degradación proteica.

Como se ve en la Figura 23 tanto en los cultivos desarrollados sin poliaminas como en los suplementados con estas sustancias los niveles de proteólisis basales no son alterados por la presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. Por otra parte se confirmó que en todas las condiciones ensayadas existen mayores niveles de degradación proteica en los cultivos sometidos al ayuno de poliaminas, lo que podría indicar que los péptidos de bajo peso molecular que se acumulan en las células cultivadas con poliaminas no son producidos a partir de otros de alto peso molecular por proteólisis.

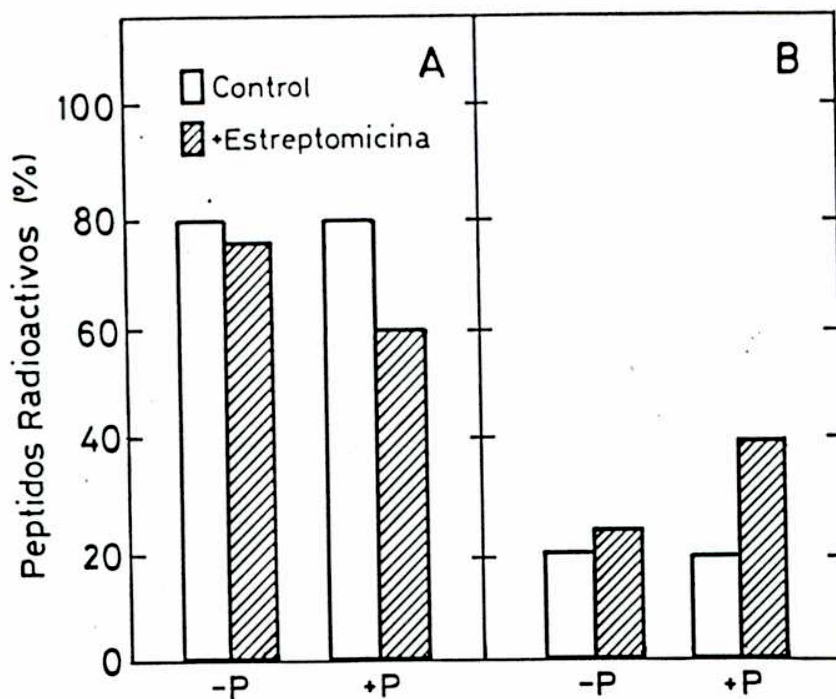
Figura 23: Influencia de la presencia de estreptomycin en los niveles de proteólisis intracelular.



Se determinó la proteólisis intracelular como se describió en materiales y métodos en cultivos de *E. coli* BGA 8 cultivados con (A) o sin (B) poliaminas, en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. El grado de proteólisis se expresó como % de la radiactividad incorporada originalmente.

Controles sin antibiótico (○); Tratados con 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (●).

Figura 24: Influencia de la presencia de estreptomicina en la distribución intracelular de péptidos nacientes.



La experiencia se realizó como se describió en materiales y métodos. Todos los valores fueron calculados como % de los péptidos radiactivos formados en cada caso y son promedios de ensayos por duplicado

- A Proporción de péptidos liberados al sobrenadante
- B Proporción de péptidos unidos a la fracción ribosomal.

+P: cultivos desarrollados con poliaminas.

-P : cultivos desarrollados sin poliaminas.

3-6. Influencia de la estreptomicina en la distribución intracelular de péptidos nacientes.

Para dilucidar si la acumulación de péptidos de bajo peso molecular producida por la estreptomicina en los cultivos realizados con poliaminas se debía a la liberación de proteínas incompletas de los ribosomas o a causa de un bloqueo de estas partículas durante el proceso de elongación, se estudió la distribución intracelular de los péptidos nacientes después del tratamiento de los cultivos con 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Para ello luego de incubar las células durante 45 minutos en presencia del antibiótico se aplicó un pulso de [^{35}S] metionina de 30 segundos de duración. Inmediatamente se diluyó la marca con un exceso de metionina fría y se continuó la incubación por 5 minutos para permitir la finalización de la síntesis de los polipéptidos que se estaban produciendo al aplicar el pulso. Luego de lisar suavemente las células con el fin de mantener la integridad de las estructuras intracelulares, se analizaron los extractos por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa y se determinó la radiactividad asociada con las fracciones ribosomales y la liberada al líquido sobrenadante.

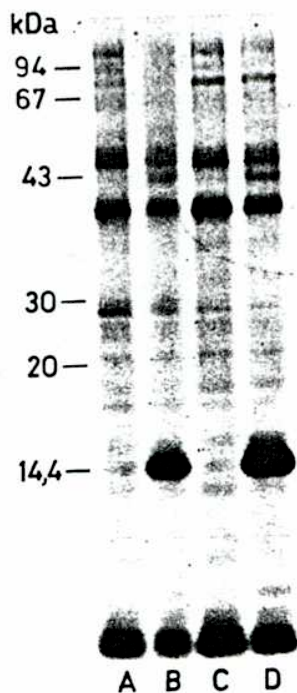
Como se observa en la Figura 24 la dosis de estreptomicina utilizada produjo sólo pequeñas modificaciones en la proporción de péptidos que permanecían asociados a la fracción ribosomal en los cultivos desarrollados en ausencia de poliaminas. En cambio en los cultivos realizados con agregado de los policationes se observó un marcado incremento de los péptidos que quedaban asociados a las fracciones ribosomales, lo que indica la existencia de un posible bloqueo de la elongación provocado por la presencia del antibiótico .

3-7. Efectos de la presencia de estreptomicina durante la síntesis proteica en bacterias infectadas con fagos.

Uno de los primeros pasos en el mecanismo de acción de la estreptomicina es la inducción de mayores niveles de errores de traducción, previo a la producción del bloqueo ribosomal. Para determinar si los niveles intracelulares de poliaminas influían en los efectos del antibiótico sobre la fidelidad de la síntesis proteica se decidió estudiar los niveles de errores de traducción cometidos por las células de E.coli LM 27 suplementadas o no con poliaminas durante la síntesis de una proteína en particular .

Como modelo de trabajo se utilizó la proteína de cubierta del bacteriofago MS 2 producida por bacterias infectadas con el virus. Este sistema ofrece las siguientes ventajas: el bacteriofago MS 2 es un virus a RNA que contiene la secuencia codificante de la subunidad β de la RNA replicasa utilizada para la replicación del RNA viral. A diferencia de la subunidad de origen bacteriano, la viral es poco sensible al antibiótico rifampicina (207); de esta forma añadiendo rifampicina se puede inhibir casi totalmente la síntesis proteica de la bacteria huésped, afectando sólo parcialmente la de las proteínas del fago. Por lo tanto en bacterias infectadas y tratadas con rifampicina el producto mayoritario es la proteína de cubierta del fago. Esta es una proteína básica de 14 KD de peso molecular, que puede separarse fácilmente de otras por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida usando gradientes de pH sin necesidad que lleguen al equilibrio (NEPHGE). Los posibles errores durante la traducción de esta proteína han sido estudiados exhaustivamente (208), en particular los que involucran la sustitución de asparagina por lisina que ocasionan la producción de proteínas de igual peso

Figura 25: Perfil electroforético de las proteínas sintetizadas por *E.coli* LM 27 infectada con el bacteriófago MS 2.



Se desarrollaron cultivos de *E.coli* LM 27 en presencia o no de poliaminas. Cuando los cultivos alcanzaron una $A_{490} = 0,4$ se infectó con el bacteriofago MS 2. Después de 5 min. de la infección las células se trataron con rifampicina ($200 \mu\text{g/ml}$) para detener selectivamente la síntesis de RNA del huésped. A los 10 min. post-infección se suplementaron, en los casos indicados, con estreptomycin ($12,5 \mu\text{g/ml}$). Los péptidos producidos entre los 30 y 60 min. posteriores a la infección se marcaron con [^{35}S] metionina y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 18 % que contenían urea 6 M y 0,1 % de SDS. Las muestras se procesaron como se indicó en materiales y métodos.

- A,B Células desarrolladas sin poliaminas.
- C,D Células desarrolladas con poliaminas.
- A,C Controles no infectados
- B,D Células infectadas con el fago MS 2

La banda de 14 kD presente en los carriles B y D corresponde a la proteína de cubierta del fago.

molecular pero diferente punto isoeléctrico. Este tipo de error provoca la aparición de proteínas satélites de mayor punto isoeléctrico que la original pues la lisina reemplaza a un aminoácido neutro. La relación entre las cantidades sintetizadas de proteínas satélites y proteína normal de la cubierta del fago está directamente relacionada con la frecuencia de errores de traducción en que alguna o varias asparaginas hayan sido sustituidas por lisinas.

En la Figura 25 se observa el análisis por electroforesis en geles monodimensionales de poliacrilamida de los extractos de bacterias *E.coli* LM 27 infectadas con el fago MS 2. En las células infectadas se nota la aparición de dos proteínas ausentes en los controles no infectados: una de 14 KD correspondiente a la proteína de cubierta del fago y otra de 42 KD correspondiente a la proteína A de maduración responsable del ensamblado del virus. El genoma del bacteriófago codifica otras dos proteínas minoritarias que son la proteína de lisis de 9 KD y la ya mencionada subunidad β de la RNA replicasa de 62 KD (209,210). Ambas se producen en cantidades muy pequeñas y por lo tanto no fueron visibles en las autorradiografías de los geles.

En el sistema descrito se estudió la inducción de la sustitución de asparagina por lisina causada por el agregado de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. Como se mostró previamente las dosis de antibiótico mayores bloquean la traducción, especialmente en las células desarrolladas en presencia de poliaminas. Cuando se utiliza 12,5 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico existe una disminución de los niveles de síntesis de proteica pero no llega a producirse la inhibición total (Figura 16).

En la Figura 26 se muestran los autorradiogramas de las electroforesis bidimensionales de los extractos de *E.coli* LM 27 infectadas con el fago MS 2 y tratadas o no con estreptomycin. Es posible notar que en ausencia del antibiótico

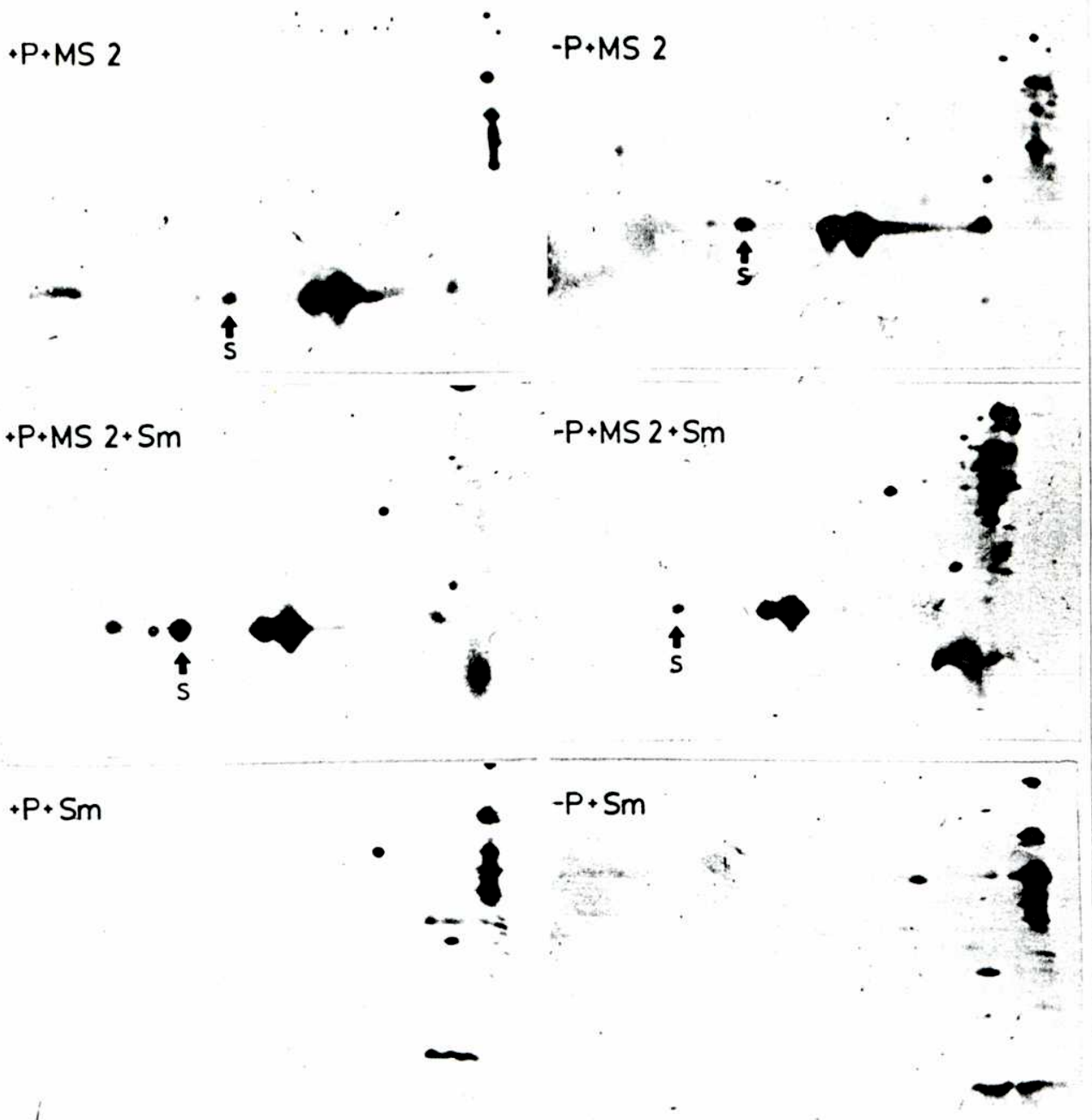


Figura 26: Influencia de la presencia de estreptomicina durante la síntesis de la proteína de cubierta del fago MS 2

Cultivos de *E. coli* LM 27 se infectaron y marcaron como se indicó en la figura 24. Las muestras fueron procesadas para electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida como se indicó en materiales y métodos y se analizaron por electroforesis bidimensional. Como primera dimensión se desarrolló una electroforesis en gradiente de pH sin equilibrio. Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida 18% en presencia de SDS y urea 6M. El extremo básico de la primera dimensión se orientó hacia la izquierda de cada gel.

