

## Tesis de Posgrado

# Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos

Fastame, Inés Gabriela

1995

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Fastame, Inés Gabriela. (1995). Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2794\\_Fastame.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2794_Fastame.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Fastame, Inés Gabriela. "Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2794\\_Fastame.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2794_Fastame.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos

PRIMERA PARTE:

Efecto de poliaminas en la fidelidad de traducción bacteriana  
y en la acción de antibióticos aminoglucósidos

SEGUNDA PARTE:

Caracterización de un inhibidor de la traducción en  
Leishmania mexicana

Inés G. Fastame

Director: Dr Israel D. Algranati

Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar

Tesis realizada para optar al título de Doctor de la Universidad,  
especialidad: Química Biológica

1995

1j2

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr I.D. Algranati, por su apoyo constante, por todas sus enseñanzas y valiosos consejos.

A la Dra Nélica González, por la colaboración que siempre me brindó.

A la Dra S. Goldemberg, por su invaluable ayuda.

A las autoridades del IIB Fundación Campomar, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

A Adrián Vojnov y Daniel Bassi , por los momentos compartidos y por la valiosa colaboración que me brindaron.

A mis compañeros de laboratorio, por los momentos compartidos.

A los Dres Roberto Staneloni, M. Dankert, Carlos Frasch, Oscar Campetella, Daniel Sánchez, Juan Cazzulo Irma Mastronardi y Berta F. de Cazzulo por sus consejos y ayuda.

A Liliana Sferco y Juan Mucci, por brindarme asistencia técnica.

A mis compañeros del Instituto, especialmente a Horacio Natri, Laura Cremona y Alejandro Buschiazzo.

A la Sra Georgina Suter de Moure, Cristina Fernández , Carlos Hillewaert, Daniel Verón y Viviana Zárate, por la excelente predisposición para orientarme en todo lo referente a la biblioteca.

A Griselda Sourigues, Salvador Genovese, Soledad Delfino y Margarita Mazzardi, por su amable colaboración.

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr I.D. Algranati, por su apoyo constante, por todas sus enseñanzas y valiosos consejos.

A la Dra Nélica González, por la colaboración que siempre me brindó.

A la Dra S. Goldemberg, por su invaluable ayuda.

A las autoridades del IIB Fundación Campomar, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

A Adrián Vojnov y Daniel Bassi , por los momentos compartidos y por la valiosa colaboración que me brindaron.

A mis compañeros de laboratorio, por los momentos compartidos.

A los Dres Roberto Staneloni, M. Dankert, Carlos Frasc, Oscar Campetella, Daniel Sánchez, Juan Cazzulo Irma Mastronardi y Berta F. de Cazzulo por sus consejos y ayuda.

A Liliana Sferco y Juan Mucci, por brindarme asistencia técnica.

A mis compañeros del Instituto, especialmente a Horacio Natri, Laura Cremona y Alejandro Buschiazzo.

A la Sra Georgina Suter de Moure, Cristina Fernández , Carlos Hillewaert, Daniel Verón y Viviana Zárate, por la excelente predisposición para orientarme en todo lo referente a la biblioteca.

A Griselda Sourigues, Salvador Genovese, Soledad Delfino y Margarita Mazzardi, por su amable colaboración.

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

A mis padres

## ABREVIATURAS

AMD	actinomicina D
Asn	asparagina
ATA	ácido aurintricarboxílico
ATP	adenosina trifosfato
C.F.	<u>Crithidia Fasciculata</u>
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
L.m.	<u>Leishmania mexicana</u>
leu	leucina
NEM	N-etilmaleimida
+p	cultivo suplementado con poliaminas
-p	cultivo no suplementado con poliaminas
rpo B	cepa resistente a rifampicina
rps L+	cepa sensible a estreptomina
SDS	dodecil sulfato de sodio
Sm	estreptomina
spe B	gen de la agmatina ureohidrolasa
spe C	gen de la ornitina decarboxilasa
TCA	ácido tricloroacético
thi	tiamina
thr	treonina
TRIS	2-amino-2 hidroximetil-1,3, propanodiol
v	volumen
w	peso

## TRABAJOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS

-Polyamines modulate streptomycin mistranslation in *E. coli*'. Biochimica et biophysica Acta 1216 455-459. H. Nastri, I. Fastame e I.D Algranati.1993.

-"Inhibition of *in vivo* Transcription by Actinomycin D Treatment of EDTA permeabilized *E. coli*' : Effects on Bacteriophage Proliferation" . "Analytical Biochemistry" 222 ,163-167. I. Fastame e I.D. Algranati. 1994.

## INDICE

### PRIMERA PARTE:

#### *EFECTO DE POLIAMINAS EN LA FIDELIDAD DE TRADUCCION BACTERIANA Y EN LA ACCION DE ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS*

### INTRODUCCION

#### Poliaminas

1- Estructura y función	2
2- Localización intracelular	4
3- Poliaminas en bacterias	4
4- Metabolismo de poliaminas en bacterias	5

#### Antibióticos aminoglucósidos

Errores y alternativas de lectura del código genético	8
1- Acilación errónea	9
2- Errores de lectura	9
2.1- Errores de terminación	9
2.2- Cambios de marco de lectura	10

#### Poliaminas, fidelidad de traducción y antibióticos aminoglucósidos

Sistema utilizado en la presente investigación	11
1- Características estructurales del fago MS2	11
2- Errores de traducción en células infectadas con el fago MS2	13
3- Características estructurales del fago Q $\beta$	14
4- Inhibición de la síntesis proteica del huésped	14
Objetivos	15

### MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas	17
Medios de cultivo	17
Medios radioactivos	17
ayuno de poliaminas	17
Curvas de crecimiento	18
marcación de proteínas	18
Procesamiento de muestras	18



## SEGUNDA PARTE

### CARACTERIZACION DE UN INHIBIDOR DE LA TRADUCCION EN LEISHMANIA MEXICANA

#### INTRODUCCION

Leishmaniasis y su agente etiológico	60
1- Descripción general y epidemiología de la enfermedad	60
2- Ciclo de vida de Leishmania	61
Síntesis de proteínas	63
1- Generalidades	63
2- Regulación de la síntesis proteica	68
3- Síntesis proteica: procariotas versus eucariotas	72
4- Inhibidores de la síntesis proteica	73
4.1- Inhibidores de iniciación	73
4.2- Inhibidores de elongación	74
4.3- Inhibidores de terminación	75
Objetivos	76

#### MATERIALES Y METODOS

Descripción de las cepas	78
Medios de cultivo	78
Condiciones de cultivo	78
Reactivos radioactivos	78
Preparación de los extractos y obtención de las distintas fracciones celulares	78
Obtención del extracto de germen de trigo	79
Preparación de los distintos extractos a partir de hígado de rata	79
Ensayo de síntesis proteica <i>in vitro</i>	80
Procesamiento de muestras	81
Estudios cinéticos	81
Perfiles ribosomales	82
Ensayo de actividad RNasa	83
Ensayo de sensibilidad a proteasa	84
Determinación de la carga del inhibidor	84
Determinación de la concentración de proteínas	84
Tratamiento del inhibidor con cloruro de litio	84
Tratamiento con álkalí	84
Cromatografía de exclusión molecular	84

Medición de radioactividad insoluble	18
Electroforesis de proteínas marcadas	19
Producción de fagos	20
Dosaje de fagos	20
Inhibición de la síntesis proteica de la bacteria huésped	20
Síntesis de RNA	21

## RESULTADOS

1- Poliaminas y velocidad de crecimiento	23
2- Inhibición de la síntesis proteica de la bacteria huésped	24
2.1- Efecto de la rifampicina sobre la síntesis proteica de la bacteria huésped	24
2.2- Respuesta de la síntesis proteica de la bacteria huésped a la preincubación con rifampicina	25
2.3- Análisis por electroforesis de las proteínas bacterianas sintetizadas en presencia de distintas dosis de rifampicina	26
2.4- Efecto de rifampicina sobre la producción de fagos	27
2.5- Análisis de las proteínas del fago MS2 por electroforesis	28
3- Efecto de las poliaminas sobre la fidelidad de traducción y sobre la acción de la estreptomicina	29
3.1- Síntesis de proteínas y velocidad de crecimiento en presencia de estreptomicina	29
3.2- Análisis de las proteínas del fago MS2 por electroforesis: efecto de la estreptomicina	31
3.3- Análisis por electroforesis de las proteínas del fago Q $\beta$ : efecto de la estreptomicina	35
4- Inhibición de la transcripción de <u>E.coli</u> por permeabilización con EDTA y tratamiento con AMD	37
4.1- Efecto de EDTA y AMD sobre la síntesis proteica bacteriana	37
4.2- Efecto de rifampicina y AMD sobre la transcripción y traducción bacteriana	40
4.3- Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas en bacterias tratadas con rifampicina o AMD.	43
4.4- Efecto de la AMD y la rifampicina sobre la producción de fagos	45
4.5- Utilidad de la AMD sobre una cepa rifampicina resistente	46

<u>DISCUSION</u>	47
------------------	----

<u>CONCLUSIONES</u>	54
---------------------	----

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	55
---------------------	----

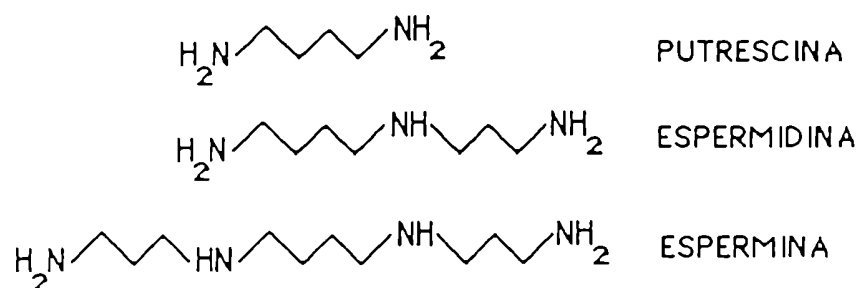
Determinación de la concentración de RNA	85
Electroforesis en geles de poliacrilamida	86
<b><u>RESULTADOS</u></b>	87
1- Efecto de extractos de <u>L. mexicana</u> y <u>C. fasciculata</u> sobre la síntesis proteica	88
2- Estudios cinéticos de la inhibición	90
3- Estudios cinéticos de protección	94
4- Efecto del inhibidor sobre agregados poliribosomales	95
5- Estudios sobre la naturaleza del inhibidor	97
5.1- Efecto de la temperatura sobre el inhibidor	97
5.2- Efecto de proteasas sobre el inhibidor	98
5.3- Efecto de la N-etilmaleimida sobre el inhibidor	102
5.4- Determinación de la carga del inhibidor	103
5.5- Filtración molecular	104
5.6- Electroforesis en geles de poliacrilamida	105
5.7- Comportamiento del inhibidor frente a distintos tratamientos químicos	106
5.7.1- Tratamiento con álkali	106
5.7.2- Precipitación con cloruro de litio	106
5.7.3- Precipitación con etanol	106
6- Purificación del inhibidor	108
7- Determinación del tamaño del inhibidor	109
<b><u>DISCUSION</u></b>	110
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	116
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	117

## INTRODUCCION

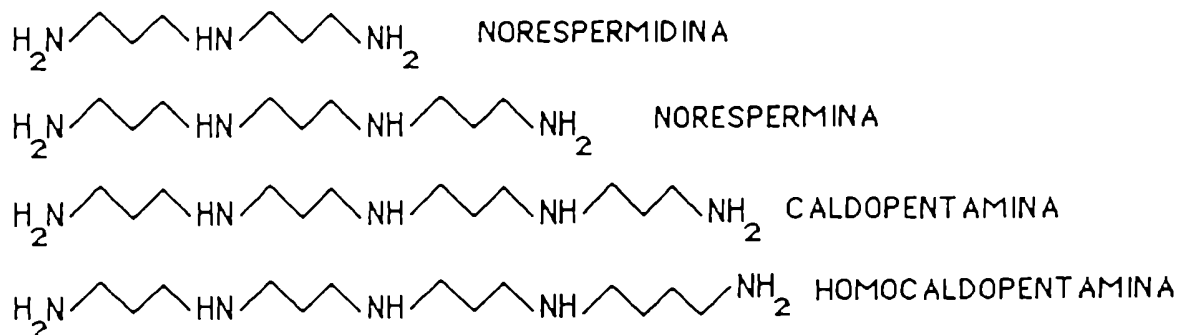
## POLIAMINAS

### 1- ESTRUCTURA Y FUNCION:

Las poliaminas son bases orgánicas que se encuentran en concentraciones apreciables en las células vivas. Estas sustancias se comportan como fuertes cationes a pH fisiológico. Junto con magnesio son los principales cationes de las células vivas. Las poliaminas más comunes son putrescina, espermidina y espermina:



En la naturaleza existen otras poliaminas conocidas como "no comunes", que están asociadas en muchos casos a organismos que deben adaptarse a condiciones extremas del medio ambiente. Algunas de estas poliaminas fueron descubiertas por primera vez en bacterias termófilas (1), como la norespermidina (caldina), la norespermina (termina), la caldopentamina y la homocaldopentamina:



Estos compuestos son aparentemente sintetizados cuando los microorganismos crecen a altas temperaturas, y son esenciales para estabilizar distintas macromoléculas, y también se requieren para aumentar la fidelidad de la síntesis proteica.

La hidroxiputrescina y la hidroxiespermidina, que fueron aisladas de *Pseudomonas* sp., cumplen también un rol importante en la traducción pues estabilizan la estructura de los ribosomas (2).

La cadaverina (1,5-diaminopentano) y la aminopropil-cadaverina han sido identificadas en diversos organismos, como por ejemplo *Escherichia coli* y *Neurospora crassa* (3).

En plantas se han encontrado concentraciones elevadas de cadaverina, pero en muchos casos su función aún se desconoce.

En cultivares de alfalfa tolerantes a déficit de agua (4) , y cultivares de algodón tolerantes a altas temperaturas se observa una gran acumulación de noespermidina y noespermina cuando son sometidos a esas condiciones adversas (5).

Generalmente estas poliaminas se encuentran en su forma libre, pero también se los puede hallar como derivados acetilados; los ejemplos más importantes son:

N<sup>1</sup>-acetilespermidina  
N<sup>8</sup>-acetilespermidina  
N<sup>1</sup>-acetilputrescina  
N<sup>1</sup>-N<sup>12</sup>-diacetilespermina

La naturaleza anfipática de las poliaminas les permite redistribuirse en medios hidrofóbicos e hidrofílicos. Además poseen una gran flexibilidad estructural, que les permite realizar asociaciones específicas con estructuras de distinta estereoquímica presentes en proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas (6,7).

Algunas poliaminas, o derivados de ellas, forman parte de las estructuras de varios antibióticos. Los ejemplos más notables son:

a) Los aminoglucósidos bleomicina A5 Y A6 (8). Estos antibióticos han sido usados en enfermedades neoplásicas como linfoma de Hodgkins, tumores de testículos y carcinomas de piel y cuello.

b) Las edeínas A y B, que son oligopéptidos lineales conjugados a espermidina (edeína A) o a guanidilespermidina (edeína B), fueron aislados y caracterizados en *Bacillus brevis*. Numerosos estudios han demostrado que estos compuestos bloquean la síntesis de proteínas a nivel de iniciación tanto en procariontas como en eucariotas (9).

Las poliaminas juegan un rol fundamental en diversos procesos celulares tanto en procariotas como en eucariotas. Se ha demostrado la importancia de las poliaminas en procesos tales como el crecimiento y la proliferación de células animales (10), la diferenciación celular (11), la fisiología del sistema nervioso (12), la proliferación tumoral (13), modulación hormonal (14), resistencia a stress (15), etc.

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

## 2- LOCALIZACION INTRACELULAR:

Hasta el momento no ha sido posible determinar cuál es la localización intracelular de estas sustancias polibásicas debido a que cuando una célula se rompe, estos compuestos fuertemente cargados se unen a diversas estructuras celulares, sufriendo una redistribución durante la manipulación.

Estudios recientes empleando resonancia magnética nuclear *in vivo* en E.coli demuestran que la putrescina se encuentra asociada a macromoléculas, probablemente ribosomas y/o fracciones que contienen membranas (16).

En los últimos años, una serie de estudios en el hongo N.crassa han demostrado que las poliaminas se encuentran compartimentalizadas. En este organismo, tanto la putrescina como la ornitina -su precursor en la vía de biosíntesis- se encuentran en vacuolas (17,18).

Hasta el momento no se ha demostrado compartimentalización en ningún otro organismo.

## 3- POLIAMINAS EN BACTERIAS:

Gran número de experimentos llevados a cabo principalmente con mutantes bacterianas auxótrofas para poliaminas, han indicado los roles esenciales de estos cationes orgánicos en distintos pasos de la replicación (19) y superenrollamiento del DNA, en la transcripción y procesamiento del RNA (20), y en la síntesis de proteínas (21,22,23, 24,25,26).

El aislamiento de mutantes de E.coli que no pueden sintetizar poliaminas ha permitido investigar *in vivo* e *in vitro* los efectos del ayuno intracelular de poliaminas, y su consecuente restauración a los niveles normales.

Estudios previos del laboratorio han demostrado que bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas contienen alta proporción de subunidades ribosomales defectivas con un coeficiente de sedimentación menor que 30 S, una menor afinidad por las partículas 50 S, y una menor actividad en la síntesis de proteínas (22).

Las bacterias Gram negativas como E.coli poseen altas concentraciones de poliaminas(27). La concentración intracelular de putrescina es aproximadamente 0,02 M, y la de espermidina 0,06M (28,29,30); niveles comparables a la concentración intracelular de magnesio (31).

Se conoce la existencia de un sistema de transporte activo que es común para putrescina y espermidina (28). También se han descrito otros dos sistemas de transporte exclusivos para putrescina.

#### 4- METABOLISMO DE POLIAMINAS EN BACTERIAS:

En la figura A pueden observarse los caminos biosintéticos de las poliaminas en microorganismos, plantas y organismos superiores.

La mayoría de las bacterias produce solamente putrescina y espermidina, siendo incapaces de sintetizar espermina.

La putrescina es sintetizada por dos vías alternativas, a partir de ornitina o de arginina:

1) Por decarboxilación de la ornitina catalizada por la enzima ornitina decarboxilasa.

2) Por la acción de la enzima arginina decarboxilasa sobre la arginina se produce agmatina, que sufre luego eliminación de urea, mediada por la agmatinasa.

La putrescina se transforma luego en espermidina por acción de la espermidina sintetasa, que transfiere a la putrescina un grupo 3-amino propilo. El compuesto dador es la S-adenosil metionina decarboxilada, que se sintetiza por acción de la enzima S-adenosil metionina decarboxilasa.



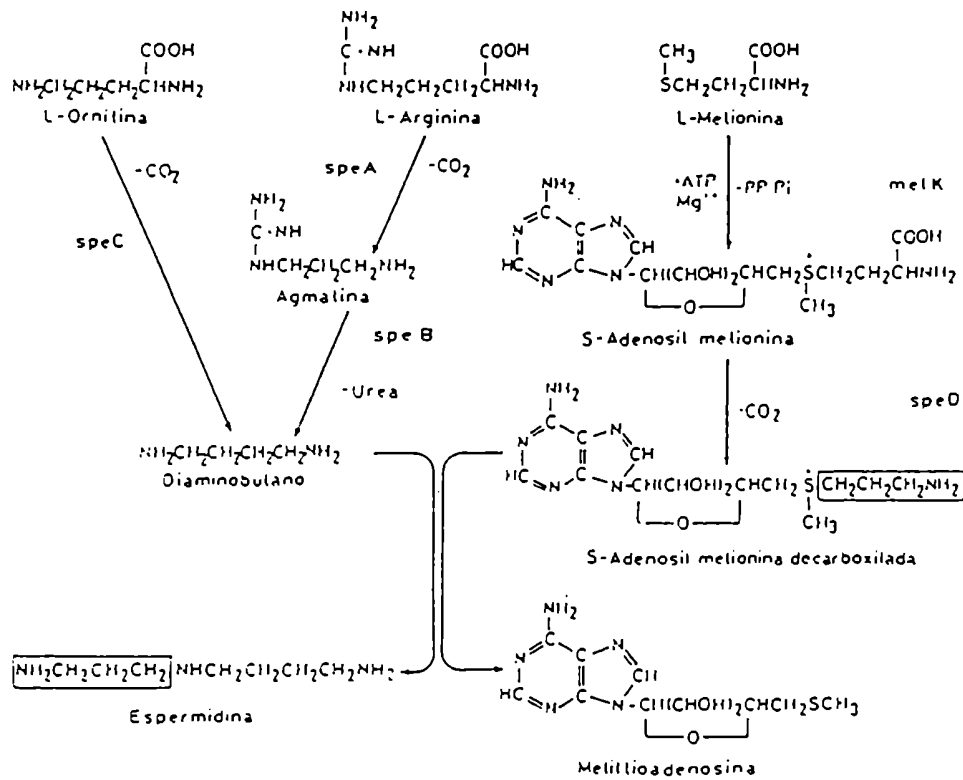


FIGURA A

## ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS

Son un grupo de compuestos con actividad bactericida que contienen un grupo inositol sustituido con uno o dos grupos amino o guanidino y varios azúcares (32).

Pertenecen a este grupo la gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina, estreptomicina y neomicina (figura B). Son policationes, cuya polaridad es en parte responsable por las propiedades farmacocinéticas compartidas por los miembros de este grupo de antibióticos.

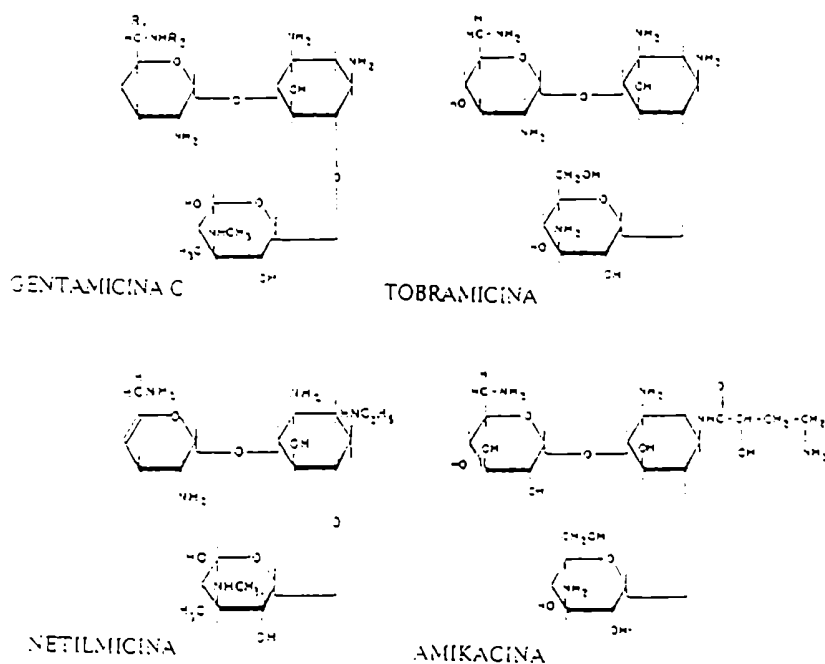
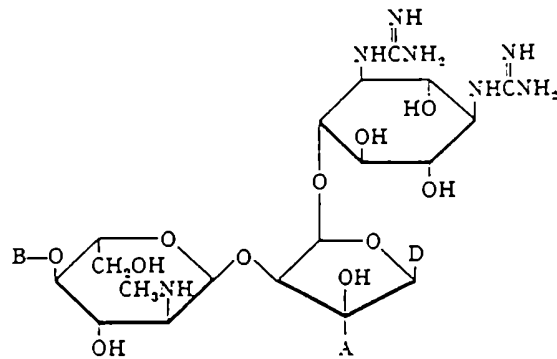


FIGURA B

La estreptomicina es el miembro más caracterizado. Este antibiótico fue aislado por primera vez de Streptomyces Griseus por Schatz, Bugie y Waksman en 1944. La estructura de la estreptomicina y sus derivados se observa en la figura C:



	A	B	D
Estreptomicina	CHO	H	CH <sub>3</sub>
Dihidroestreptomicina	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>3</sub>
Manósidoestreptomicina	CHO	*	CH <sub>3</sub>
Hidroxiestreptomicina	CHO	H	CH <sub>2</sub> OH

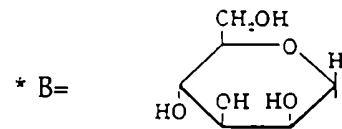


FIGURA C

El mecanismo de acción de este antibiótico ha sido extensivamente estudiado desde su descubrimiento. Sus efectos son pleiotrópicos: bloqueo ribosomal, errores de traducción, daño en la membrana, captación irreversible del antibiótico, bloqueo de secreción de proteínas a través de membrana, alteración en la síntesis de RNA y de DNA como consecuencia de la inhibición de la síntesis proteica.