Se ha marcado la ubicación de la proteína satélite correspondiente a la proteína de cubierta original que resulta de la sustitución de una arginina por una lisina.

existen mayores niveles de error (frecuencia relativa de proteínas satélites) en los cultivos desarrollados en ausencia de poliaminas. Este hecho confirma lo observado en los experimentos previos que indicaban que los niveles de errores de traducción eran mayores en los cultivos sometidos al ayuno de poliaminas.

Al analizar la proteína de cubierta del fago producida luego de 50 minutos de incubación en presencia de estreptomina se pudo observar un gran aumento de las bandas satélites en las células suplementadas con poliaminas. En cambio la presencia del antibiótico no indujo cambios apreciables en los niveles de errores en las bacterias desarrolladas sin poliaminas.

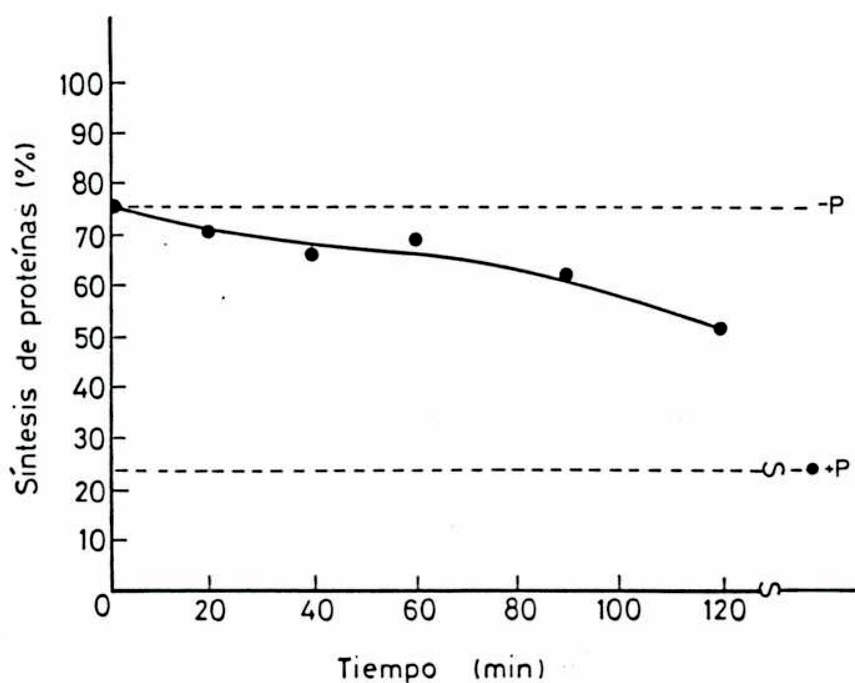
Estos experimentos indican que la estreptomina casi no aumenta los niveles de error de traducción en ausencia de poliaminas. Por otra parte es importante notar que no se pudo observar una acción sinérgica entre los mayores niveles de errores de traducción basales observados en las bacterias cultivadas en ausencia de poliaminas y la acción primaria del antibiótico.

3-8. Tiempo necesario de presencia de poliaminas para la acción de estreptomina.

La resistencia relativa a la estreptomina observada en las células desarrolladas en ausencia de poliaminas puede deberse a la necesidad de estas cationes para la correcta interacción del antibiótico con su blanco de acción o a un defecto intrínscico de los ribosomas sintetizados en ausencia de poliaminas. Para analizar estas alternativas se estudió la sensibilidad de la síntesis de proteínas a la presencia de estreptomina en cultivos sometidos al ayuno de poliaminas a los que se agregó putrescina y se incubó posteriormente por diferentes períodos. Como se ve en la Figura 27 la recuperación del fenotipo sensible al antibiótico característico de

un cultivo desarrollado en presencia de poliaminas demora más de 2 horas, momento en que las células ya se multiplican a una velocidad normal. Esto indicaría que la sensibilidad total a la droga no se alcanzaría hasta el recambio de los ribosomas producidos antes del agregado de putrescina.

Figura 27: Síntesis de proteínas en *E.coli* BGA 8 en presencia de estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$). Influencia del tiempo de incubación con putrescina.



Cultivos de *E.coli* BGA 8 desarrollados sin poliaminas fueron suplementados con 0,05 mg/ml de putrescina. Luego de diversos tiempos en presencia de los policlones se determinó los niveles de síntesis de proteínas durante 1 hs de incubación con 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Los valores se encuentran expresados en porcentajes de los correspondientes a cultivos sin antibiótico.

3-9. Reversibilidad de la acción de la estreptomicina.

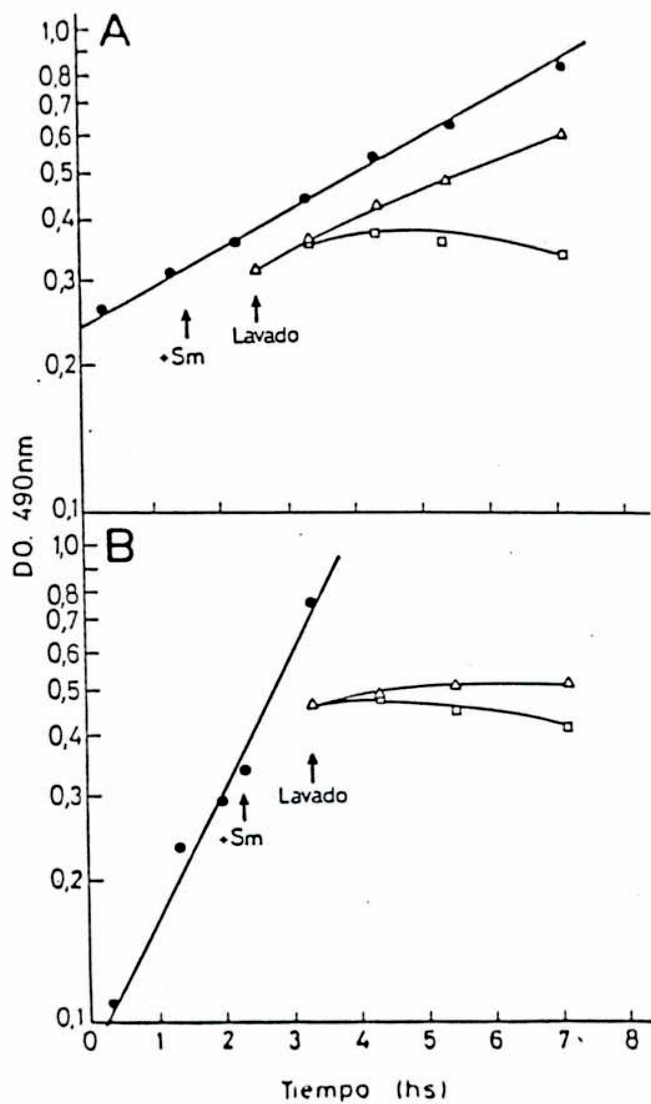
Para dilucidar el grado de interacción de la estreptomicina con los ribosomas de las células desarrolladas en presencia o ausencia de poliaminas se estudió la reversibilidad de los efectos del antibiótico al eliminarlo luego de haber tratado los cultivos con el mismo por un tiempo limitado.

Una vez que la estreptomicina interacciona con el ribosoma el daño que ocasiona sobre el mismo es irreversible (157). Para analizar la influencia de las poliaminas en esta etapa de acción de la droga se cultivaron células de E.coli BGA 8 en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina; luego de 1 hora de tratamiento se eliminó el antibiótico del medio y se analizó la variación en la velocidad de crecimiento y en la capacidad de síntesis de proteínas. Como se observa en la Figura 28 los cultivos sometidos al ayuno de poliaminas recuperan inmediatamente la velocidad de crecimiento luego de retirar la droga. En los cultivos desarrollados con poliaminas, en cambio, no es posible observar ninguna recuperación del crecimiento, aunque tampoco se produce la lisis celular como sucede en presencia del antibiótico.

La Figura 29 muestra que la capacidad de síntesis de proteínas es más sensible que el crecimiento celular a la acción del antibiótico, ya que en los cultivos sin poliaminas comienza a recuperarse en forma muy lenta recién a los 20 minutos de retirar la estreptomicina del medio. En las células desarrolladas con poliaminas la capacidad para sintetizar proteínas queda igualmente inhibida aún después de haber eliminado el antibiótico.

La estreptomicina tiene "in vitro" una mayor afinidad por los ribosomas producidos por células desarrolladas en presencia de poliaminas (211); si suponemos que "in vivo" el antibiótico también se une a los ribosomas con diferente afinidad

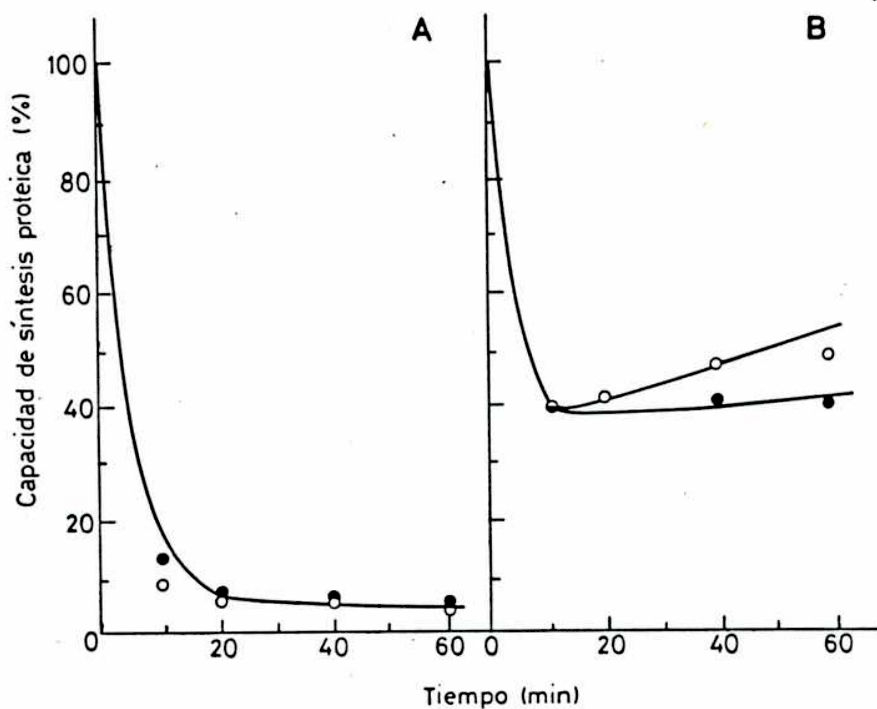
Figura 28: Reversibilidad de los efectos de estreptomicina sobre el desarrollo de *E.coli* BGA 8.



Los cultivos de *E.coli* BGA 8 desarrollados sin (A) o con (B) poliaminas fueron tratados con estreptomicina ($25 \mu\text{g/ml}$) en los momentos indicados (+Sm). Luego de incubar por 1 hora, en presencia de la droga los cultivos se filtraron por Millipore ($0,45 \mu\text{m}$ de diámetro) y se resuspendieron en el medio original libre de antibiótico (Δ) o adicionado con estreptomicina (\square). Se continuó la incubación y determinó el desarrollo de las células tratadas o no con el antibiótico.

dependiendo del contenido intracelular de poliaminas, este hecho podría explicar por qué el tiempo de incubación con el antibiótico es suficiente para dañar irreversiblemente sólo a los ribosomas que poseen mayor afinidad por la estreptomicina.