El mecanismo de acción puede resumirse de la siguiente forma(33):

1) Una pequeña cantidad de antibiótico penetra en la célula por un mecanismo desconocido. La estreptomicina entra en contacto con

ribosomas que se encuentran elongando cadenas polipeptídicas provocando errores de lectura en la traducción.

2) Algunas de las proteínas defectuosas producidas en presencia del antibiótico se incorporan a membrana creando canales que permiten la entrada del antibiótico. Se inicia entonces un proceso autocatalítico de aumento de influjo, errores de traducción y formación de canales.

3) El antibiótico intracelular alcanza una concentración tan elevada que bloquea la síntesis proteica.

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

### ERRORES Y ALTERNATIVAS DE LECTURA DEL CODIGO GENETICO

Para que una célula funcione correctamente, cada paso del flujo de información de DNA a proteína debe ocurrir con una fidelidad razonable.

Durante la replicación del DNA el nivel de error es del rango de  $10^{-8}$  -  $10^{-11}$  (34,35). El nivel de errores de transcripción *in vivo* es del orden de  $10^{-4}$  (36). Este proceso es menos preciso que la replicación de DNA.

Los errores de traducción ocurren a frecuencias de  $5 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-5}$  y son el resultado de errores de acilación (tRNA cargado erróneamente), o de errores de lectura (errores en la unión codón-anticodón).

La sustitución de aminoácidos en la síntesis proteica es difícil de detectar pues la proteína aberrante tiene esencialmente el mismo tamaño y composición de aminoácidos que la proteína nativa.

Los errores pueden ser detectados más fácilmente si la sustitución involucra un aminoácido que no es componente normal de la proteína, o si la incorporación errónea cambia su comportamiento electroforético.

Luego de la detección del error de traducción es necesario determinar si se trata de un error de lectura o de una acilación errónea. Estas determinaciones también excluyen errores de transcripción.

## 1- Acilación errónea:

Involucra aminoácidos que están estructuralmente relacionados (37), pero sus codones pueden no estarlo.

Las aminoacil tRNA sintetetas reconocen sus sustratos con alta precisión, y muchas veces tienen uno o más pasos de prueba de lectura (37), sin embargo, los errores involucrando aminoácidos muy relacionados pueden ocurrir con una frecuencia de  $4 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-5}$  (38,39).

## 2- Errores de lectura:

En base a mediciones *in vitro*, Woese (40) predijo que la mayoría de los errores de lectura ocurren en la tercer posición del codón. Al ser esta posición la más degenerada, la mayoría de los errores no llevan a una sustitución de aminoácidos (41). Sin embargo, es ampliamente conocido que en determinadas proteínas ciertos errores de lectura que provocan una sustitución de aminoácidos ocurren con alta frecuencia. Se ha comprobado que la naturaleza del codón y el contexto del mismo ejercen una gran influencia sobre la frecuencia de incorporación errónea.

### 2.1 Errores de terminación:

En el código genético, los codones UAA, UAG y UGA son usados como señales de terminación de la traducción. Sin embargo si un tRNA lee un codón de terminación como un codón con sentido, se produce una supresión natural.

Se conocen ejemplos de supresión tanto en procariotas como en eucariotas (42). En algunos casos no se trata de un simple error sino que la proteína que se forma como consecuencia de esta supresión cumple una función esencial en el organismo en cuestión. En estos casos se habla de errores de traducción programados.

### 2.2 Cambios de marco de lectura:

Para un típico mRNA, es crítico que el marco de lectura se mantenga hasta que se alcance el codón de terminación; por lo tanto, cada

evento de traslocación debe ser de tres bases. Los cambios de marco de lectura más simples son traslocaciones de dos o cuatro bases. Este tipo de errores ocasiona que la actividad, el tamaño y la estabilidad de la proteína aberrante producida guarden poca homología con el producto normal. Generalmente la proteína que se produce es inactiva y más corta que la nativa porque los codones de terminación son abundantes en los marcos de lectura alternativos. Sin embargo se han descrito casos en los que este tipo de errores son programados, permitiendo la producción de proteínas alternativas que desempeñan alguna función. La mayoría de los ejemplos de cambios de marco de lectura programados ocurren en genes virales.

### POLIAMINAS , FIDELIDAD DE TRADUCCION Y ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS

El contenido endógeno de poliaminas de mutantes de E.coli parece modular la acción de antibióticos aminoglucósidos en la síntesis de polipéptidos *in vivo* e *in vitro*. Trabajando con bacterias auxótrofas para poliaminas desarrolladas en presencia o ausencia de putrescina, en el presente estudio hemos observado que la estreptomycinina causa una marcada inhibición de la síntesis de proteínas en las células suplementadas con poliaminas, mientras que las bacterias sin poliaminas se comportan como fenotípicamente resistentes al antibiótico.

Las poliaminas tienen efecto sobre la fidelidad de la síntesis proteica, sin embargo la mayor parte de los estudios realizados hasta ahora han sido *in vitro*, y no hay acuerdo en que las poliaminas aumenten o disminuyan la fidelidad de la traducción *in vivo*.

### SISTEMA UTILIZADO EN LA PRESENTE INVESTIGACION:

Para estudiar si los bajos niveles endógenos de poliaminas pueden alterar la fidelidad de traducción, se utilizó un sistema de bacterias infectadas por el bacteriófago MS2 o alternativamente por el fago QB. En el presente estudio se analizaron por electroforesis en geles mono y bidimensionales las proteínas sintetizadas en condiciones normales y en presencia de antibióticos aminoglucósidos, que inducen una disminución de la fidelidad de traducción.

Se utilizó una cepa mutante de E.coli llamada LM27, sensible a estreptomycinina y a los fagos MS2 y QB, que posee una mutación

puntual en el gen que codifica para la enzima ornitina decarboxilasa, y otra en el gen que codifica para la enzima agmatina ureohidrolasa; por lo tanto no puede sintetizar poliaminas (figura B), y requiere estas sustancias para su óptimo crecimiento. Se estudió la síntesis de proteínas del fago cuando las bacterias se cultivaban en ausencia o presencia de poliaminas. El error de traducción se determinó por aparición de una variante básica de la proteína de la cápside del bacteriófago MS2, en la cual se conoce que se incorpora erróneamente lisina en lugar de asparagina.

### 1- Características estructurales del fago MS2:

Este virus es miembro de un grupo de fagos a RNA (43). Su genoma es una molécula de RNA de  $1 \times 10^6$  Daltons, que codifica para cuatro polipéptidos:

PROTEINA DE LA CAPSIDE: 14.700 Daltons

PROTEINA A: 38.000 D

PROTEINA DE LISIS: 11.000 D

UNA SUBUNIDAD DE LA RNA REPLICASA: 62.000 D

La proteína de la cápside, la proteína A y la proteína de lisis son componentes estructurales del fago.

La ubicación de los cistrones correspondientes a lo largo del RNA del MS2 se observa en la figura D : La cadena empieza con una Guanina, seguida de una larga secuencia no codificante de 129 nucleótidos. El cistrón A, que comienza con el codón de iniciación GUG, codifica para la proteína A. Es seguido por una región no codificante de 23 residuos de largo . La siguiente secuencia codificante corresponde al cistrón C, que codifica para la proteína de la cápside. El cistrón S, que codifica para una subunidad de la RNA replicasa, está separado del cistrón C por 36 nucleótidos.

Existe otro polipéptido codificado por el fago: la proteína de lisis, cuya secuencia codificante se superpone en un marco de lectura distinto con el extremo 3' del gen de la proteína de la cápside, y con el 5' del gen de la replicasa. El marco de lectura del cistrón L está en +1 con respecto al de los otros cistrones.

La existencia de superposición de secuencias codificantes permite economizar espacio.

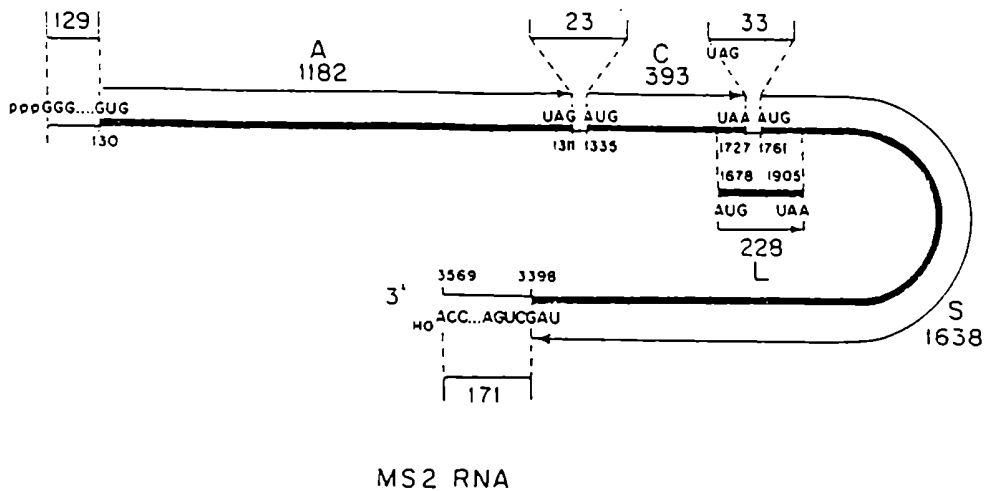


FIGURA D

2- Errores de traducción en células infectadas con el bacteriófago MS2:

El pequeño tamaño del genoma de este fago brinda un sistema simple para estudiar la traducción de un mensajero policistrónico. El agregado de rifampicina a este sistema permite inhibir la síntesis proteica de la bacteria huésped y seguir exclusivamente la formación de las proteínas del fago. En estas condiciones más del 90% de la síntesis proteica corresponde a la proteína de la cápside. Esta proteína contiene diez residuos de Asn y seis de Lys (figura 4). Observaciones experimentales han demostrado que los codones de Asn de esta proteína son leídos erróneamente con una frecuencia diez veces mayor que la esperada (44), incorporándose lisina en su lugar. Esto puede explicarse debido a que ciertos codones o codones con ciertos nucleótidos vecinos pueden leerse erróneamente con



mayor frecuencia que otros. La fuerza de las interacciones codón-anticodón ciertamente varían (45) .

El aminoácido Asn está codificado por los codones AAC y AAU. Se ha demostrado que el codón AAU une a su anticodón con menor afinidad que el AAC, y es por lo tanto leído erróneamente con mayor probabilidad.

La figura E muestra la secuencia de bases que codifica para la proteína de la cápside (46)

```

(G)  AUA GAG CCC UCA ACC GGA GUU UGA AGC AUG
GCU UCU AAC UUU ACU CAG UUC GUU CUC GUC GAC AAU GGC GGA ACU GGC GAC GUG ACU GUC GCC CCA AGC AAC UUC
Ala Ser Asn Phe Thr          5          10          15          20          25
1
GCU AAC GGG GUC GCU GAA UGG AUC AGC UCU AAC UCG CGU UCA CAG GCU UAC AAA GUA ACC UGU AGC GUU CGU CAG
Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val Arg Gln
          30          35          40          45          50
AGC UCU GCG CAG AAU CGC AAA UAC ACC AUC AAA GUC GAG GUG CCU AAA GUG GCA ACC CAG ACU GUU GGU GGU GUA
Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val
          55          60          65          70          75
GAG CUU CCU GUA GCC GCA UGG CGU UCG UAC UUA AAU AUG GAA CUA ACC AUU CCA AUU UUC GCU ACC AAU UCC GAC
Glu Leu Pro Val Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala Thr Asn Ser Asp
          80          85          90          95          100
UGC GAG CUU AUU GUU AAG GCA AUG CAA GGU CUC CUA AAA GAU GGA AAC CCU AUU CCC UCA GCA AUC GCA GCA AAC
Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ile Ala Ile Ala Ala Asn
          105          110          115          120          125
UCC GGC AUC UAG UAA UAG ACG CCG GCC AUU CAA ACA UGA GGA UUA CCC AUG UCG AAG ACA ACA AAG AAG (U)
Ser Gly Ile Tyr          129          1          5

```

FIGURA E

### 3- Características estructurales del fago Q $\beta$

Sus características físicas son muy similares a las del bacteriófago MS2; sin embargo ambos virus pueden ser distinguidos serológicamente, y el RNA del fago Q $\beta$  es aproximadamente 15% más largo que el del MS2 (47).

El producto principal de la traducción de este fago es la proteína de la cápside (16,6 kDa). El virión contiene 180 moléculas de esta proteína y una molécula de la proteína A (40 kDa). Tiene además una cantidad variable de la proteína de lisis (36 kDa), que se sintetiza por un error en la lectura del codón de terminación UGA del gen de la proteína de la cápside.

#### 4- Inhibición de la síntesis proteica del huésped

Dado que las proteínas virales específicas constituyen sólo un pequeño porcentaje del total de las proteínas sintetizadas en células infectadas, hemos bloqueado la traducción de la bacteria huésped inhibiendo la síntesis de RNA dependiente de DNA con rifampicina.

A pesar de que este método ha sido ampliamente utilizado para disminuir la síntesis de proteínas del huésped, hemos observado que los niveles de rifampicina utilizados para disminuir la síntesis proteica bacteriana, causan al mismo tiempo una fuerte inhibición de la producción de fagos. Por otro lado la rifampicina es obviamente inefectiva cuando se utilizan bacterias mutantes resistentes al antibiótico.

En el presente trabajo describimos un método alternativo diseñado para evitar los inconvenientes mencionados.

## OBJETIVOS:

Las poliaminas tienen efecto sobre la fidelidad de síntesis proteica, sin embargo la mayor parte de los estudios han sido *in vitro* y no hay acuerdo en que las poliaminas aumenten o disminuyan la fidelidad de traducción *in vivo*.

Se propuso entonces investigar la importancia y el rol de las poliaminas en la síntesis proteica de acuerdo con los siguientes objetivos:

- 1) Determinar de qué manera las poliaminas afectan la fidelidad de traducción *in vivo*.
- 2) Analizar la influencia de las poliaminas en la acción de la estreptomicina.
- 3) Poner a punto un método alternativo a la rifampicina para lograr la inhibición de la transcripción bacteriana sin que se afecte muy drásticamente el rendimiento de fagos.

## MATERIALES Y METODOS

### CEPAS BACTERIANAS:

Se utilizaron las siguientes cepas:

- E.coli LM27 [spe B spe C thr leu thi rpsL<sup>+</sup>]. Esta cepa es sensible a los bacteriófagos MS2 y Q $\beta$  (48).
- E.coli BGA85 [spe B spe C thr leu thi rpo B].

### MEDIOS DE CULTIVO:

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

#### a) Medio Tye:

Posee una composición en gr/l de: Bactotripton, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5.

#### b) Medio MOPS:

Su composición cada 100 ml es: Buffer MOPS, 8,37 gr; tricina, 0,72 gr; KCl, 3,73 gr; NH<sub>4</sub> Cl, 0,53; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>K, 0,027 gr; SO<sub>4</sub>Mg x 7 H<sub>2</sub>O, 0,123 gr; Cl<sub>3</sub>Fe x 6 H<sub>2</sub>O, 0,027 gr.

Cuando el medio se suplementa con putrescina, la concentración final es de 0,01 gr/100 ml.

### REACTIVOS RADIOACTIVOS:

Se utilizó metionina S<sup>35</sup>.

### AYUNO DE POLIAMINAS:

Se inoculan 5 ml de medio Tye con E.coli LM27 a partir de una estría, y se cultiva durante la noche a 37°C con agitación. Se hace una dilución 1/400 del cultivo original en medio MOPS libre de poliaminas. Se incuba en iguales condiciones a las descritas previamente durante 15 hs.

El cultivo se conserva en la heladera y puede servir como inóculo para distintos experimentos por varias semanas.

### CURVAS DE CRECIMIENTO:

El desarrollo de los cultivos se sigue por absorbancia a una longitud de onda de 490 nm graficando el logaritmo de la absorbancia vs tiempo. El tiempo de generación es el período necesario para que la absorbancia se duplique.

### INFECCION CON VIRUS Y MARCACION DE PROTEINAS:

Se cultivan las bacterias aeróbicamente a 37°C con agitación en medio MOPS en presencia o ausencia de poliaminas. Al llegar a una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml (O.D 490 = 0,40), se infecta con el virus MS2 a una multiplicidad de infección de 10 partículas virales por bacteria. Posteriormente se agrega rifampicina para inhibir la síntesis proteica del huésped, y en algunos casos estreptomycinina para aumentar los errores de traducción. Luego de 20 min. se agrega met  $S^{35}$  (50  $\mu$ Ci/ml, 0,6  $\mu$ M). Se continua la incubación por 30 min. y después se enfría el cultivo a 0°C.

### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

Se toman alícuotas de 20  $\mu$ l de suspensión de bacterias para medir marca insoluble en TCA 10%. Se centrifugan las muestras durante 15 min en tubos Eppendorf separando los sobrenadantes, de los que se toman 10  $\mu$ l para medir radioactividad insoluble con TCA 10%. Los precipitados de bacterias se resuspenden en 40  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris 2mM pH 7,5; MgAc<sub>2</sub> 1 mM; RNasa 80  $\mu$ g/ml; DNasa 80  $\mu$ g/ml). Se congela y descongela seis veces. Luego se toman alícuotas de 2  $\mu$ l para medir radioactividad insoluble en TCA 10% (48). Se determina la radioactividad incorporada con un contador de centelleo líquido utilizando tolueno-PPO dimetil POPOP como mezcla centelleadora (49).

### MEDICION DE RADIOACTIVIDAD INSOLUBLE:

Las alícuotas correspondientes se diluyen en 1 ml de agua que contiene metionina fría y 100  $\mu$ g de albumina. Luego se agrega NaOH hasta una concentración final de 0,5 M, se incuba 15 min. a

30°C y se precipita agregando TCA hasta concentración final 10%. Se deja 30 min. a 0°C, se filtra a través de papel de vidrio, se lava con TCA 10%. Se determina la radioactividad incorporada con un contador de centelleo líquido utilizando tolueno-PPO dimetil POPOP como mezcla centelleadora (49).

## ELECTROFORESIS DE PROTEINAS MARCADAS:

### Electroforesis monodimensional:

Se hierven las bacterias durante 3 min en 50  $\mu$ l de cracking buffer (50) (50mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 2% 2-mercaptoetanol; 6 M urea; 20% glicerol). Los extractos obtenidos se analizan por electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida 18% en presencia de SDS y urea 6 M (51). La electroforesis se desarrolla durante 17 hs. a 8 mA. Los geles se tiñen con Coomassie Brilliant Blue R250, se decoloran con 20% metanol-7,5% ácido ascético; se lavan varias veces con agua, se secan al vacío sobre papel Wathman 3 MM y se exponen en contacto con placas radiográficas a -70°C.

### Electroforesis bidimensional:

#### *Primera dimensión: Isoelectroenfoque:*

Se realiza empleando el método de electroforesis en gradiente de pH sin equilibrio (NEPHGE) (52) en tubos de vidrio de 12 cm de largo por 3 mm de diámetro. Los geles contienen acrilamida 28,8%; bisacrilamida 1,62%; 9,3 M urea; 2% Nodinet P40 (NP40); 1,6% anfolitos pH 7-10 ; 0,4% anfolitos pH 3-10; persulfato de amonio 10%; TEMED, 0,13%.

Se dejan polimerizar los geles durante 2 hs. La electroforesis se realiza llenando el reservorio inferior de la cuba con NaOH 0,02 M y el superior con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M. Las muestras se colocan disueltas en una solución que contiene urea 8,5 M y anfolitos, y se cubren con una solución que contiene urea 7 M y 1% de anfolitos para evitar que entre en contacto con el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

El ánodo se conecta al compartimiento superior de la cuba. Se desarrolla la electroforesis durante 3hs 30 min a 400 volts.

### *Segunda dimensión:*

Luego de la primera dimensión se recuperan los geles y se realiza la equilibración en 5 ml de buffer de muestra con SDS ( glicerol 10% (p/v); mercaptoetanol 5% (v/v); SDS 2,3% (p/v); Tris-HCl 0,0625 M; pH 6,8), y se agita a temperatura ambiente durante 30 min.

Luego se colocan los geles de la primera dimensión en posición horizontal sobre el gel polimerizado de segunda dimensión, y se desarrolla la misma como se explicó para los geles monodimensionales.

En esta segunda etapa las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular por una electroforesis con dodecil sulfato de sodio.

### PRODUCCION DE FAGOS:

Se cultivan las bacterias aeróbicamente a 37°C con agitación. Cuando el cultivo llega a una absorbancia de 0,40 medida a 490 nm se toma 1 ml de cultivo y se infecta con 10  $\mu$ l de una suspensión viral ( $2.10^{11}$  pfu/ml) (53). Se continua la incubación durante 3-5 hs y se agregan 0,05 ml de cloroformo para completar la lisis. Se guarda el lisado en la heladera hasta el dosaje.

### DOSAJE DE FAGOS:

Se cultiva la bacteria E.coli Hfr3000 (sensible a los bacteriófagos MS2 y Q $\beta$ ) en medio TYE en presencia de calcio.

Se hacen diluciones de las suspensiones de virus en un medio cuya composición cada 100 ml es la siguiente: NaCl, 0,9 gr; CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,022 gr. Estas diluciones se mezclan con una alícuota de un cultivo fresco de bacterias y agar fundido y se vuelca sobre una capa de agar nutritivo contenida en cajas de petri. Se incuba durante 16 hs a 37°C, luego se cuentan las placas de lisis.

### INHIBICION DE LA SINTESIS PROTEICA DE LA BACTERIA HUESPED:

Para bloquear la síntesis de proteínas de la bacteria huésped se inhibe su transcripción por alguno de los siguientes métodos:

A) Rifampicina como inhibidor de síntesis proteica bacteriana:



Diez minutos después de la infección se agrega rifampicina a los cultivos hasta la concentración indicada en cada caso y se continua la incubación.

B) Actinomicina D como inhibidor de síntesis proteica bacteriana:

La AMD y otros nucleótidos pueden ser tomados por células de E.coli sólo luego de un tratamiento de permeabilización (54,55). Diez minutos después de la infección , se centrifugan 20 ml de cultivo a temperatura ambiente por 10 min. a 10000 xg. Las células se lavan con solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8 - sacarosa 0,35 M. Se resuspenden luego en 0,45 ml de la misma solución.

Las bacterias se permeabilizan a actinomicina D después de agregar EDTA a 0,7 mM e incubarlas durante 3 min. a 37°C. Inmediatamente se agrega 2,3 ml del medio sintético ya descrito y actinomicina D hasta una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml, continuándose luego el desarrollo del cultivo.

#### SINTESIS DE RNA:

La transcripción in vivo en las bacterias sin infectar o infectadas y tratadas con rifampicina o EDTA + actinomicina D se sigue por agregado de uracilo C<sup>14</sup> (1  $\mu$ Ci/ml, 42  $\mu$ M) en presencia de citosina 0,4 mM y precipitación del RNA marcado con TCA 20% en frío en alícuotas incubadas en las condiciones descriptas para cada caso.

## 1- POLIAMINAS Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

En el presente estudio se utilizó una cepa mutante de *E. coli* llamada LM27, que no puede sintetizar poliaminas, pero requiere estos compuestos para su óptimo crecimiento. Como se observa en la figura 1, los cultivos sometidos a un ayuno de poliaminas crecen mucho más lentamente que aquéllos suplementados con putrescina. Sin embargo, si se agrega esta sustancia al cultivo, luego de una hora se restablece la velocidad normal de crecimiento.