Figura 29: Recuperación de la síntesis de proteínas luego de un tratamiento de una hora con estreptomicina de los cultivos de *E.coli* BGA 8

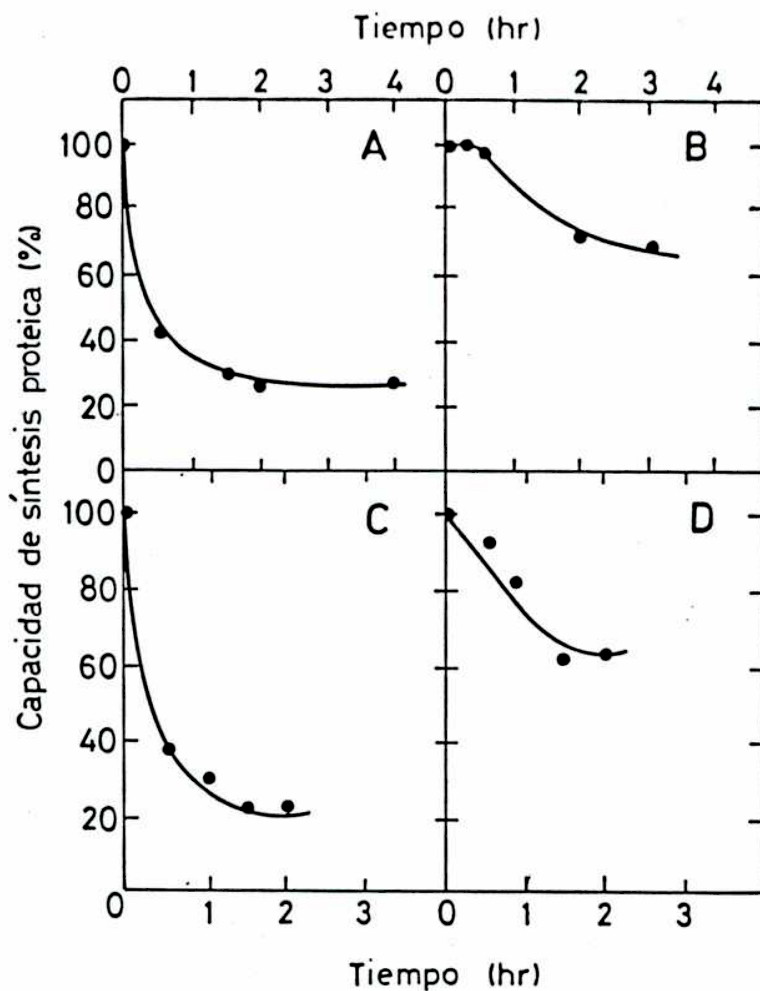


cultivos de *E.coli* BGA 8 desarrollados con (A) o sin (B) poliaminas se trataron con estreptomicina (25 $\mu\text{g/ml}$) por 1 hora. Luego de eliminar el antibiótico como se describió en la figura 28 se determinó la capacidad de síntesis proteica a distintos tiempos. Los valores son porcentajes de los correspondientes a cultivos no tratados con el antibiótico.

- cultivo tratado con estreptomicina por 1 hs y luego incubado sin el antibiótico
- cultivo tratado con estreptomicina por el período total del experimento..

Los datos se normalizaron por número de células.

Figura 30: Inhibición de la capacidad de síntesis proteica por la presencia de kanamicina en cultivos de *E.coli* LM 27 y LM 53 .



Se determinó la capacidad de síntesis proteica en los tiempos indicados luego del agregado de kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$), procediéndose como se describió en materiales y métodos. Los valores se expresaron como porcentajes de un control no tratado con el antibiótico y se normalizaron por número de células.

E.coli LM 27 A y B
E.coli LM 53 C y D

A y C cultivos desarrollados con poliaminas
 B y D cultivos desarrollados sin poliaminas

3-10. Sensibilidad a otros antibióticos aminoglucósidos.

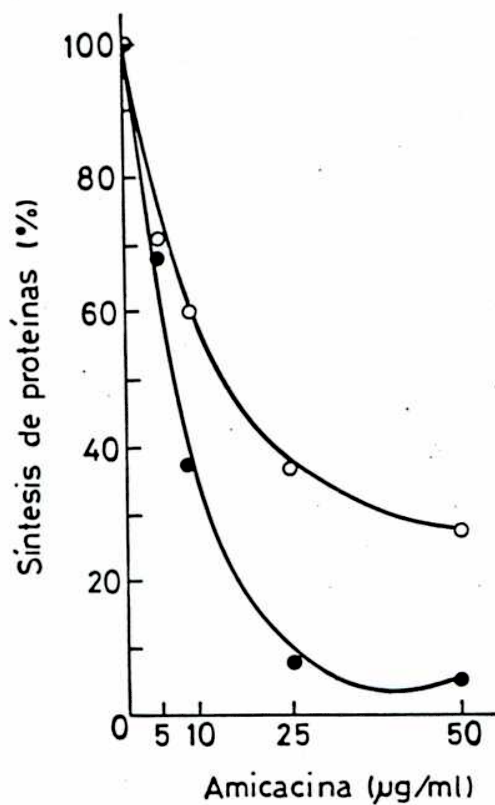
Como se mostró anteriormente, los efectos diferenciales de la estreptomina sobre las células cultivadas con o sin poliaminas son generales para diferentes cepas de E.coli incapaces de producir poliaminas. Para dilucidar si esta característica es particular de la estreptomina o es común a otros antibióticos aminoglucósidos se estudió los efectos sobre la síntesis proteica de amicacina y kanamicina.

En la Figura 30 se observa que dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina producen mayores niveles de inhibición de la capacidad de síntesis proteica en los cultivos suplementados con poliaminas, tanto en las cepas de E.coli LM 27 como LM 53.

En la Figura 31 se muestran los efectos de amicacina sobre la síntesis de proteínas de la cepa LM 27 . Este antibiótico también posee mayor capacidad de inhibición sobre los cultivos desarrollados en presencia de poliaminas. Trabajando con la cepa BGA 8 se obtuvieron resultados similares.

Los resultados descriptos demuestran que la acción de diferentes antibióticos aminoglucósidos requiere la presencia de poliaminas durante la biosíntesis de los ribosomas y esta característica es general para otros antibióticos distintos a la estreptomina.

Figura 31: Síntesis de proteínas de *E.coli* LM 27 en presencia de diferentes dosis de amicacina.



Se trataron cultivos de *E.coli* LM 27 desarrollados en presencia ● o ausencia ○ de poliaminas con diferentes dosis de amicacina. Luego de preincubar 15 min. en presencia de la droga para permitir la captación de la misma se determinó la síntesis de proteínas durante los 30 minutos subsiguientes. Los datos presentados están referidos a los de un control cultivado en ausencia del antibiótico.

4. Influencia de los niveles endógenos de poliaminas en la resistencia a kanamicina codificada en plásmidos.

Los resultados analizados previamente muestran que en las células con contenidos intracelulares de poliaminas anormalmente bajos es posible observar la aparición de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos debida a la interacción defectuosa de estas drogas con los ribosomas. Se decidió investigar si las concentraciones intracelulares de poliaminas también influyen en la expresión de otras formas de resistencia, como la mediada por plásmidos. Con este objetivo se analizó la resistencia conferida a las bacterias por la aparición de la enzima kanamicina fosfotransferasa después de transformar las cepas bacterianas con un plásmido que contiene el gen de la fosfotransferasa. Esta enzima es capaz de fosforilar al antibiótico inactivándolo. Se utilizó un plásmido de bajo número de copias como el pVK 102 pues permite analizar con mayor sensibilidad los cambios producidos en los niveles de las funciones codificadas por el plásmido.

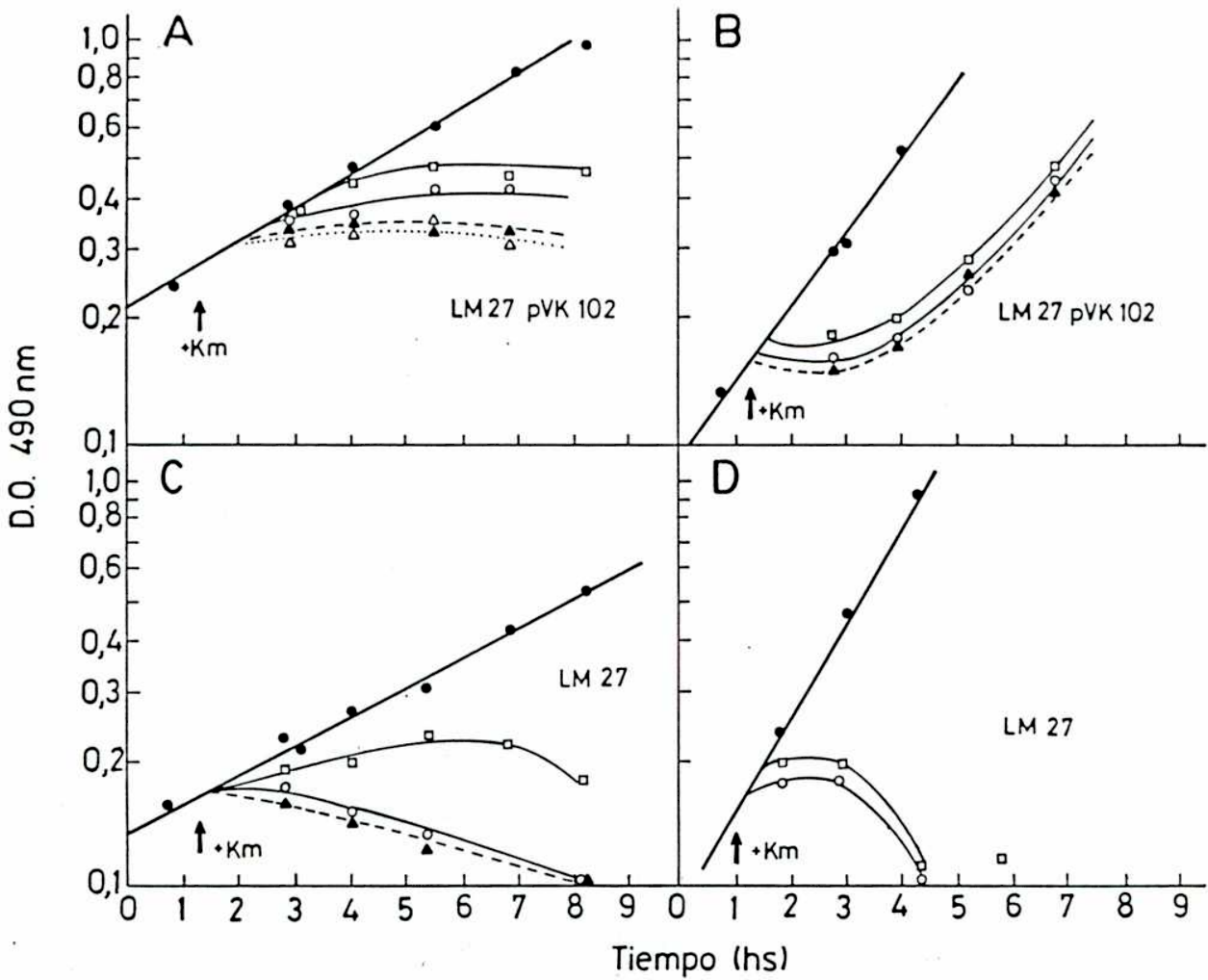
Las cepas de E.coli LM 27 y LM 53 se transformaron por el método decripto por Dagert y Ehrlich (194) y las células transformadas se seleccionaron por la expresión de resistencia a kanamicina y tetraciclina conferidas por el plásmido .

4-1. Velocidad de crecimiento de las cepas transformadas.

Expresión de resistencia a kanamicina.

Se analizó los efectos de diferentes dosis de kanamicina sobre el crecimiento de las cepas originales y de las transformadas con el plásmido pVK 102.

Figura 32: Curvas de crecimiento de *E.coli* LM 27 pVK 102 y LM 27 en presencia de diferentes dosis de kanamicina.



A y C cultivos sin poliaminas
B y D cultivos con poliaminas

concentraciones de kanamicina: 0 $\mu\text{g/ml}$ (●); 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (□); 25 $\mu\text{g/ml}$ (○); 50 $\mu\text{g/ml}$ (▲) y 100 $\mu\text{g/ml}$ (Δ)

En la Figura 32 C y D puede observarse que la presencia de kanamicina altera la velocidad de crecimiento de las células no transformadas en la misma forma que lo hace la estreptomycinina, ya que las bacteria cultivadas en ausencia de poliaminas sufren una inhibición del crecimiento menor que las desarrolladas en presencia de los policationes.

Por otra parte en las células transformadas el comportamiento es diferente (Figura 32 A y B). Los cultivos que contienen poliaminas muestran que la presencia del antibiótico produce la rápida inhibición inicial del crecimiento y luego de un período de alrededor de 1 hora se induce una marcada recuperación del desarrollo y la proliferación bacteriana sucede a la misma velocidad que en ausencia del antibiótico. En las células desarrolladas sin poliaminas, en cambio, al agregar el antibiótico el cultivo entra en una especie de estado estacionario de duración variable; para dosis de kanamicina de 50 $\mu\text{g/ml}$ la reiniciación del crecimiento se observa entre 8 y 10 horas después. La cepa LM 53 pVK 102 muestra este mismo comportamiento, pero la recuperación del crecimiento es más rápida, tanto para los cultivos desarrollados en ausencia como en presencia de poliaminas.

4-2. Capacidad de síntesis proteica de *E.coli* LM 27 pVK 102 y LM 53 pVK 102 en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

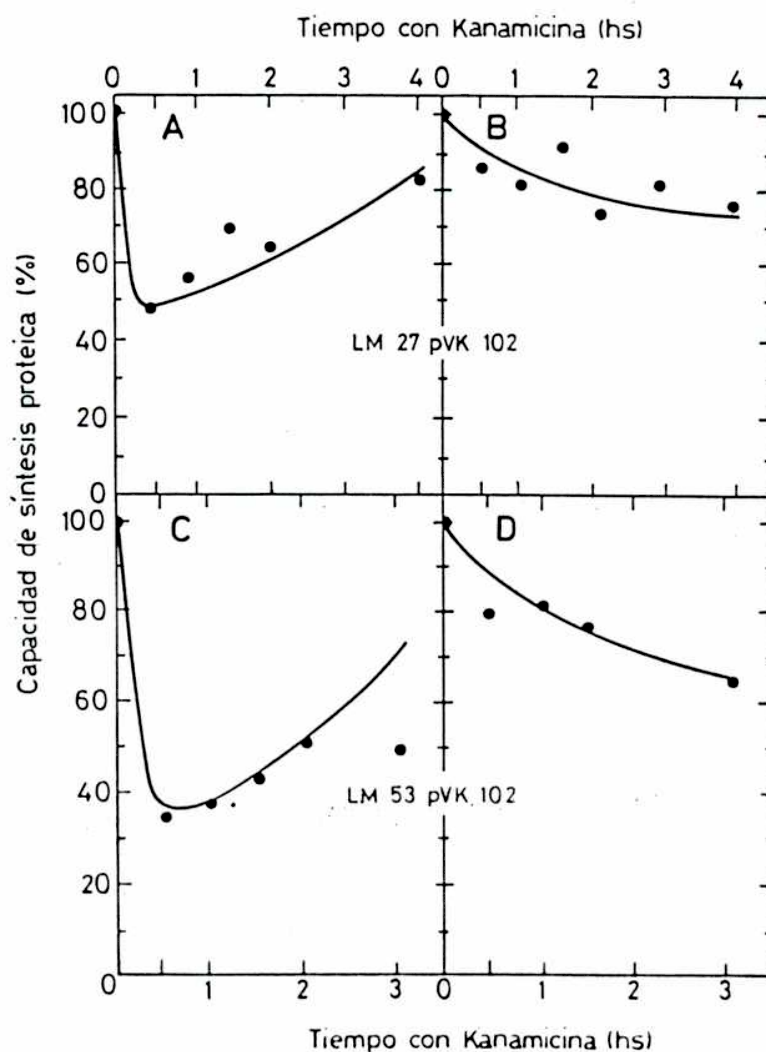
Se determinó la variación de la capacidad de síntesis de proteínas en las cepas de *E.coli* transformadas con el plásmido pVK 102 cultivadas con y sin poliaminas luego de distintos períodos de incubación con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

Figura 33: Influencia de la presencia de kanamicina en la capacidad de síntesis proteica de E.coli LM 27 pVK 102 y LM 53 pVK 102

A, B E.coli LM 27 pVK 102; C, D E.coli LM 53 pVK 102
A, C cultivos con poliaminas; B y D cultivos sin poliaminas.

Se determinó la capacidad de síntesis proteica en cepas de E.coli auxótrofas para poliaminas que contienen el plásmido pVK 102 luego de distintos períodos en presencia de kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$)
Los datos presentados son relativos a un control no tratado con el antibiótico y se encuentran normalizados por igual número de células.

Como se observa en la Figura 33 en las células suplementadas con poliaminas se produce una rápida inhibición de la capacidad de síntesis seguida por la recuperación de la misma luego de una hora de presencia del antibiótico. En las bacterias cultivadas en ausencia de poliaminas se produce una inhibición que aumenta paulativamente y no es posible observar recuperación, por lo menos durante los tiempos estudiados. Al comparar estos datos con las variaciones en la capacidad de síntesis proteica de las células no transformadas en presencia del antibiótico, Figura 30, se nota que la introducción del plásmido disminuye el efecto inhibitorio de la kanamicina sobre la capacidad de síntesis proteica tanto en células ayunadas como en las suplementadas con poliaminas.

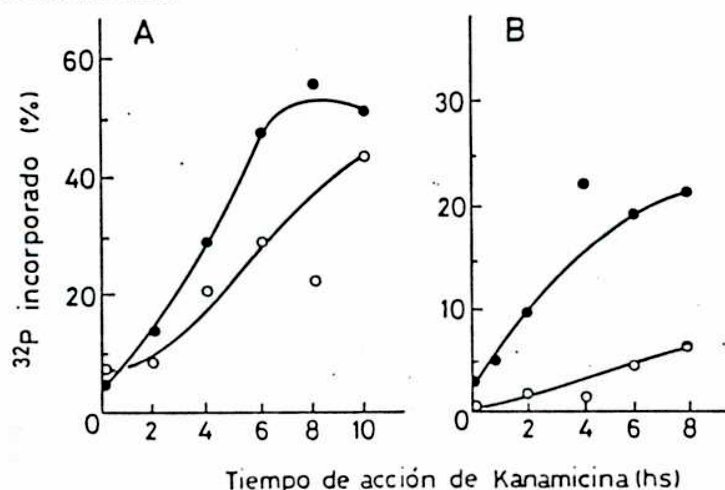


4-3. Niveles de actividad de kanamicina fosfotransferasa.

Se midió los niveles de actividad de la enzima kanamicina fosfotransferasa después de incubar las células transformadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina durante distintos períodos.

Como se puede ver en la Figura 34 la presencia del antibiótico produce un claro aumento de la actividad específica de la enzima en las células desarrolladas tanto en presencia como en ausencia de poliaminas. La inducción es más rápida en los cultivos suplementados con poliaminas, lo que concuerda con las respuestas observadas al analizar la variación en las velocidades de crecimiento y la capacidad de síntesis de proteínas.

Figura 34: Influencia de la presencia de kanamicina en los niveles de actividad de kanamicina fosfotransferasa.



Cultivos de *E. coli* LM 27 pVK 102 y LM 53 pVK 102 se trataron por distintos períodos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Se obtuvieron extractos enzimáticos de estos cultivos como se indicó en materiales y métodos, determinándose la capacidad de transferencia de ^{32}P de ATP al antibiótico. La actividad se expresó como % de la radiactividad total contenida en el ^{32}P ATP que se transfirió en cada caso al antibiótico/ μg de proteína.

A: *E. coli* LM 27 pVK 102; B: *E. coli* LM 53 pVK 102.

●: cultivos desarrollados con poliaminas; ○: cultivos desarrollados sin poliaminas

4.4. Análisis de las proteínas producidas por la cepa *E. coli* LM 27 pVK 102 en presencia de kanamicina.

Para investigar si la presencia de kanamicina producía la inducción específica de alguna proteína en particular se agregó [³⁵S] metionina a cultivos de *E. coli* LM 27 pVK 102 que se habían mantenido 4,5 horas en presencia de 50 µg/ml de kanamicina. Las proteínas marcadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida.

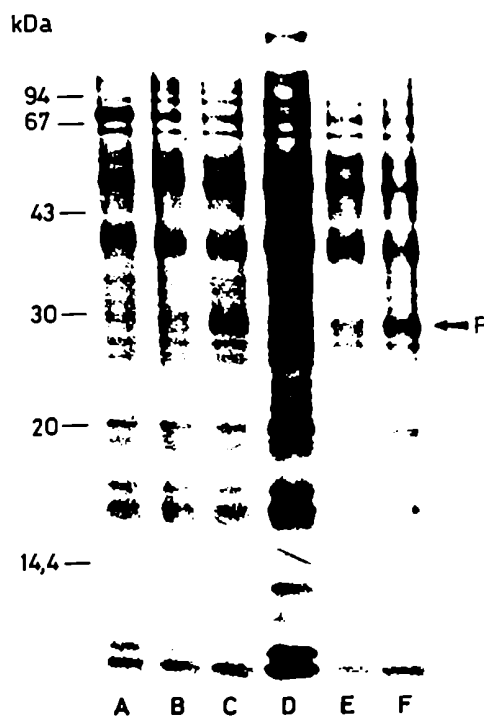
Figura 35: Perfil electroforético de los péptidos producidos por *E. coli* LM 27 pVK 102.

Cultivos de LM 27 pVK 102 desarrollados con o sin poliaminas fueron tratados con kanamicina (50 µg/ml) por 4,5 hs. Luego de ese tiempo se marcaron los péptidos producidos por 15 minutos con [³⁵S] Metionina como se indicó en materiales y métodos. Los extractos celulares se analizaron por PAGE-SDS (20 % de poliacrilamida)

A,B,C: Cultivos con poliaminas
D,E,F: Cultivos sin poliaminas

A,D: *E. coli* LM 27
B,E: *E. coli* LM 27 pVK 102 sin tratar con kanamicina
C,F: *E. coli* LM 27 pVK 102 tratada con kanamicina por 4,5 horas

Se señala la banda de 27 kD correspondiente a la kanamicina fosfotransferasa.



En la autorradiografía correspondiente (Figura 35) se puede observar la aparición de una proteína de 27 KD de peso molecular luego de 4,5 horas de presencia del antibiótico. Esta banda, cuyo tamaño concuerda con el descrito en la literatura para la enzima kanamicina fosfotransferasa (212), no se encuentra presente en las células transformadas sin incubar con el antibiótico, ni en las células no transformadas.

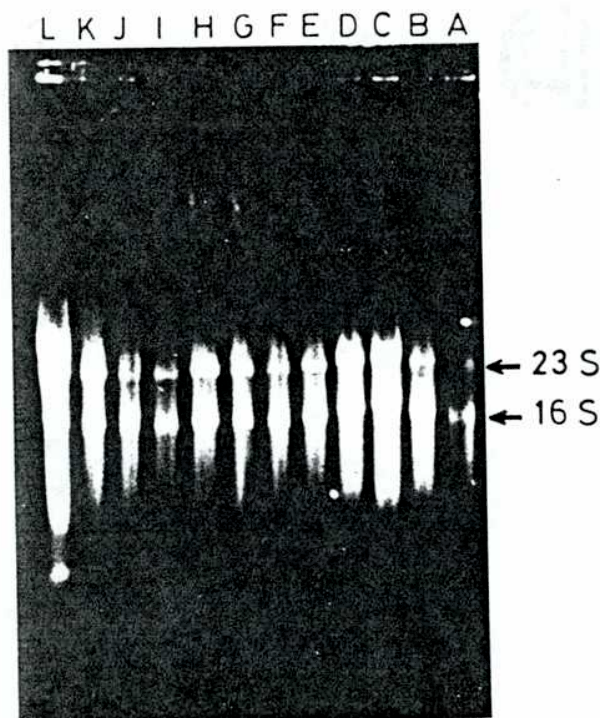
4-5. Niveles de RNA mensajero de la enzima kanamicina fosfotransferasa.

Los diferentes niveles de resistencia a la kanamicina que muestran las células transformadas con el plásmido pVK 102 cuando se cultivan en presencia o ausencia de poliaminas podrían justificarse si la transcripción del gen de la enzima kanamicina fosfotransferasa dependiera de las concentraciones intracelulares de poliaminas. Para analizar esta posibilidad se dosaron los niveles de RNA mensajero específico de fosfotransferasa presentes en las células desarrolladas con o sin poliaminas luego de diferentes períodos de tratamiento de los cultivos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Con este fin se aisló el RNA total de las bacterias utilizando el procedimiento descrito en materiales y métodos.

La utilización de una precipitación diferencial con NH_4AcO 2,5 M (198) permite aislar el RNA celular libre de contaminación de DNA del plásmido (Figura 36). El dosaje del RNA mensajero de la enzima kanamicina fosfotransferasa por hibridización con una sonda específica se realizó mediante el empleo de la técnica de Dot-Blot. La preparación de la fracción de RNA libre de DNA eliminó la necesidad

de separar estas macromoléculas por electroforesis y de transferirlas a una membrana de nitrocelulosa antes de llevar a cabo la hibridización.

Figura 36: Determinación de la integridad del RNA celular extraído de E.coli LM 53 pVK 102.

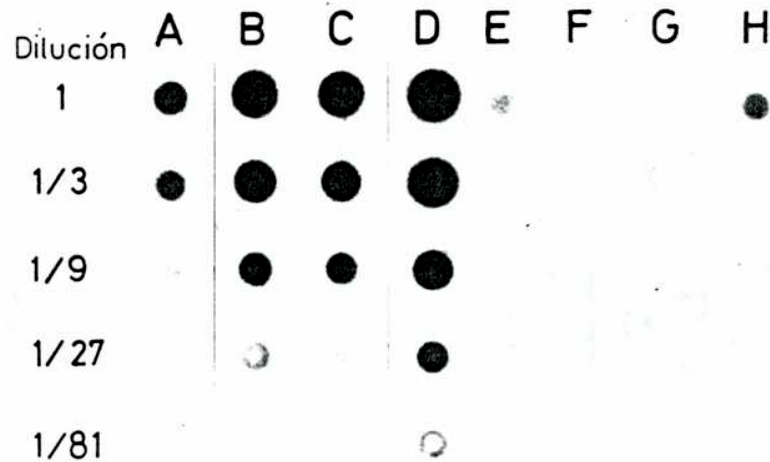


Se extrajo RNA total de E.coli como se indicó en materiales y métodos separándolo del DNA plasmídico por precipitación diferencial con NH_4AcO . Alícuotas de cada muestra fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Se tomó como criterio de integridad de las muestras la presencia de bandas correspondientes a los RNA 16 S y 23 S.