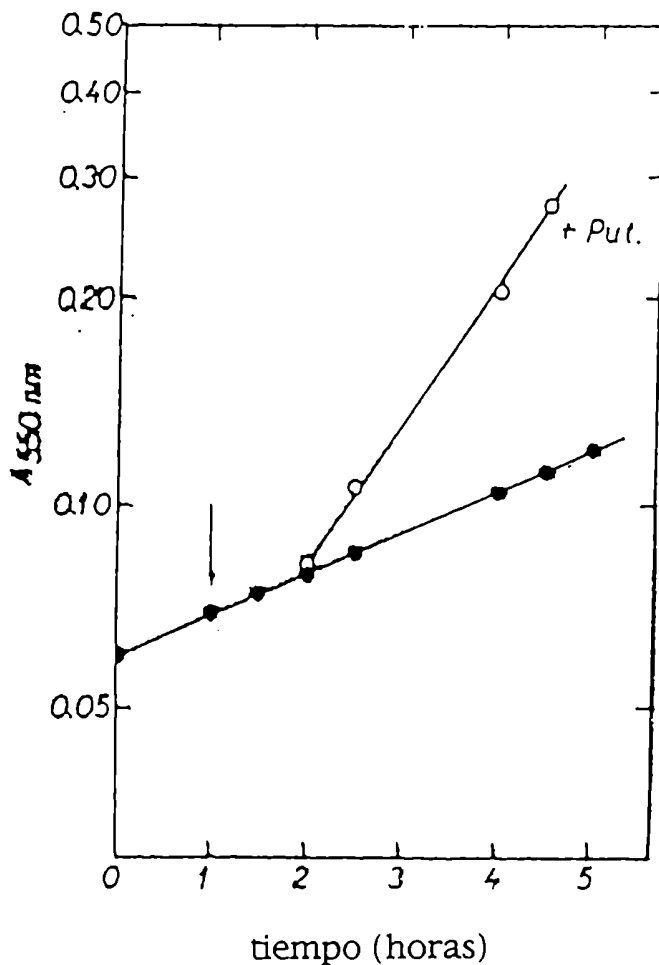


Figura 1: Influencia de las poliaminas en la velocidad de crecimiento de la cepa de *E. coli* LM27.

Se toman alícuotas a distintos tiempos de un cultivo no suplementado con poliaminas, en crecimiento exponencial, y se mide la absorbancia a 550 nm. La flecha indica el momento en que se agrega putrescina.

## 2- INHIBICION DE LA SINTESIS PROTEICA BACTERIANA

### 2.1- Efecto de la rifampicina sobre la síntesis proteica de la cepa LM27

Para determinar la concentración óptima de rifampicina necesaria para inhibir la síntesis proteica de la bacteria huésped se midió el efecto de distintas concentraciones de este antibiótico.

En la figura 2 se observa que en los primeros minutos luego del agregado de rifampicina la inhibición no es muy grande (aproximadamente 50%). Este experimento indica que se requiere un tiempo para que la rifampicina entre a la célula y actúe inhibiendo la síntesis proteica. 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  son suficientes para lograr una inhibición eficiente.

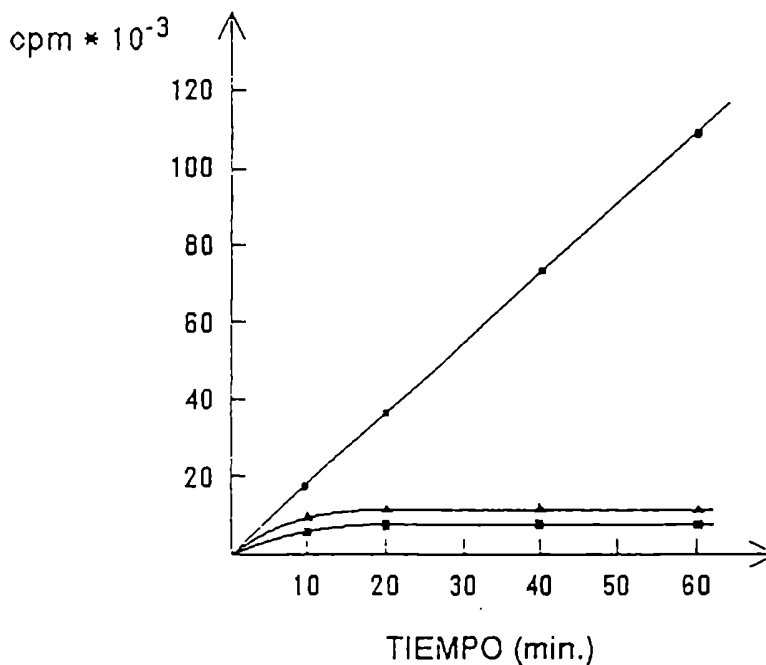


FIGURA 2: Efecto de la rifampicina sobre la síntesis proteica:

Se toman alícuotas a partir de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. coli* LM27, y se les agrega distintas concentraciones de rifampicina.

Inmediatamente se agrega met  $\text{S}^{35}$  ( $40\mu\text{M}$ ); se continúa la incubación y se toman muestras a distintos tiempos. Se mide incorporación de radioactividad en proteínas (insoluble en TCA 10%).

- Sin rifampicina
- ▲ Rifampicina 100ug/ml
- Rifampicina 200 o 300 ug/ml

## 2.2- Respuesta de la síntesis proteica de la bacteria huésped a la preincubación con rifampicina

En la figura 3 se observa que la actividad residual de los cultivos preincubados con rifampicina es significativamente menor que la de aquellos cultivos que no fueron preincubados con el antibiótico. También se observa que no hay mucha diferencia en los resultados con las tres dosis de rifampicina.

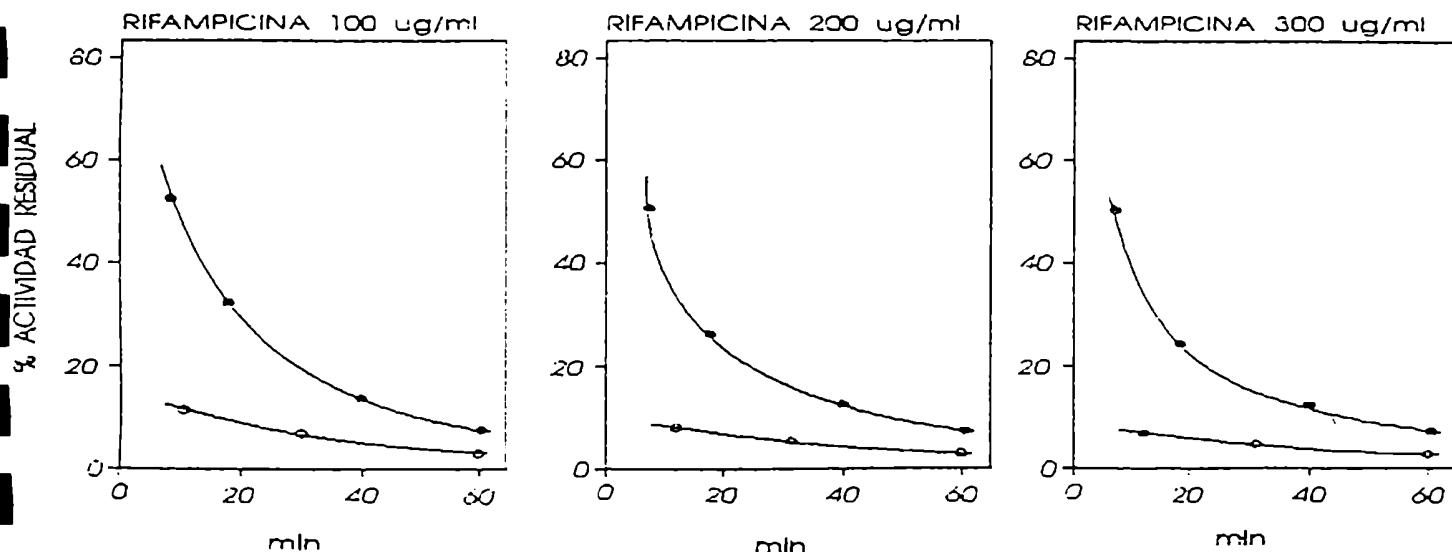
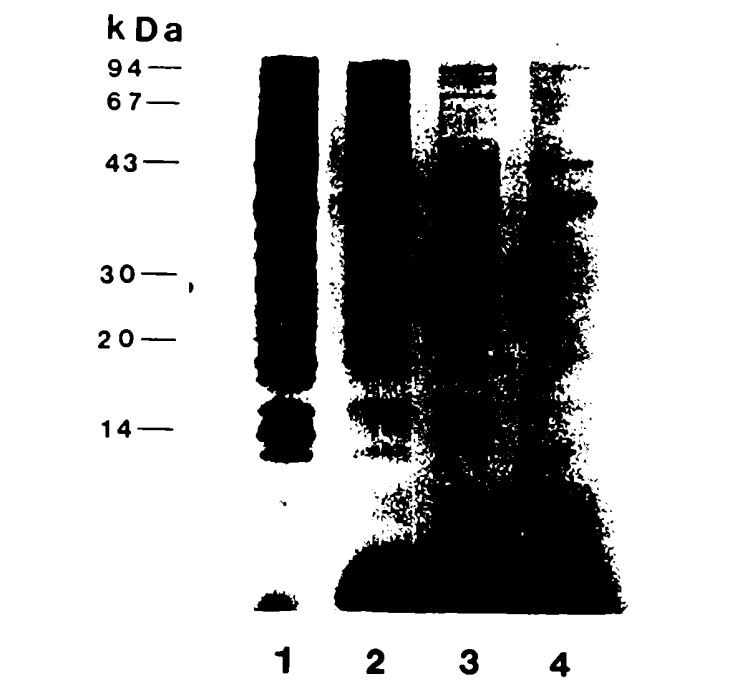


Figura 3: Efecto de la preincubación con rifampicina.

El experimento se realizó en forma análoga a la descrita en la figura 1. En algunos casos los cultivos fueron preincubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de rifampicina antes de agregar met  $S^{35}$  (●) sin preincubación; (○) preincubado 15 minutos.

### 2.3- Análisis por electroforesis de las proteínas bacterianas sintetizadas en presencia de distintas dosis de rifampicina

En la figura 4 se muestra que se requiere una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  de rifampicina para obtener una inhibición eficiente de la síntesis proteica bacteriana (aproximadamente 99%).



**Figura 4:** Efecto de rifampicina sobre la síntesis proteica bacteriana. Se toman alícuotas a partir de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. coli* LM27 y se preincuba 20 min. con distintas concentraciones de rifampicina. Luego se marca con metionina  $\text{S}^{35}$  ( $25 \mu\text{Ci/ml}$ ) por 60 min. Se analizan los extractos bacterianos por SDS PAGE. Líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a 0, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$  de rifampicina respectivamente. A la izquierda se observa la posición de los marcadores de peso molecular.

## 2.4- Efecto de rifampicina sobre la producción de fagos

Para estudiar el efecto de distintas dosis de rifampicina sobre la producción de fagos, se realizó una cinética de producción viral en presencia o ausencia de rifampicina  $200\mu\text{g/ml}$ . Como se observa en la figura 5, la rifampicina ejerce un efecto inhibitorio de la producción viral, que disminuye aproximadamente en dos órdenes. No hay diferencias significativas entre cultivos suplementados o no con poliaminas.

Pese a que el uso de rifampicina inhibe el rendimiento de fagos, es necesario usar el antibiótico para eliminar gran parte de la síntesis proteica de la bacteria huésped para que se pueda evidenciar la del fago.