En todos los casos se comprobó la ausencia de DNA de plásmido en las fracciones aisladas de RNA.

En la Figura 37 se puede observar la autorradiografía obtenida luego de exponer el filtro donde se realizó el Dot-Blot para el dosaje de RNA mensajero de kanamicina fosfotransferasa en *E.coli* LM 27 pVK 102. En la figura se nota claramente la inducción, por la presencia del antibiótico, de los RNA mensajeros específicos así como la ausencia de señal en las células parentales no transformadas.

Figura 37: Determinación de los niveles de RNA de kanamicina fosfotransferasa por Dot-Blot.



Muestras que contenían 10 μg de RNA total de *E.coli* previamente desnaturalizadas se diluyeron sucesivamente 1/3 con 15X SSC. Estas muestras se aplicaron sobre un filtro de nitrocelulosa como se describió en materiales y métodos. Luego de fijar el RNA al filtro por calentamiento a 80°C por 2 hs, se hibridizó con una sonda específica para el gen de la kanamicina fosfotransferasa marcada con $[^{32}\text{P}]$. Posteriormente se expuso una autorradiografía para determinar los niveles de complementariedad con la sonda empleada.

A,B: LM 27 pVK 102 suplementada con poliaminas

C,D: LM 27 pVK 102 ayunada de poliaminas

A,C: células no tratadas con kanamicina

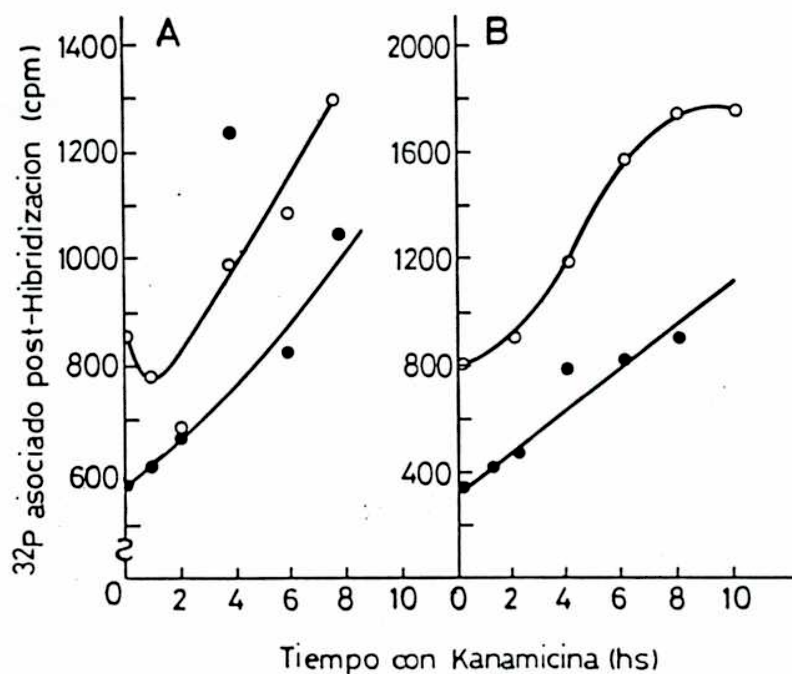
B,D: células incubadas 8 hs con kanamicina

E: LM 27 cultivadas con poliaminas, F: LM 27 cultivadas sin poliaminas

G,H: muestras A y B tratadas con RNasa por 5 min. a 0°C.

Como se ve en la Figura 38 los niveles de RNA mensajero de la enzima kanamicina fosfotransferasa son siempre mayores en las células desarrolladas en ausencia de poliaminas. Si bien es posible notar una inducción de la transcripción de este gen, la cinética de dicha inducción es similar en bacterias cultivadas tanto en presencia como en ausencia de poliaminas. Esto indica que los diferentes grados de resistencia a kanamicina observados parecen no originarse a nivel de la transcripción del gen, sino que posiblemente resultan de diferencias en la eficiencia de la traducción de los mensajeros presentes.

Figura 38: Variación de los niveles de mRNA de kanamicina fosfotransferasa.



Las zonas capaces de hibridizar con la sonda marcada de recortaron de los filtros y se determinó la radiactividad asociada por centelleo líquido.

A: LM 27 pVK 102; B: LM 53 pVK 102

cultivos desarrollados con poliaminas (●) o sin poliaminas (○)

IV-DISCUSSION:

Las poliaminas desempeñan roles fundamentales tanto en células procariontes como eucariontes debido a su participación en procesos tales como la síntesis de DNA, RNA y proteínas. El aislamiento de mutantes bacterianas incapaces de sintetizar poliaminas ha brindado la posibilidad de contar con un arma fundamental en los estudios realizados para dilucidar la participación de estas sustancias en diversos procesos celulares.

La síntesis de proteínas es una de las funciones afectadas por la falta de poliaminas. Las mutantes bacterianas incapaces de producir poliaminas y desarrolladas en ausencia de estas poliaminas contienen partículas ribosomales 30 S ensambladas en forma defectuosa, cuyo RNA 16 S está submetilado y su contenido de proteína ribosomal S1 disminuido (213,214). Estos ribosomas producidos en ausencia de poliaminas presentan alteraciones en sus propiedades y sus funciones "in vitro" (133,136). "In vivo" pueden inducir mayores niveles de error durante la traducción y son menos afectados por ciertos antibióticos que los ribosomas normales sintetizados en bacterias cultivadas en presencia de poliaminas (134,141).

Para caracterizar en forma más detallada la influencia de las poliaminas sobre el sistema de traducción bacteriano, se realizaron estudios "in vivo" sobre la fidelidad de la síntesis proteica y sobre la acción de los antibióticos aminoglucósidos en función del contenido intracelular de poliaminas.

1-Influencia de las poliaminas en la fidelidad de la traducción

Trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indicaron que los efectos producidos por las poliaminas sobre la fidelidad de la traducción "in vivo" dependen de cada codon en particular, siendo importante la presencia de estas sustancias para producir un aumento de la precisión de la traducción, sólo en aquellos casos donde los errores de lectura basales son inusualmente altos. La presencia de poliaminas parece no alterar la frecuencia de errores cometidos en aquellos codones que normalmente se traducen con un alto nivel de exactitud.

Una estrategia normalmente empleada para inducir un aumento de la frecuencia de errores de traducción es someter a las células al ayuno de diferentes aminoácidos esenciales. En estas condiciones la síntesis de proteínas puede proseguir por alguna de las siguientes causas:

1) La proteólisis de los péptidos endógenos que mantiene niveles suficientes del o los aminoácidos faltantes como para permitir la síntesis de nuevas proteínas.

2) El incremento en los niveles de los errores, que favorece la incorporación de otros aminoácidos en reemplazo del que se encuentra ausente.

La falta de un aminoácido esencial produce en cepas bacterianas salvajes una respuesta denominada estricta que abarca un conjunto de modificaciones pleiotrópicas. En estas condiciones aparecen algunas especies de RNA de transferencia descargados en el sitio A de los ribosomas lo que induce la síntesis activa de los nucleótidos de guanina ppGpp y pppGpp. Estas sustancias, en altas concentraciones, son capaces de provocar la inhibición de la síntesis de RNA estable y el aumento de la fidelidad de la traducción por elevar la eficiencia de los procesos

de prueba de lectura que normalmente ocurren durante la síntesis de proteínas (215). Los niveles de poliaminas, a su vez, alteran la respuesta a la falta de un aminoácido esencial. En cepas bacterianas genéticamente estrictas con concentraciones intracelulares normales de poliaminas la falta de un aminoácido produce un rápido bloqueo de la síntesis de RNA estable. Estas mismas células se comportan como relajadas cuando los niveles endógenos de poliaminas son anormalmente bajos (95,216). Sin embargo en ambas circunstancias se observa la producción de ppGpp (95,216), aunque a distintas velocidades. Estos resultados indican que el ayuno de poliaminas altera la transcripción de los genes de RNA ribosomales y de los RNA de transferencia por mecanismos aún no conocidos (15). Teniendo en cuenta que la velocidad de elongación durante la síntesis de proteínas es independiente de los niveles intracelulares de ppGpp (217), la mayor inhibición de la traducción provocada por el ayuno de un aminoácido esencial en bacterias cultivadas en presencia de poliaminas indicaría que el proceso de traducción sucede en estas células con mayor exactitud. En este caso la ausencia de cualquiera de los aminoácidos esenciales empleados en este estudio origina una rápida inhibición de la síntesis de proteínas (Figura 6 y 8) que se recupera luego de suplementar los cultivos con el aminoácido ausente (Figura 7). Este comportamiento es característico de las cepas bacterianas estrictas.

En cambio la respuesta de las células desarrolladas en ausencia de poliaminas al ayuno de un aminoácido depende del aminoácido que se encuentre ausente (figura 6 y 8). Este comportamiento diferencial de la síntesis de proteínas durante el ayuno de un aminoácido esencial varía desde la total insensibilidad a la falta de isoleucina hasta una marcada inhibición durante el ayuno de histidina. La variabilidad de los efectos observados podría indicar que la frecuencia de errores de

traducción en las células con bajos contenidos endógenos de poliaminas depende de los codones empleados para codificar cada aminoácido. El comportamiento de las células desarrolladas sin poliaminas, donde la frecuencia de errores de traducción depende del aminoácido involucrado, es el característico de las cepas relajadas. Esta particularidad probablemente no se puede atribuir a los menores niveles de ppGpp presentes en estas células, ya que aunque el grado de inhibición de la síntesis de RNA normal en bacterias estrictas se recupera luego de 20 minutos de suplementar los cultivos con putrescina, la síntesis de proteínas no adquiere el comportamiento observado en las células desarrolladas en presencia de poliaminas aún después de dos horas de haber agregado los policationes (Figura 14). Este hecho es un fuerte indicio de que el principal responsable de las diferentes características de la síntesis de proteínas en ambas condiciones es un componente estructural del aparato de traducción, probablemente los ribosomas.

K.Igarashi sostiene que la menor cantidad de proteína S1 que contienen los ribosomas desarrollados en ausencia de poliaminas es el factor responsable de la menor eficiencia de traducción de estas partículas "in vitro". Al suplementar con poliaminas las células sometidas a un ayuno de estas sustancias la síntesis de la proteína S1 aumenta antes de observarse cualquier alteración en la velocidad del desarrollo celular. La proteína S1 es capaz de asociarse a los ribosomas defectuosos y activarlos (218). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, la proteína ribosomal S1 parecería no ser el componente responsable de los distintos comportamientos observados en presencia o ausencia de poliaminas ante la falta de un aminoácido esencial, ya que después de dos horas de haber suplementado con putrescina un cultivo desarrollado en ausencia de poliaminas, la síntesis de proteínas todavía no es capaz de recuperar las propiedades características del sistema

desarrollado en presencia de los policationes. Si bien en nuestro caso en particular no se determinó la inducción por poliaminas de la síntesis de la proteína S1, es posible que el comportamiento sea similar al observado por Igarashi en las células de E.coli KK 101 (219), ya que hemos podido observar la rápida activación de la síntesis de proteínas luego del agregado de poliaminas a los cultivos de las cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

En las células desarrolladas en ausencia de poliaminas existe un nivel mayor de proteólisis tanto al ser cultivadas en un medio mínimo completo como durante el ayuno de un aminoácido (Figura 11). Por otra parte el aumento de la proteólisis ocasionado por la falta de un aminoácido esencial no depende del contenido endógeno de poliaminas. Este resultado y el hecho de que los cultivos desarrollados en presencia de los policationes muestran una marcada inhibición de la traducción cualquiera sea el aminoácido faltante, es un fuerte indicio de que "in vivo" existe mayor fidelidad de la síntesis de proteínas en las bacterias cultivadas con poliaminas.

Al analizar por electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida las proteínas producidas durante la ausencia de diferentes aminoácidos, se observó la acumulación de péptidos de bajo peso molecular y una disminución en la producción de otros de gran tamaño solo en las células desarrolladas en presencia de poliaminas (Figura 12). Esto podría indicar la terminación prematura de la traducción con la consiguiente liberación de los péptidos nacientes mediante el proceso de edición descrito por Menninger et al (175), o solamente la detención temporaria de los ribosomas durante la elongación debido a la ausencia del sustrato necesario para continuar el proceso.

En las células desarrolladas en ausencia de poliaminas no se observan alteraciones en los perfiles electroforéticos, lo que indica que la producción de los péptidos puede completarse aún durante el ayuno de ciertos aminoácidos.

Las propiedades discutidas anteriormente son originadas por los distintos niveles endógenos de poliaminas y no como consecuencia de la menor velocidad de crecimiento que presentan los cultivos desarrollados en ausencia de los poliaminas, ya que si las células se cultivan en presencia de poliaminas pero en un medio en que la velocidad de crecimiento es menor, conservan el comportamiento característico de las células con niveles normales de poliaminas (Figura 10).

2-Influencia de poliaminas en la acción de antibióticos aminoglucósidos.

Los antibióticos aminoglucósidos son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, cuyo sitio de acción es el ribosoma bacteriano. Estas sustancias son capaces de asociarse a los ribosomas aumentando los errores en la traducción. Algunas proteínas defectuosas producidas pueden incorporarse en la membrana celular dando origen a la formación de poros o canales que facilitan la penetración de los antibióticos. Cuando estos alcanzan niveles intracelulares elevados provocan el bloqueo de los ribosomas, la inhibición de la síntesis proteica y finalmente la lisis celular (220).

Trabajando con la cepa de E.coli BGA 8, Goldemberg y Algranati demostraron que estas células, normalmente sensibles a la estreptomicina, presentaban cierto grado de resistencia a la droga al ser desarrolladas en ausencia de poliaminas (134-221). Esta resistencia se debe a la menor afinidad del antibiótico por los ribosomas presentes en células sin poliaminas y no a alteraciones en el proceso de captación de la droga en ausencia de los policationes (11-212).

En el presente trabajo se confirmó que la estreptomicina y otros antibióticos relacionados son menos eficientes para alterar las funciones ribosomales en bacterias cultivadas sin poliaminas.

Estas características parecen ser generales pues se encontró el mismo comportamiento en E.coli BGA 8, en la cepa derivada E.coli LM 27 y en otra no relacionada, E.coli LM 53.

El antibiótico induce con mucha mayor eficiencia la inhibición de la síntesis de proteínas en aquellos cultivos desarrollados en presencia de poliaminas (Figura 17,18 y 19). El análisis cualitativo de los péptidos producidos en presencia de

25 $\mu\text{g/ml}$ de la droga y el estudio de la distribución de los cadenas nacientes, prueban que en presencia de poliaminas la estreptomicina produce, incluso, un bloqueo de la síntesis proteica (Figura 22,24)

Utilizando bacterias infectadas con un virus a RNA como el fago MS2 pudimos estudiar el efecto de las poliaminas sobre el aumento de los errores de traducción inducidos por estreptomicina en un determinado polipéptido, en este caso la proteína de envoltura del fago.

La incorporación errónea de lisina en lugar de asparagina origina la aparición de proteínas satélites más básicas que la natural del fago y los niveles relativos de estas proteínas satélites dan una medida de la precisión de la traducción.

Aunque los niveles basales de error en la síntesis de la proteína de cubierta del fago son mayores en las bacterias sometidas al ayuno de poliaminas, la presencia del antibiótico sólo provocó la disminución de la fidelidad de la traducción en aquellas células cultivadas en presencia de los poliaminas (Figura 25), mientras que la frecuencia de sustitución no fue alterada por la presencia del antibiótico en las bacterias desarrolladas sin poliaminas. Estos resultados confirman que las partículas ribosomales anormales de estas células son poco sensibles a la acción de la estreptomicina.

La diferente afinidad del antibiótico por los ribosomas producidos en las distintas condiciones no es una consecuencia directa de los niveles intracelulares de poliaminas, sino que está provocada por las alteraciones estructurales de las partículas ribosomales sintetizadas en las células desarrolladas en ausencia de poliaminas. La Figura 27 muestra que aún después de dos horas de haber suplementado los cultivos con putrescina la sensibilidad a la droga todavía es notablemente menor que la de los cultivos desarrollados por varias generaciones con

niveles normales de poliaminas. Esto indica que posiblemente la recuperación del fenotipo original no se produce hasta el reemplazo de la población de los ribosomas sintetizados en ausencia de poliaminas. Por otra parte la presencia de la proteína S1 no sería suficiente para que los ribosomas recuperen su sensibilidad normal a la estreptomina.

Una vez que el antibiótico interacciona con los ribosomas bacterianos dicha asociación es irreversible (157). Se estudió la recuperación del desarrollo celular y la síntesis de proteínas al eliminar la estreptomina luego de cultivar las células por una hora en presencia de la droga. Las bacterias desarrolladas en presencia de poliaminas fueron incapaces de reiniciar su crecimiento y la inhibición de la síntesis proteica fué irreversible. Por el contrario las células sometidas al ayuno de los poliaminas recuperaron lentamente la capacidad de sintetizar proteínas y la de multiplicarse (Figura 28).

La presencia de poliaminas en bacterias auxótrofas también es necesaria para la acción correcta de otros antibióticos aminoglucósidos como la ampicilina y la kanamicina. En todas las cepas estudiadas cultivadas en ausencia de poliaminas se observó diferentes niveles de resistencia a las drogas que dependían de la cepa y del antibiótico involucrado en cada caso.

3-Influencia de poliaminas en la expresión de resistencia a kanamicina

Para investigar si la respuesta a los antibióticos aminoglucósidos de las bacterias auxotróficas para poliaminas depende exclusivamente de los ribosomas se estudió la influencia de los niveles intracelulares de los poliaminas sobre la expresión de resistencia a kanamicina mediada por plásmidos.

Las cepas E.coli LM 27 y LM 53, sensibles al antibiótico, fueron transformadas con el plásmido pVK 102 que contiene el gen de la kanamicina fosfotransferasa que convirtió a las cepas mencionadas en resistentes a kanamicina y neomicina.

Las cepas originales desarrolladas en ausencia de poliaminas presentaban una resistencia parcial a kanamicina; en cambio eran muy sensibles al antibiótico si el medio de cultivo se suplementaba con los poliaminas. Al analizar el comportamiento de las cepas transformadas se observó que la velocidad de expresión del fenotipo de resistencia dependía del contenido de poliaminas, pero en un sentido inverso al observado en las células sin transformar. En los cultivos suplementados con poliaminas la presencia del antibiótico ocasionó una disminución del crecimiento durante una hora con recuperación posterior del desarrollo normal, mientras que en las bacterias sometidas al ayuno de poliaminas, la recuperación del crecimiento demoró de cuatro a cinco horas (figura 32).

Se pudo demostrar que la presencia del antibiótico inducía un aumento en los niveles de actividad de la enzima fosforilante, lo que hasta la realización de este trabajo era objeto de discusión. La inducción de la síntesis de la enzima se comprobó de las siguientes formas:

a) determinando el aumento de la actividad específica luego de tratar a las células con el antibiótico por diferentes períodos (Figura 34).

b) detectando, mediante un análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, la aparición en las cepas transformadas de una proteína de 27 kD ausente en las células no transformadas. Estos análisis indicaron que los niveles de esta proteína aumentan con el tiempo en presencia de kanamicina (Figura 35).

c) comprobando que los niveles de la enzima varían en forma paralela a la recuperación del crecimiento celular.

La diferencia en la expresión de la resistencia a la kanamicina no es consecuencia de distintos niveles de transcripción del gen de la kanamicina fosfotransferasa en presencia y ausencia de poliaminas, ya que los niveles de RNA mensajeros específicos de la enzima son mayores en las células desarrolladas en ausencia de los policationes en las dos cepas estudiadas (Figura 38).

Estos resultados sugieren que la deficiencia que en ausencia de poliaminas dificulta la correcta expresión de la resistencia a antibióticos codificada en el plásmido está también localizada a nivel de la traducción, mientras la replicación y la transcripción del plásmido parecen no ser mayormente afectadas por la ausencia o presencia de poliaminas. Los experimentos realizados no permiten descartar la existencia de alteraciones a nivel de los RNA mensajeros en las células desarrolladas en ausencia de poliaminas, ya que no se realizaron ensayos de traducción "in vitro" de los RNA mensajeros producidos en las distintas condiciones

V-CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se estudió la influencia de las poliaminas sobre tres aspectos diferentes de la fisiología bacteriana: la fidelidad de la síntesis proteica, la acción de diferentes antibióticos aminoglucósidos y la expresión de la resistencia a estas drogas dependiente de plásmidos.

Los experimentos realizados permiten afirmar que los comportamientos anormales observados en las células sin poliaminas se deben a alteraciones a nivel de los ribosomas producidos en estas condiciones. Las partículas 30 S defectuosas que se sintetizan en las células con bajos niveles endógenos de poliaminas determinan que la maquinaria de síntesis proteica funcione con menor precisión y eficiencia: comete una frecuencia elevada de errores en el reconocimiento de ciertos codones, presenta una interacción disminuída y anormal con los antibióticos aminoglucósidos y traduce a menor velocidad los RNA mensajeros. Es ampliamente conocido que estas características dependen fundamentalmente de la subunidad ribosomal 30 S. Las alteraciones en estas partículas deben ser estructurales, ya que no pueden ser eliminadas por el solo hecho de suplementar a los cultivos con poliaminas. Es necesario, en cambio, el reemplazo de los ribosomas originales por los producidos en presencia de poliaminas .

VI-BIBLIOGRAFIA.

- 1-Hafner E.; Tabor C.W. y Tabor,H. (1979) J.Biol.Chem 254,12419-12426.
- 2-Morris,D.R y Jorstad, C.M. (1970) J.Bacteriol. 101,731-737.
- 3-Hirshfield,I.N.; Rosenfeld,H.J.; Leifer,Z. y Maas,W (1970) J.Bacteriol 101,725-730.
- 4-Tabor,C.W. y Tabor,H. (1984) Ann.Rev. Biochem. 53,749-790.
- 5-Heby,O. (1981) Differentiation 19,1-20.
- 6-Cohn,M.; Tabor,C.W. y Tabor,H.(1980) J.Bacteriol 142,791-799.
- 7-Hosaka,K. y Yamashita,S. (1981) Eur.J.Biochem. 116,1-6.
- 8-Paulus,T.J.; Kiyono,P. y Davis,R.H. (1982) J.Bacteriol 152, 291-297
- 9-Sneath,P.H.A. (1955) Nature 175,818
- 10-Herbst,E.J. y Snell E.E (1948) J.Biol.Chem 176,989-990.
- 11-Kuehn,G.D. y Atmar,V. (1983) Advances in Polyamine Research (Bachrach,U;Kaye,A y Chayen,R. eds) vol 4 pp 615-629 .Raven Press, New York.
- 12-Seiler,N y Deckard,K. (1978) Advances in Polyamine Research (Campbell,R.; Morris,D.; Bartos,D.; Daves,G. y Bartos,F eds) vol 2 pp 145-150. Raven Press,New York.
- 13-Jänne,J.; Poso,H. y Raina,A. (1978) Biochim.Biophys.Acta. 473,241-293 .
- 14-Bacchi,C.J. y Mc Cann,P.P. (1987) Inhibition of polyamines. Biological significance and basis for new therapies(Mc Cann, PP.;Pegg,A.E. y Sjoerdsma,A eds),pp 317-344. Academic Press, Orlando Fl
- 15-Algranati,I.D. y Goldemberg,S.H. (1977) Trends.Biochem. Sci. 2,272-274
- 16-Mogh,H (1959) Biochem. Biophys. Acta 36,529-531.

- 17-Fink,H.L. y Folk,J.E. (1981) *Advances in Polyamine Research* (Caldarella,C;Zappia,V. y Bachrach,U. eds) vol 3 pp 187-197. Raven Press, New York.
- 18-Jacob,S.T.;Rose,K.M. y Canellakis,Z.N. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bachrach,U;Kaye,A y Chayen,R. eds) vol 4 pp 631-643. Raven Press, New York.
- 19-Herbst,E.J.;Weaver,R.H. y Keister,D.L. (1958) *Arch. Biochem. Biophys* 75,171-177.
- 20-Tabor,C.W. y Tabor,H (1966) *J.Biol.Chem* 241,3714-3723.
- 21-Tabor,H y Tabor,C.W. (1969) *J.Biol.Chem* 244,2286-2292.
- 22-Tabor,H.; Tabor,C.W. e Irreverre,F. (1973) *Anal.Biochem* 55,457-467.
- 23-Lusk,J.E.; Williams,R.J. y Kennedy,P. (1968) *J.Biol.Chem* 243,2618-2624.
- 24-Tabor,H; Rosenthal,S.M y Tabor,C.W. (1958) *J.Biol.Chem* 233, 907-914.
- 25-Kashiwagi,K.; Hosokawa,N.; Furuchi,T.; Kobayashi,H.; Sasakawa,C.; Yoshikawa,M. e Igarashi,K. (1990) *J.Biol. Chem* 265,20893-20897.
- 26-Dion,A.S. y Cohen,S.S. (1972) *J.Virol* 2,423-430.
- 27-Goldemberg,S.H. (1980) *J.Bacteriol.*141,1428-1431.
- 28-Igarashi,K.; Kashiwagi,K.; Hamasaki,H.; Miura,A; Kakegawa, T; Hirose,S. y Matsuzaki,S. (1986) *J.Bacteriol* 166,128-134.
- 29-Tabor C.W. y Kellogg,P.D.(1967) *J.Biol.Chem* 242,1044-1052.
- 30-Frydman,B.; Frydman,R.; de los Santos,C.; Garrido,D.A.; Goldemberg,S.H y Algranati,I.D (1984) *Biochem.Biophys. Acta* 805,337-344.
- 31-Frydman,B.; de los Santos,C. y Frydman,R.B. (1990) *J.Biol.Chem* 265,20874-20878.
- 32-Morris,D.R. y Koffron,K.L(1969) *J.Biol.Chem* 244,6094-6099.
- 33-Paulus,T.J.; Cramer,C.L. y Davis,R.H. (1983) *J.Biol.Chem* 258,8608-8612.