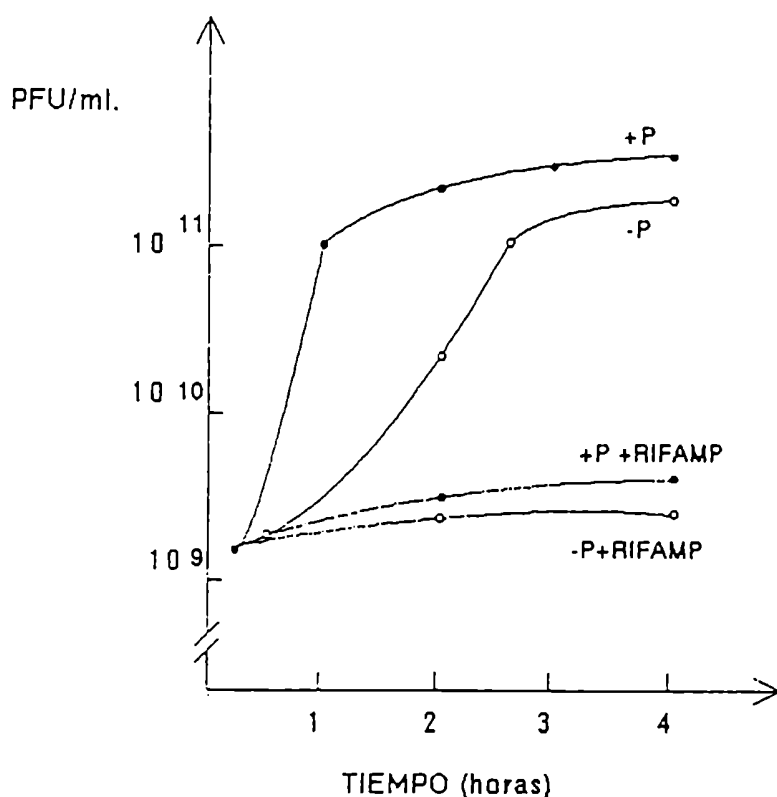


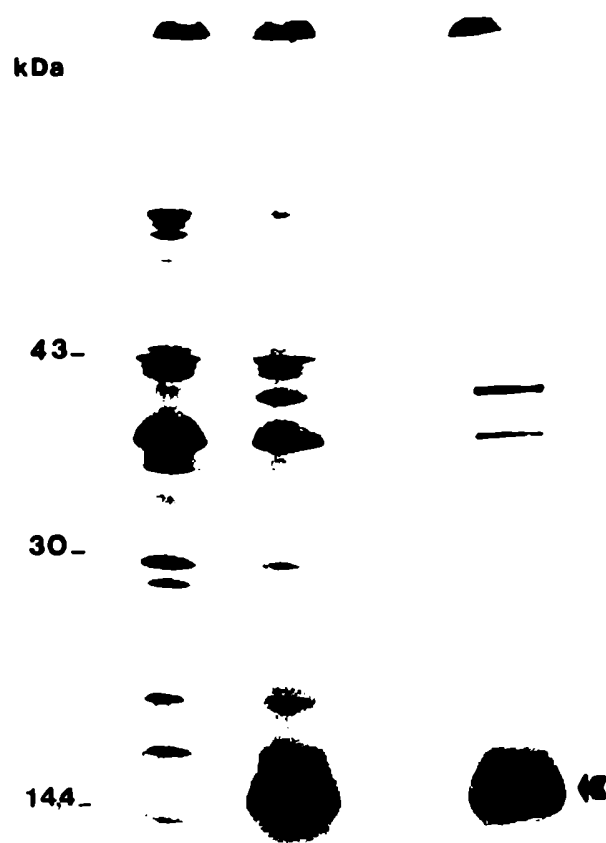
Figura 5: Efecto de rifampicina sobre la producción de fagos:

Se infectan cultivos de *E.coli* en crecimiento logarítmico con el bacteriófago MS2 ( m.o.i.=10). Se tratan o no los cultivos con rifampicina  $200\mu\text{g/ml}$ . A distintos tiempos postinfección se toman alícuotas del cultivo ( $10\mu\text{l}$ ), y se realiza el dosaje viral como se describe en materiales y métodos.

## 2.5- Análisis de las proteínas del fago MS2 por electroforesis

Se analizó el patrón electroforético de proteínas marcadas radioactivamente sintetizadas en bacterias *E.coli* LM27 sometidas o no a un ayuno de poliaminas antes y después de una infección con el bacteriófago MS2. Los cultivos fueron tratados con rifampicina 200  $\mu\text{g/ml}$  para inhibir la síntesis proteica de la bacteria huésped y poder evidenciar la del fago.

En la figura 6 se observan que los patrones que corresponden a bacterias infectadas muestran dos proteínas que están ausentes en extractos de células no infectadas. Estas bandas corresponden a la proteína de la cápside (14 kDa) y a la proteína viral de maduración A (42 kDa). El genoma del bacteriófago codifica también para la proteína de lisis y para la subunidad  $\beta$  de la RNA replicasa, pero estos productos no pueden ser detectados en nuestros experimentos porque usualmente se forman en muy pequeñas cantidades.



Se desarrollan cultivos de *E.coli* en ausencia (A y B) o presencia (C) de putrescina. Cuando los cultivos alcanzan una concentración de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml se infecta (B y C) con el bacteriófago MS2, y luego de 10 min. se agrega rifamp. 200  $\mu\text{g/ml}$ . Línea A corresponde a cultivos no infectados de *E.coli*.

La proteína de la cápside marcada aparece como una banda de 14 kDa.

Figura 6: SDS PAGE del análisis de proteínas sintetizadas en bacterias infectadas o no con el bacteriófago MS2.

### 3- EFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE LA FIDELIDAD DE TRADUCCION Y SOBRE LA ACCION DE ESTREPTOMICINA

#### 3.1- Síntesis de proteínas y velocidad de crecimiento en presencia de estreptomicina

Para determinar la concentración óptima de estreptomicina a utilizar en los experimentos posteriores, se realizó una cinética de síntesis proteica en presencia de distintas dosis del antibiótico, teniendo en cuenta que se debía elegir una concentración que no inhibiera totalmente el crecimiento bacteriano.

En las figuras 7 y 8 se observa que a muy bajas concentraciones de estreptomicina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ya se empieza a inhibir el crecimiento y la síntesis de proteínas de los cultivos que fueron suplementados con poliaminas. A 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ya hay una considerable inhibición, tanto en los cultivos suplementados con poliaminas como en aquéllos no suplementados con estas sustancias. Se eligió esta concentración para los estudios posteriores.

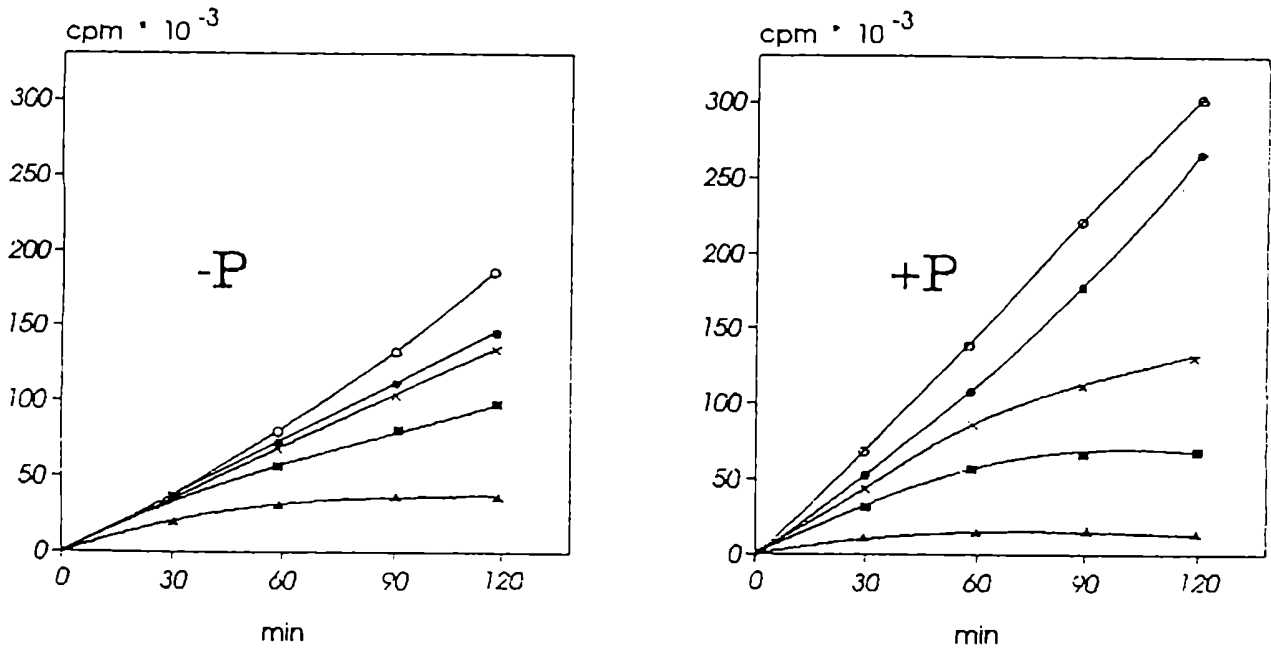
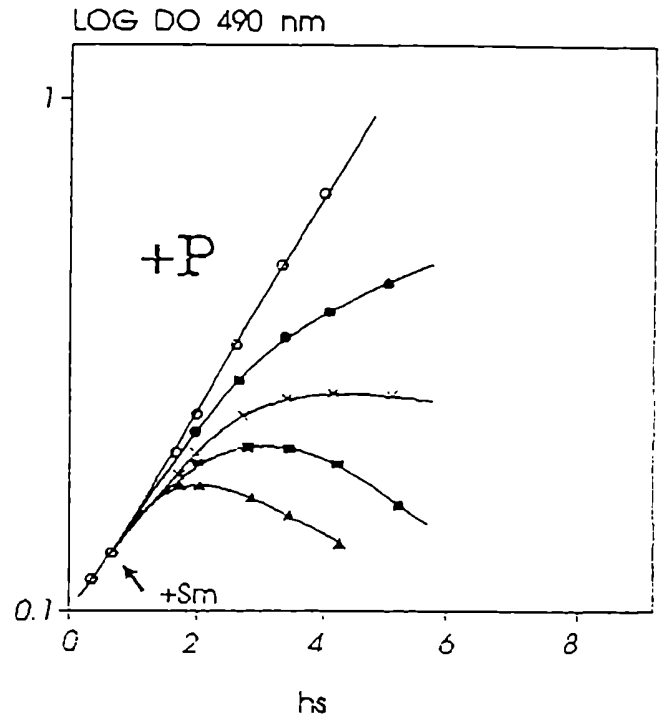
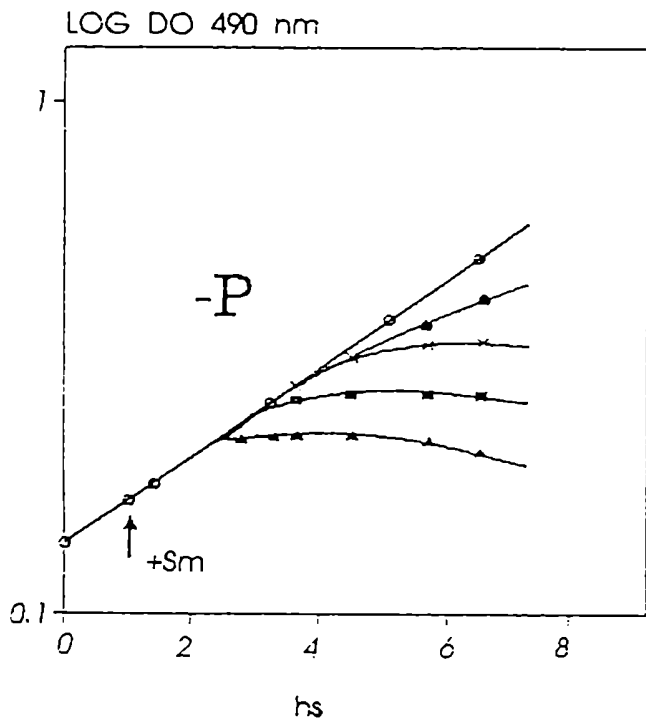


Figura 7: Síntesis de proteínas en presencia de estreptomicina.

Se cultivan las bacterias aeróbicamente a 37 °C. Cuando los cultivos llegan a una A<sub>490</sub> nm = 0,17 se agregan distintas dosis de estreptomicina. Luego se marca con met S<sup>35</sup> (40  $\mu\text{M}$ ). Se toman alícuotas a distintos tiempos y se mide incorporación de radioactividad en proteínas como describe en materiales y métodos.

- o sin estreptomicina
- estreptomicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- × estreptomicina 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- estreptomicina 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- ▲ estreptomicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$





- sin estreptomicina
- estreptomicina 5ug/ml
- × estreptomicina 7,5ug/ml
- estreptomicina 12,5ug/ml
- ▲ estreptomicina 25ug/ml

Figura 8: Velocidad de crecimiento en presencia de estreptomicina. Este experimento se realizó en forma análoga a la descrita en figura 7. Se midió la velocidad de crecimiento de los cultivos sometidos a distintas concentraciones de estreptomicina.

### 3.2- Análisis de las proteínas del fago MS2 por electroforesis: efecto de la estreptomycin

La estreptomycin es un antibiótico que aumenta los errores de traducción. Nos interesa determinar si este antibiótico aumenta la incorporación errónea de lisina por asparagina en la proteína de la cápside del fago MS2, y qué influencia ejerce la presencia o no de poliaminas en la fidelidad de síntesis proteica.

En la figura 9 se observa la electroforesis monodimensional de las proteínas sintetizadas por bacterias infectadas o no con el bacteriófago MS2, tratadas con estreptomycin. Los patrones que corresponden a bacterias infectadas muestran dos proteínas ausentes en extractos de células no infectadas: la proteína de la cápside y la proteína de maduración A. Además aparecen bandas correspondientes a polipéptidos de bajo peso molecular, debido a la terminación prematura de cadenas polipeptídicas causada por la estreptomycin, y un número de péptidos comunes a bacterias antes y después de infectar.

Para detectar posibles errores de traducción de la proteína de la cápside, extractos celulares fueron sometidos a electroforesis bidimensional, y los productos marcados se detectaron por fluorografía. La figura 10 muestra fluorogramas de geles bidimensionales de proteínas marcadas obtenidos a partir de bacterias infectadas (10 A) o no (10B) con el bacteriófago MS2; se evidencia que la proteína de la cápside sólo está presente en extractos de células infectadas.

La figura 11 muestra que en ausencia de estreptomycin, el nivel de errores de traducción (estimado por la cantidad relativa de satélites de la proteína de la cápside), es mayor en bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas (11 A,B), indicando que las poliaminas aumentan la fidelidad de síntesis proteica.

En contraste, cuando se agrega estreptomycin, la frecuencia de errores de traducción aumenta marcadamente sólo en bacterias suplementadas con poliaminas (11 D). En este último caso se detectaron dos satélites de la proteína de la cápside, que representan una y dos sustituciones de lisina por asparagina por molécula de la proteína de la cápside( figura 11 D, satélites 1 y 2 respectivamente)

La proteína normal de la cápside aparece como un doble spot en nuestros patrones electroforéticos debido a cierta heterogeneidad de la población de bacteriófago derivada de preparaciones virales sometidas a pasajes múltiples (56).



**Figura 9: SDS PAGE de proteínas sintetizadas en bacterias infectadas o no, tratadas con estreptomina.**

Se cultivan bacterias E.coli IM27 suplementadas (C y D) o no (A y B) con poliaminas. Cuando los cultivos alcanzan una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml se infecta con el bacteriófago MS2 (B y D). Luego de 10 min. se agrega rifampicina  $200 \mu\text{g/ml}$  y estreptomina  $12,5 \mu\text{g/ml}$ . Luego de 20 min. se agrega met  $S^{35} 0,6 \mu\text{M}$ . Se incuba durante 30 min., se cosecha y se lisa. Luego se realiza una electroforesis monodimensional como se describe en materiales y métodos.

La flecha indica la posición de la proteína de la cápside.

+ P + M



Figura 10 A

+ P

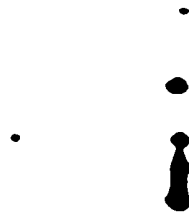


Figura 10 B

**Figura 10:** Electroforesis bidimensional de proteínas marcadas obtenidas de bacterias infectadas o no con el fago MS2

Alícuotas de cultivos suplementados con poliaminas, infectados (A) o no (B) con el fago MS2 fueron marcadas como se describe en materiales y métodos. Los extractos bacterianos fueron analizados por electroforesis bidimensional. Los geles están orientados con las proteínas más básicas hacia la izquierda. N representa a la proteína normal de la cápside.

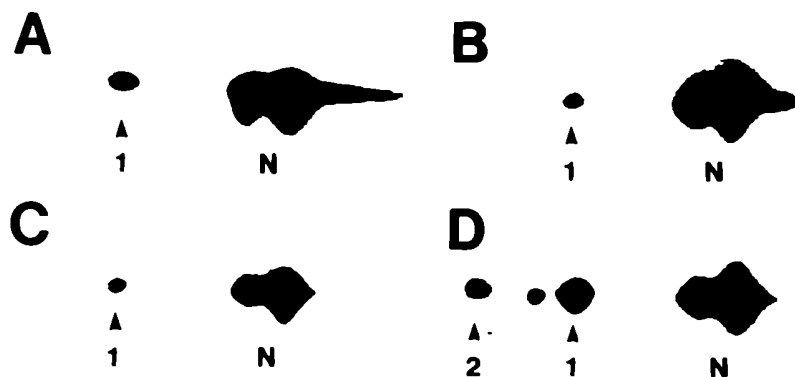


Figura 11: Electroforesis bidimensional de proteínas marcadas obtenidas de bacterias infectadas o no con el fago MS2, cultivadas en presencia o ausencia de estreptomycin y poliaminas.

Alícuotas de cultivos suplementados (B,D) o no (A,C) con poliaminas, infectados con el fago MS2 fueron incubados sin (A,B) o con (C,D) estreptomycin 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y marcadas como se describe en materiales y métodos. Los extractos bacterianos fueron analizados por electroforesis bidimensional. Los geles están orientados con las proteínas más básicas hacia la izquierda. Se recortó la zona de la proteína de la cápside. N representa la proteína normal de la cápside. Los satélites, marcados 1 y 2, poseen 1 y 2 cargas (+) adicionales, respectivamente.

### 3.3- Análisis por electroforesis de las proteínas del fago Q $\beta$ . Efecto de la estreptomicina.

Para estudiar más en detalle el efecto de las poliaminas sobre la fidelidad de síntesis proteica y la acción de la estreptomicina, infectamos cultivos de E.coli LM27 con un fago muy relacionado con el MS2: el bacteriófago Q $\beta$ .

Cuando se agregan concentraciones crecientes de estreptomicina a bacterias infectadas con el bacteriófago Q $\beta$  cultivadas en ausencia o presencia de putrescina, la síntesis de la proteína de la cápside viral se reduce significativamente en las bacterias suplementadas con poliaminas (figura 12 líneas 10,11,12), pero permanece casi sin cambios en células no suplementadas con poliaminas.

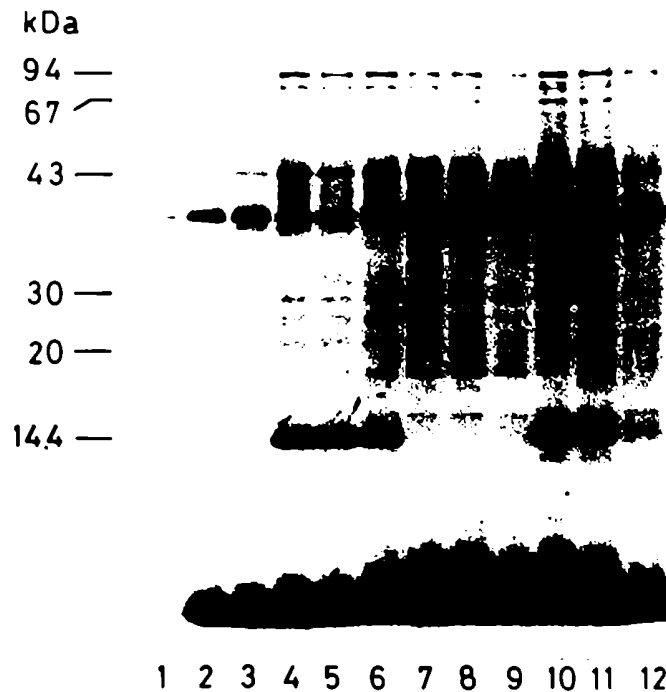


Figura 12: SDS PAGE de proteínas sintetizadas en bacterias infectadas o no con el fago Q $\beta$  en ausencia o presencia de poliaminas y estreptomicina.

Alícuotas de cultivos de E.coli LM27 suplementados (7-12) o no (1-6) con poliaminas fueron infectadas con el bacteriófago Q $\beta$  (líneas +6 y 10-12). 10 min. después se agregó rifampicina a todos los cultivos. La incubación se realizó en ausencia (líneas 1,7, 10) o presencia de 10  $\mu$ g/ml (2,5,8,11) o 20  $\mu$ g/ml de estreptomicina (3,6,9,12). Luego se marca con met S<sup>35</sup> como se indica en materiales y métodos, y los extractos bacterianos se someten a electroforesis.

El hecho de que los errores de traducción inducidos por estreptomycin sean menores en bacterias no suplementadas con poliaminas mientras que los errores espontáneos de traducción son mayores en estas células se puede explicar teniendo en cuenta que las bacterias desarrolladas en ausencia de poliaminas tienen partículas ribosomales 30 S defectivas que traducen con poca eficiencia con un mayor nivel de errores. Al mismo tiempo no son blancos apropiados para la unión del antibiótico, el cual no puede entonces inducir una disminución adicional de fidelidad.

Por otro lado las bacterias suplementadas con poliaminas tienen ribosomas normales que unen al antibiótico con mayor afinidad, permitiendo entonces su acción.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos nos preguntamos si bacterias no suplementadas con poliaminas podrían tener una supervivencia mayor en presencia de estreptomycin que aquellos cultivos suplementados con poliaminas.

Cultivamos entonces E.coli LM27 sometidas o no a un ayuno de poliaminas, en presencia de estreptomycin durante 3 hs.

Experimentos preliminares indicaron que bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas tienen una supervivencia por lo menos 100 veces mayor que aquéllas suplementadas con putrescina, en presencia de estreptomycin.

#### 4- INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION DE E.COLI POR PERMEABILIZACION CON EDTA Y TRATAMIENTO CON AMD

En nuestros estudios sobre fidelidad de la traducción hemos utilizado un sistema experimental de bacterias E. coli infectadas con virus a RNA. Dado que en este sistema la síntesis de proteínas virales sólo representa menos del 5% de la síntesis total, varios laboratorios han bloqueado la formación de proteínas de la bacteria huésped inhibiendo la transcripción de sus RNA mensajeros con rifampicina. Este antibiótico no debiera interferir la replicación del RNA del virus. Sin embargo, hemos observado que la rifampicina reduce el rendimiento de partículas virales a sólo el 1% de los valores normales.

Por otra parte, la rifampicina no puede utilizarse en los casos de bacterias huéspedes resistentes a este antibiótico. Para evitar estos inconvenientes hemos puesto a punto otro método de inhibición de la transcripción de las bacterias utilizando actinomicina D después de la permeabilización lograda por un breve tratamiento con EDTA.

##### 4.1 Efecto de EDTA y actinomicina D sobre la síntesis proteica bacteriana

Para bloquear la síntesis de RNA y proteína de E. coli luego de la infección con fagos a RNA, se ha utilizado actinomicina D (AMD) o rifampicina. En el primer caso era necesario preparar esferoplastos (57,58) o permeabilizar las bacterias con EDTA (59,60), porque la actinomicina D no puede penetrar en células intactas de E.coli. En todos los casos, cuando se utilizaba rifampicina se observó que el rendimiento de fagos era marcadamente menor que en bacterias intactas(59). Por otro lado, trabajando con distintas cepas de E. coli hemos observado que se necesitan altas concentraciones de rifampicina (hasta 200  $\mu\text{g/ml}$ ) para obtener una inhibición eficiente de la síntesis proteica (alrededor del 99%) (fig. 4). Estas altas concentraciones de antibiótico reducen el rendimiento de fagos entre 20 y 100 veces (tabla 1). Para solucionar este problema, hemos



buscado condiciones que nos permitan obtener una muy eficiente inhibición de la síntesis proteica, y a su vez aumentar la producción de progenie viral. Con este objetivo hemos tratado a las células de E. coli con distintas concentraciones de EDTA y AMD (figuras 13A y 13B) y hemos seleccionado los mínimos niveles de ambas sustancias que producen una inhibición máxima de la síntesis proteica bacteriana.