- 34-Paulus,T.J. y Davis,R.H. (1982) *Biochem.Biophys.Res. Commun* 104,228-233.
- 35-Michaels,R y Tchen,T.T. (1968) *J.Bacteriol* 95,1966-1967.
- 36-Oshima,T. (1983) *Methods Enzymol* 94,401-411.
- 37-Oshima,T. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bachrach,U; Kaye,A y Chayen,R. eds) vol 4 pp 479-487. Raven Press, New York.
- 38-Oshima,T.; Hamasaki,N.; Usawa,T. y Friedman,S.M. (1990) *The Biology and Chemistry of Polyamines.* (Goldemberg,S.H. y Algramati I.D.,eds) pp 1-10. IRL Press, Oxford.
- 39-Fujihara,S. y Harada,Y. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Commun* 165,659-666.
- 40-Kullnig,R.; Rosano,C.L. y Hurwitz (1970) *Biochem.Biophys. Res. Commun* 39,1145-1148.
- 41-Karrer,E.; Bose,R.J. y Warren,R.A.J. (1973) *J.Bacteriol* 114, 1365-1366.
- 42-Rosano,C.L.; Bunce,S.C. y Hurwitz,C. (1983) *J.Bacteriol* 153, 326-334.
- 43-Tabor,C.W. y Tabor,H. (1976) *Annu.Rev.Biochem* 45,285-306.
- 44-Bachrach,U (1973) *Function of Naturally Occurring Polyamines*, pp 29-35. Academic Press Inc.
- 45-Tabor,C..W. y Dobbs,L.G. (1970) *J.Biol.Chem* 245,2086-2091
- 46-Raina,A.;Jansen,M. y Cohen,S.S.(1967) *Med.Biol.*59,269-461
- 47-Fairlamb,A.H.; Blackburn,P.; Ulrich,P.; Chait,B. y Cerami,A. (1985) *Science* 227,1485-1487.
- 48-Umezawa,H. *Advances in Polyamine Research* (1983) (Bachrach, U; Kaye,A y Chayen,R.eds) vol 4 pp 1-15.Raven Press, New York.
- 49-Neilands,J.B. (1983) *Methods Enzymol* 94,437-441.
- 50-Cooper,H.L.; Park,M.H. y Folk,J.E. (1982) *Cell* 29,791-797.
- 51-Kropinski, A.M.B.; Bose,J.y Warren, R.A.J. (1973) *Biochemistry* 12,151-157.

- 52-Paulin,L.; Vehmaanpera,J.; Nykanen,I. y Poso,H. (1983) Biochem.Biophys.Res.Comm. 114,779-784.
- 53-Tabor,C.W. y Tabor,H (1985) Microbiol.Rev. 49,81-89.
- 54-Morris,D.R. y Pardee,A.B. (1966) J.Biol.Chem 241,3129-3135.
- 55-Gale,E.F. (1940) Biochem.Journal 34,392-413.
- 56-Applebaum,D.M.; Sabo,D.L.; Fischer,E.H. y Morris,D.R. (1975) Biochemistry 14,3675-3681.
- 57-Blethen,S.L.; Boeker,E.A. y Snell,E.E. (1968) J.Biol.Chem 243,1671-1677.
- 58-Boeker,E.A.; Fischer,E.H. y Snell,E.E. (1971) J.Biol.Chem 246,6776-6781.
- 59-Applebaum,D.M.; Dunlap,J.C. y Morris,D.R. (1977) Biochemistry 16,1580-1584.
- 60-Morris,D.R. y Pardee,A.B. (1965) Biochem.Biophys.Res. Commun 20,697-702.
- 61-Morris,D.R. y Boeker,E. (1983) Methods Enzymol 94,125-134
- 62-Wu,W.H. y Morris,D.R. (1973) J.Biol.Chem 248,1687-1695.
- 63-Boyle,S.M.; Markham,G.D.; Hafner,E.W.; Wright,J.M.; Tabor,H. y Tabor,C.W. (1984) Gene 30,129-136.
- 64-Kashiwagi,K e Igarashi,H (1988) J.Bacteriol.170,3131-3135
- 65-Bowman,W.H.; Tabor,C.W. y Tabor,H (1973) J.Biol.Chem 248, 2480-2486.
- 66-Markham,G.D.; Hafner,E.W.; Tabor,C.W. y Tabor,H (1983) Methods Enzymol 94,219-222.
- 67-Markham,G.D.; Tabor,C.W. y Tabor,H. (1982) J.Biol.Chem 257, 12063-12068.
- 68-Bachman,B (1983) Microbiol.Rev.47,180-230.
- 69-Satishchandran,C.; Markham,G.D.; Moore,R.C. y Boyle,S.M. (1990) J.Bacteriol 172,4748.
- 70-Quiao-Wen,X.; Tabor,C.W. y Tabor,H. (1989) J.Bacteriol 171, 4457-4465.
- 71-Cunningham-Rundles,S. y Maas,W.K. (1975) J.Bacteriol 124, 791-799.

- 72-Tabor,C.W. y Tabor,H (1987) J.Biol.Chem 262,16037-16040.
- 73-Buch,J.K. y Boyle,S.M. (1985) J.Bacteriol 163,522-527.
- 74-Goldemberg,S.H. y Algranati,I.D. (1977) Mol.Cell.Biochem 16, 71-77.
- 75-Tabor,C.W.; Tabor,H. y Bachrach,U. (1964) J.Biol.Chem 239, 2194-2203.
- 76-Cataldi,AA. (1986) Tesis Doctoral pp 92. Univ. Bs.As.
- 77-Heller,J.S.; Rostomily,R; Kyriakidis,D.A. y Canellakis, E.S. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 80, 5181-5184.
- 78-Fong,W.E.; Heller,J.S. y Canellakis,E.S. Biochem. Biophys.Acta. (1976) 428,456-465.
- 79-Heller,J.S.; Fong,W.F. y Canellakis,E.S.(1976) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A 73,1858-1862.
- 80-Matsufuji,S; Kanamoto,R; Murakami,Y y Hayashi,S (1990) J. Biochem. 107,87-91.
- 81-Friedman,Y.; Park,S.; Levasseur,S. y Buerke,G.(1977) Biochem.Biophys.Acta. 500,291-303.
- 82-Fujita,K.; Murakami,Y. y Hayashi,S.(1982) Biochem.J. 204, 647-652.
- 83-Grillo,M.A.; Bedino,S. y Testore,G.(1980) Int.J.Biochem. 11,37
- 84-Kyriakidis,D.A. (1983) Advances in Polyamine Research (Bachrach,U;Kaye,A y Chayen,R. eds) vol 4 pp 427-436. Raven Press, New York.
- 85-Kyriakidis,D.A.; Heller,J.S. y Canellakis,E.S. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 75,4699-4703.
- 86-Kitana,T. y Fujisawa,H.(1984) J.Biol.Chem 259,10036-10040
- 87-Matsufuji,S; Miyazaki,Y; Kanamoto,R.; Kameji,T.; Murakami, Y.; Baby,T.; Fujita,K.; Ohno,T. y Hayashi,S. (1990) J. Biochem.108,365-371.

- 88-Matsufuji,S; Baby,T.; Kanamoto,R.; Murakami,Y. y Hayashi, S. (1990) The Biology and Chemistry of Polyamines. (Goldemberg, S.H. y Algranati I.D.,eds) pp 81-90. IRL Press, Oxford.
- 89-Panagiotidis,C.A. y Canellakis,E.S. (1984) *J.Biol.Chem* 259, 15025-15027
- 90-Panagiotidis,C.A.; Huang,S.C. y Canellakis,E.S. (1989) in Ornithine Decarboxilase: Biology, Enzimology and Molecular Genetics (Hayashi,S. ed) section 129,pp 107-113 Pergamon,New York.
- 91-Huang,S.; Panagiotidis,C.A. y Canellakis,E.S. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 87,3464-3468
- 92-Kashiwagi,K e Igarashi,K. (1987) *Biochem.Biophys.Acta* 911, 180-190
- 93-Holtta,E.J.; Jnne,J. y Pispá,J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47,1165-1167.
- 94-Cohen,S.S.; Hoffner,N.; Jansen,M.; Moore,M. y Raina,A (1967) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 57,721-729.
- 95-Igarashi,K.; Mitsui,K.; Kubota,M.; Shirakuma,M.; Ohnishi,R. e Hirose,S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 755,326-331.
- 96-Wright,J.M. y Boyle,S.M. (1982) *Mol.Gen.Genet.* 186,482-487.
- 97-Munro,G.F.; Hercules,K.; Morgan,J. y Sauerbier,W. (1972) *J.Biol.Chem* 247,1272-1280.
- 98-Munro,G.F. y Sauerbier,W. (1973) *J.Bacteriol* 116,488-490.
- 99-(1981) *Advances in Polyamine Research* (Caldarera,C; Zappia,V. y Bachrach,V. eds) vol 3 .Raven Press, New York.
- 100-Widom,J; Baldwin,R.L. (1980) *J.Mol.Biol.*144,431-453.
- 101-Stevens,L (1970) *Biol.Rev.Cambridge Philos.Soc.* 45,1-27.
- 102-Manning,G.S. (1978) *Quant.Rev.Biophys* 11,179-246.

- 103-Record, M.T. jr; Mazur, S.J.; Melanon, P.; Roe, J.M.; Schurr S.L. y Unger, L. (1981) *Annu. Rev. Biochem* 50, 997-1024.
- 104-Thomas, T.J. y Bloomfield, V.A. (1983) *Biopolymers* 22, 1097-1106.
- 105-Allison, S.A.; Herr, J.C. y Schmir, J.M. (1981) *Biopolymers* 20, 469-488.
- 106-Marx, K.A. y Reynolds, T.C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 79, 6484-6488.
- 107-Krasnow, M.A. y Cozzarelli, N.R. (1982) *J. Biol. Chem* 257, 2687-2693.
- 108-Behe, M. y Felsenfeld, G (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78, 1618-1623
- 109-Nordheim, A. y Rich, A. (1983) *Nature* 303, 674-678.
- 110_Dion, A.S. y Cohen, S.S. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 69, 213-217.
- 111-Geiger, L.E. y Morris, D.R. (1978) *Nature* 272, 730-732.
- 112-Geiger, L.E. y Morris, D.R. (1980) *J. Bacteriol* 141, 1192-1198
- 113-Cooper, S. y Helmstetter, C.E (1968) *J. Mol. Biol* 31, 519-540
- 114-Morris, D.R. y Harada, J.J. (1980) *Polyamines in Biomedical Research* (Gaugus, J.M. ed) pp 1-16, Wiley London
- 115-Krokan, H. y Eriksen, A. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 501-508.
- 116-Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA replication*. Freeman, San Francisco.
- 117-Pochon, F. y Cohen, S.S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 47, 720-726.
- 118-Quigley, G.J.; Teeter, M.M. y Rich, A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75, 64-68.
- 119-Dock, A.C.; Lorber, B.; Moras, D. Pixa, G.; Thierry, J.C. y Giege, R. (1984) *Biochimie* 66, 179-201.
- 120-Panagiotidis, C.A.; Blacburn, S.; Low, K.B. y Canellakis, E.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 4423-4427.
- 121-Peebles, C.L.; Gegenheimer, P. y Abeson, J (1983) *Cell* 32, 525-536.
- 122-Cohn, M.S.; Tabor, C.W.; Tabor, H. y Wickner, R.B. (1978) *J. Biol. Chem* 253, 5225-5227.

- 123-Tyagi,A.K.; Wickner,R.B.; Tabor,C.W. y Tabor,H. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 81,1149-1153.
- 124-Jacob,S.T. y Rose,K.M. (1978) Methods in Cancer Research 14,191-241.
- 125-Abraham,A.K. (1968) Eur.J.Biochem.5,143-146.
- 126-Young,D.V. y Srinivasan,P. (1972) J.Bacteriol 112,30-39
- 127-Mitsui,K.; Ohnishi,R.; Hirose,S. e Igarashi,K. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun 123,528-534.
- 128-Russel,D.H. y Durie,B.G.M. (1978) Poliamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth. pp 89-105 Raven Press, New York.
- 129-Seely,J.E.; Stetler,D.A.; Jacob,S.T. y Pegg,A.E. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun 120,219-225.
- 130-Algranati,I.D. y Lengyel,P. (1966) J.Biol.Chem 241,1178-1783.
- 131-Atkins,J.F.; Lewis,J.B. Anderson,C.W. y Gesteland,R.F. (1975) J.Biol.Chem 250, 5688-5895.
- 132-Abraham,A.K.; Olsnes,S. y Phil,A. (1979) FEBS Lett 102, 93
- 133-Echandi,G. y Algranati,I.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun 67,1185-1191.
- 134-Goldemberg,S.H. y Algranati,I.D. (1981) Eur.J.Biochem. 117,251-255.
- 135-García Patrone,M; Gonzalez,N.S. y Algranati,I.D. (1975) Biochim.Biophys.Acta. 395,373-380.
- 136-Echandi,G. y Algranati,I.D. (1975) Biochem.Biophys.Res. Commun 62,313-319.
- 137-Igarashi,K; Kashiwagi,K; Kishida,K; Kakegawa,T e Hirose,S. (1981) Eur.J.Biochem. 114,127-131
- 138-Igarashi,K; Kakegawa,T. e Hirose,S (1982) Biochim. Biophys.Acta. 697,185-192
- 139-Kurland,C.G. (1982) Cell 28,201-202.

- 140-Igarashi,K.; Sugawar,K.; Izumi,I.; Nagayama,C. e Hirose.S. (1974) Eur.J.Biochem. 48,495-502.
- 141-McMurry,L.M. y Algranati,I.D. (1986) Eur.J.Biochem. 155, 383-390.
- 142-Morris,D.R. y Hansen,M.T.(1973) J.Bacteriol 116,588-592.
- 143-Morris,D.R. y Lockshon,D. (1981) 143-(1981) Advances in Polyamine Research (Caldarera,C; Zappia,V. y Bachrach,V. eds) vol 3 pp 299-307 .Raven Press, New York.
- 144-Jorstad,C.J. y Morris,D.R. (1974) J.Bacteriol. 119,857-860.
- 145-Nierlich,D.P. (1978) Annu.Rev.Microbiol. 32,393-432.
- 146-Kay,J.E.; Ahern,T. Lindsay,V.J. y Sampson,J. (1975) Biochim.Biophys.Acta. 378, 241-250
- 147-Tabor,H. y Tabor C.W. (1964) Pharmacol. Rev. 16,245-300
- 148-Grossowicz,N. y Ariel,M. (1963) J.Bacteriol 85,293-300.
- 149-Jawetz,E.;Gunnison,J.B. y Bruff,J.B. (1952) J. Bacteriol 64,29-39.
- 150-Stern,J.L.; Barner,H.D.y Cohen,S.S. (1966) J.Mol.Biol. 17,188-217.
- 151-Davies,J; Gilber,T.W. y Gorini,L.(1964) Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A 51,883-890.
- 152-Moazed,D. y Noller,H.F. (1987) Nature 327,389-394.
- 153-Gravel, M.; Melanon, P. y Brakier-Gingras, L. (1987) Biochemistry 26,6227-6232.
- 154-Flaks,J.G.; Cox,E.C.; Witting,M.L. y White,J.R. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun 7,390-393.
- 155-Tai,P.C.; Wallace,B.J. y Davis,B.D. (1978) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A 75,275-279.
- 156-Davis,B.D.; Tai,P.C. y Wallace,B.J. (1974) Ribosomes (Nomura,M.; Tissieres,A. y Lengyel,P. eds) pp 771-789. Cold Spring Harbor, New York.

- 157-Wallace,B.J. y Davis,B.D. (1973) *J.Mol.Biol.* 75,377-390.
- 158-Anand,N.; Davis,B.D. y Armitage,A.K. (1960) *Nature* 185, 23-24.
- 159-Ozaki,M.; Mizushima,S. y Nomura,M. (1969) *Nature* 222, 333-339.
- 160-Benveniste,R y Davies,J. (1973) *Annu.Rev.Biochem.*42,471-506
- 161-Gorini,L (1974) *Ribosomes* (Nomura,M.; Tissieres,A. y Lengyel,P. eds) pp 791-803 Cold Spring Harbor, New York.
- 162-Davies,J y Davies,B.D. (1968) *J.Biol.Chem* 243,3312-3316
- 163-Zierhut,G.; Piepersberg,W.J. y Bock,A (1979) *Eur.J. Biochem.* 98,577-583.
- 164-Lando,D.; Cousin,M.A.; Ojasoo,T. y Raynaud,J.P. (1976) *Eur.J.Biochem.* 66, 597-606.
- 165-Drake,J.W. (1969) *Nature* 221,1132
- 166-Rosenberger,R.F. y Foskett,G. (1981) *Mol.Gen.Genet* 183, 561-563.
- 167-Okamoto,M. y Savageau,M.A. (1984) *Biochemistry* 23,1701-1710
- 168-Lin.S.X.; Baltzinger,M. y Remy,P (1984) *Biochemistry* 23,4109-4116.
- 169-Woese,C.R.(1967)*Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.*7,107-172
- 170-Gorini,L. (1974) *Nature New Biol.* 234,261-264.
- 171-Ellis,N y Gallant,J. (1982) *Mol.Gen.Gent.* 188,169-172.
- 172-Bouadloun,F.; Donner,D. y Kurland,C.G. (1983) *EMBO J.* 2, 1351-1356.
- 173-Ninio,J. (1974) *J.Mol.Biol.* 84,297-313.
- 174-Anderson,D. y Kurland,C.(1983) *Mol.Gen.Genet.*191,378-381
- 175-Menninger,J.R. (1976) *JBC* 251,3392-3398.
- 176-Anderson,R.P. y Menninger,J.R. (1987) *Mol.Gen.Genet* 209, 313-318.
- 177-Gallant,J. y Foley,D. (1979) *Ribosomes, structure, function and genetic.* (Chamblis,G; Craven,G.R.; Davies,J.; Davis,K.; Kahan,K. y Nomura, eds) pp 615-638. University Park Press, Baltimore.

- 178-O'Farrel,P.H. (1978) Cell 14,545-557.
- 179-Ninio,J. (1986) FEBS Lett 196,1-4
- 180-Sakai,T. y Cohen,S. Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.17,15
- 181-Bitonti,A.J y McCann,P. (1987) Inhibition of polyamines. Biological significance and basis for new therapies (Mc Cann, PP.;Pegg,A.E. y Sjoerdsma,A eds),pp 259-316. Academic Press, Orlando Fl
- 182-Davis,B.D. and Mingoli,E.S. (1950) J.Bacteriol. 60,17-28.
- 183-Kobayashi,Y. y Maudsley,D. (1974) Biological Applications of Liquid Scintillation Counting. pp 51. Academic Press, New York.
- 184-Ramakrishnan,T. and Adelberg,E.A.(1965),J.Bacteriol.89, 654-660.
- 185-Patterson,M.S. and Greene,R.C. (1965) Anal.Chem.37,854-857.
- 186-Algranati,I.D.; Gonzalez,N.S. and Bade,E.G. (1969) Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 62, 574-580.
- 187-Bray,G.A. (1960) Anal.Biochem 1,279
- 188-O'Farrell,P.H. (1975) J.Biol.Chem.250,4007-4021.
- 189-O'Farrell,P.Z.; Goodman,H.M. y O'Farrell,P. (1977) Cell 12,1133-1142.
- 190-Fling,S. y Greferson,S.D.(1986) Anal.Chem.37,854-857.
- 191-Chamberlain,J.P. (1979) Anal.Biochem. 98,132-135.
- 192-Knauf,V.C. and Nester,E.W. (1982) Plasmid 8,45-54.
- 193-Dagert,M. and Ehrlich,S.D. (1979) Gene 6,23-28.
- 194-Birnboim, H.C. y Doly,J. (1977) Nucleic. Acid. Res. 7, 1513-1522.
- 195-Staebell,M.; Tomes,D.; Weissinger,A.; Madodock,S.; Marsh, W.; Huffman,G.; Bauer,R.; Ross,M. y Howard,J. (1990) Anal. Biochem 185,319-323.
- 196-Chang,C.L; Shi,B.Q. y Davis,C.L. (1990) Anal.Biochem.188,300-304.
- 197-Focus 2(2),9

- 198-Saambrook,J.; Fritsch,E. y Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning (2^a ed) cap.6
Cold Spring Harbord Laboratory Press
- 199-Saambrook,J.; Fritsch,E. y Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning (2^a ed) cap.7
Cold Spring Harbord Laboratory Press
- 200-Mc Donnel,M.W.; Simon,M.N. y Studier,F.W.(1977) J.Mol. Biol. 110,119
- 201-Saambrook,J.; Fritsch,E. y Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning (2^a ed) cap.10
Cold Spring Harbord Laboratory Press
- 202-Lowry,O.H.; Rosebrough,N.J.; Farr,A.L y Randall,R.H. (1951) J.Biol.Chem 193,
248-254.
- 203-Cozzone,A.J. (1981) Trends.Biochem.Sci. 6,106-107.
- 204-O'Farrel,P.H. (1978) Cell 14,545-557.
- 205-Grossman,A.D.; Taylor,W.E.; Burton,Z.F.; Burgess,R.P. y Gross,C.A. (1985)
J.Mol.Biol. 186,357-365.
- 206-Goldemberg,S.H. y Algranati,I.D. Eur.J.Biochem (1981) 117,251-255.
- 207-Fromgeot,H.P.M. y Zinder,N.D.C. (1968) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A 61,184-191.
- 208-Parker,J.; Johnston,T.C. y Borgia,P.T. (1980) Mol.Gen. Genet. 180,275-281.
- 209-Beremand,M.N y Blumenthal,T (1979) Cell 18,257-262.
- 210-Fiers,W.; Contreras,R.; Duerinck,F.; Haegeman,G.; Iserentant,D.;
Merregaert,J.;Min Jou,W.; Molemans,F.; Raeymaekers,A.; Van den Berghe,A.
Volckaert,G. y Ysebaert,M (1976) Nature 260,500-507.
- 211-Goldemberg,S.H.; Fernandez-Velazco,J.G. y Algranati,I.D. (1982) FEBS Lett.
142,275-279.
- 212-Pansegrau,W.; Miele,L. Lurz,R. y Lank,E. (1987) Plasmid 18,193-204
- 213-Algranati, I.D.; Echandi,G.; Garcia-Patrone,M.; González,N. y Goldemberg,S.H.
(1976) Arch.Biol.Med.Exp. 10,49-60.

- 214-Igarashi,K.; Kashiwagi,K.; Kishida,K.; Watanabe,Y.; Kogo,A. e Hirose,S. (1979) Eur.J.Biochem. 93,345-353.
- 215-Dix,D. y Thompson,R.(1986) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83, 2027-2031.
- 216-Goldemberg,S.H. (1984) Biochem.J. 219,205-210.
- 217-Gallant,J.; Weiss,R.; Murphy,J. y Brown,M (1985) The Molecular Biology of Bacterial Growth pp 92-107 (Schaecter,M.; Neidhardt,F.; Inngraham,J. y Kjeldgaard,N. eds) Jones and Bartlett,Boston.
- 218-Igarashi,K.; Sakai,Y. y Kashiwagi,K. (1990) The Biology and Chemistry of Polyamines. (Goldemberg, S.H. y Algranati,I.D.,eds) pp 11-18. IRL Press, Oxford.
- 219-Kashiwagi,K.; Sakai,Y. e Igarashi,K. (1989) Arch. Biochem. Biophys 268,379-387.
- 220-Davis,B.D. (1987) Microbiol.Rev. 51,341-350.
- 221-Goldemberg,S.H. y Algranati,I.D, (1981) Medical Biology 59,360-367.

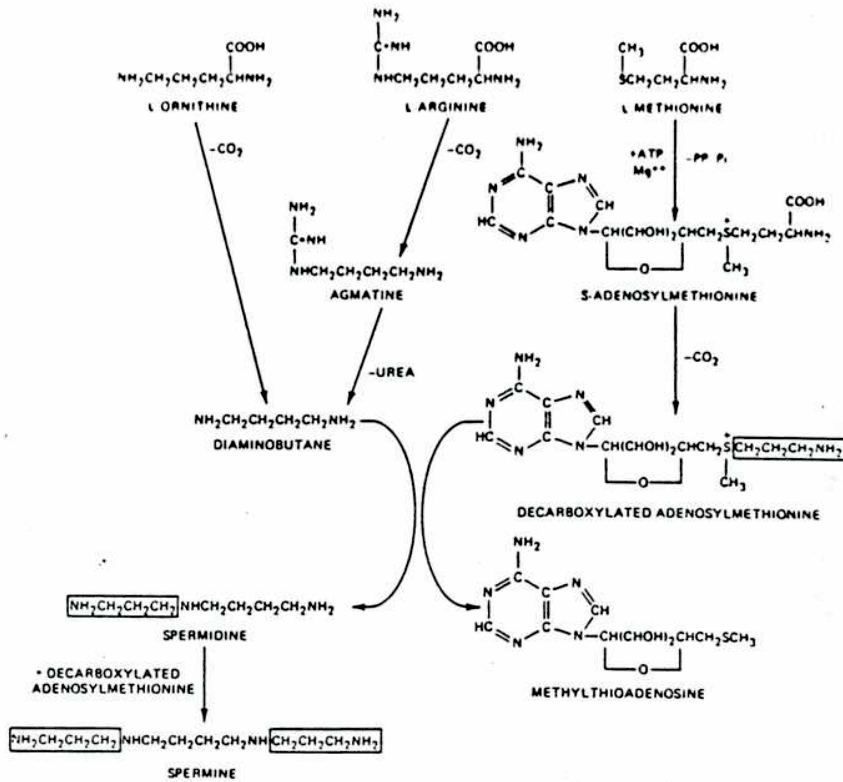


Figura 1: Caminos generales para la biosíntesis de poliaminas. En *E.coli* la producción de espermina a partir de espermidina no se encuentra presente. En levaduras y células de eucariontes superiores la producción de putrescina a partir de arginina y agmatina está ausente.