TABLA 1

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE RIFAMPICINA SOBRE LA PRODUCCION DE FAGOS EN CULTIVOS DE E.COLI INFECTADOS CON Q $\beta$

Concentración de rifampicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Título de fagos <sup>a</sup> (pfu/ml)	Rendimiento (%)
0	$3 \times 10^{11}$	100
100	$6 \times 10^9$	2
150	$4,5 \times 10^9$	1,5
200	$2,5 \times 10^9$	0,8

<sup>a</sup> Los títulos de fagos fueron medidos en cultivos bacterianos 8 hs luego de la infección.

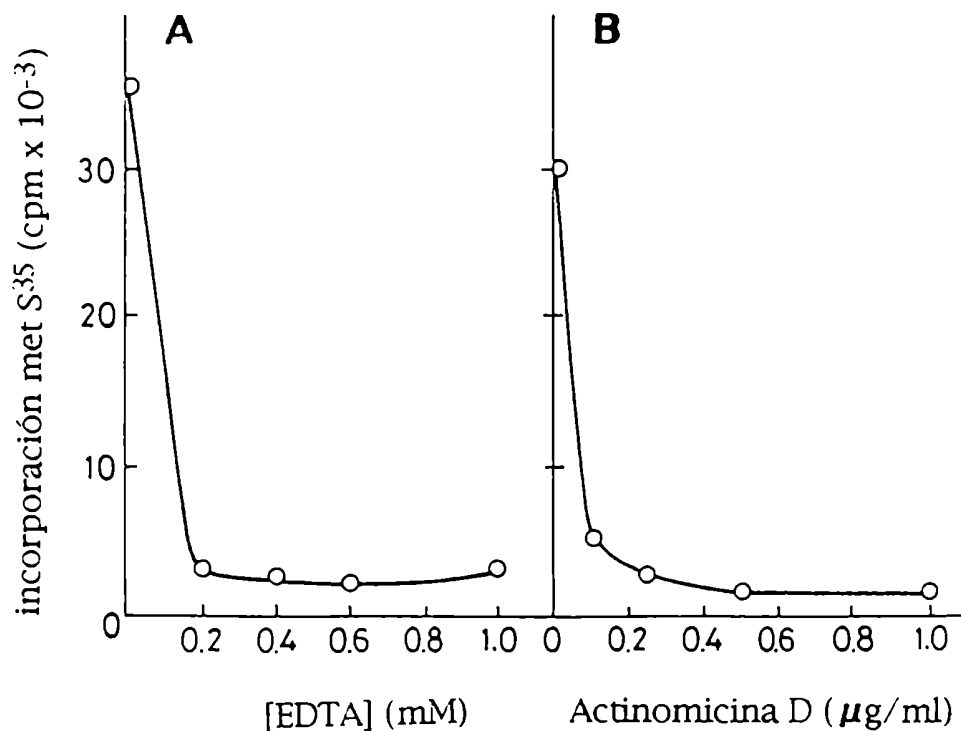


Figura 13: Efecto de distintas dosis de EDTA y AMD sobre la síntesis proteica bacteriana.

A) Se toman alícuotas de cultivos de *E. coli* LM27 en fase exponencial de crecimiento y se las trata con distintas concentraciones de EDTA por 3 min. a 37°C. Luego de dilución y adición de AMD (0,5 μg/ml), se marcan muestras que contienen  $2 \times 10^8$  células durante 10 min. con met S<sup>35</sup> (25 μCi/ml, 40 μM), y se mide la síntesis proteica.

B) Luego de permeabilizar el cultivo por tratamiento con 0,6 mM de EDTA como se describe en materiales y métodos, se marcan distintas alícuotas de suspensiones celulares que contienen  $2 \times 10^8$  células, durante 10 min con met S<sup>35</sup> en presencia de distintas concentraciones de AMD.

(Todos los valores de síntesis proteica son promedios de duplicados)

#### 4.2- Efecto de rifampicina y actinomicina D sobre la transcripción y traducción bacteriana

El breve tratamiento en presencia de EDTA (0,6 mM) elimina la barrera de permeabilidad de E. coli a actinomicina D, y el antibiótico puede ser captado rápidamente por la bacteria causando una inmediata y completa inhibición de la síntesis de RNA, similar al efecto obtenido con altas dosis de rifampicina, como se muestra en la figura 14. La síntesis proteica también se suprime inmediatamente con la administración de actinomicina D a la bacteria permeabilizada (figura 15). Cuando se omite el tratamiento con EDTA, la actinomicina D no puede entrar en las células de E. coli y, por lo tanto no se suprime la síntesis proteica. Por otro lado la incubación de la bacteria en presencia de EDTA por períodos más largos que 3 min. a 37°C no produce una mayor inhibición de la síntesis proteica.

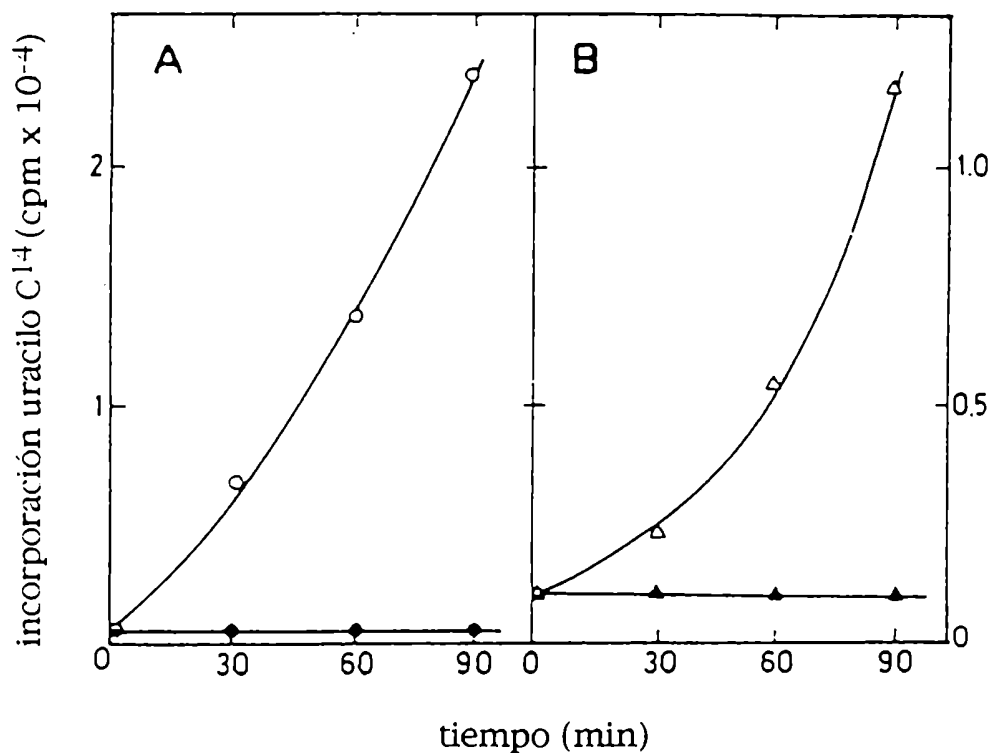


Figura 14: Síntesis de RNA en bacterias tratadas con rifampicina o AMD luego de permeabilización con EDTA.

Se incuban alícuotas de cultivos de *E. coli* LM27 en crecimiento exponencial en medio MOPS en ausencia (o,  $\Delta$ ) o presencia (•,  $\blacktriangle$ ) de antibiótico, y se marca con uracilo  $\text{C}^{14}$  (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , 17  $\mu\text{M}$ ) con la adición de citosina (200  $\mu\text{M}$ ). Los cultivos se tratan con rifampicina 200  $\mu\text{g/ml}$  (A) o AMD (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) luego de 3 min. de incubación con EDTA 0,6 mM (B). Se toman muestras que contienen  $2 \times 10^8$  bacterias a los tiempos indicados y se mide la síntesis de RNA como se describe en materiales y métodos.

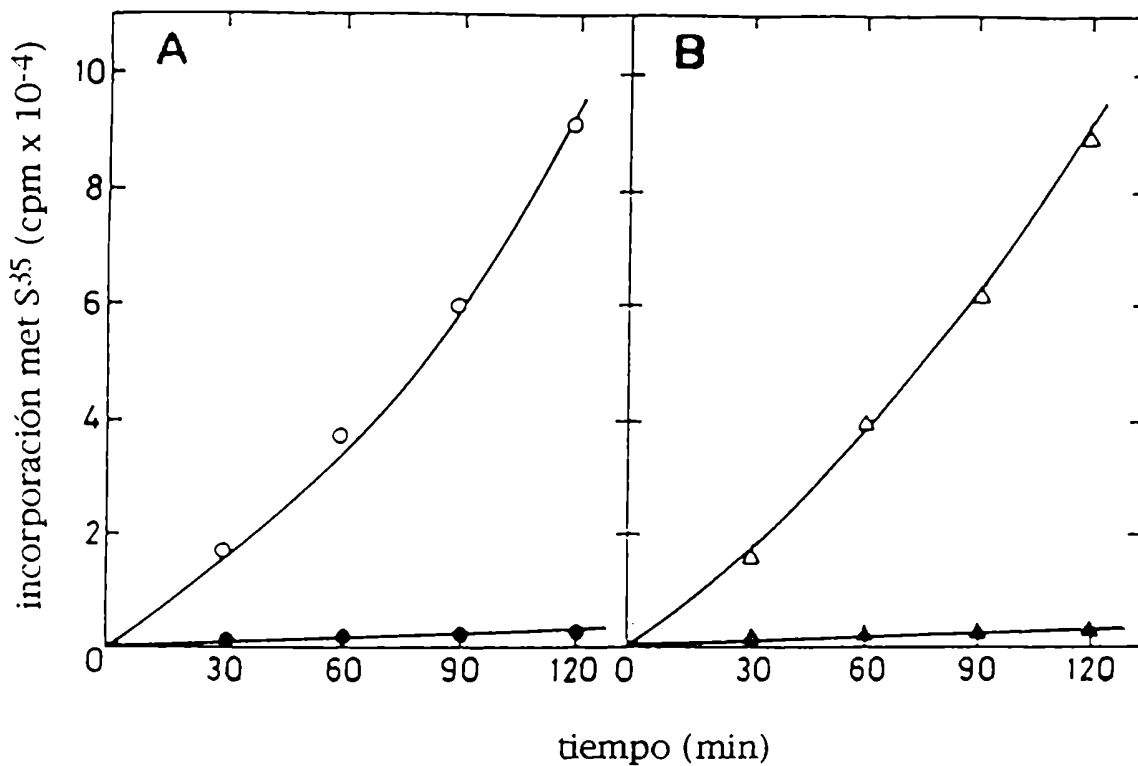


Figura 15: Síntesis de proteínas en células de *E.coli* tratadas con rifampicina (A) o AMD (B) luego de permeabilización con EDTA. Se marcan los cultivos con met S<sup>35</sup> (25  $\mu$ Ci/ml, 40  $\mu$ M) . Los símbolos y otras condiciones fueron similares a los descritos en figura 14.

#### 4.3- Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas en bacterias tratadas con rifampicina o actinomicina D

Para comparar los patrones de síntesis proteica viral obtenidas en presencia de rifampicina o AMD luego de la permeabilización, se infecta el cultivo con el bacteriófago Q $\beta$ , y se trata con AMD o rifampicina para eliminar la síntesis proteica del huésped. Luego se marca con met S<sup>35</sup> durante 60 min. Se analizan los extractos celulares por electroforesis en gel, y las bandas radioactivas se detectan por radioautografía.

La figura 16 muestra que AMD (0,5  $\mu$ g/ml) luego del tratamiento con EDTA, y rifampicina (200  $\mu$ g/ml) son igualmente eficientes en la supresión de la síntesis proteica bacteriana (líneas 3 y 5). En las muestras que corresponden a bacterias infectadas sin la adición de antibiótico es muy difícil distinguir la banda de 15 KDa que corresponde a la proteína de la cápside viral pues se observa un intenso background de proteínas del huésped (líneas 1 y 2). En contraste, extractos de E. coli infectados, tratados con AMD o rifampicina, muestran una banda prominente que corresponde a la proteína de la cápside viral, y sólo se observa un pequeño background de proteínas bacterianas (líneas 4 y 6). Debemos mencionar también que en los experimentos llevados a cabo con rifampicina se observa que la síntesis de unas pocas proteínas bacterianas es parcialmente resistente a altos niveles de antibiótico (línea 5).

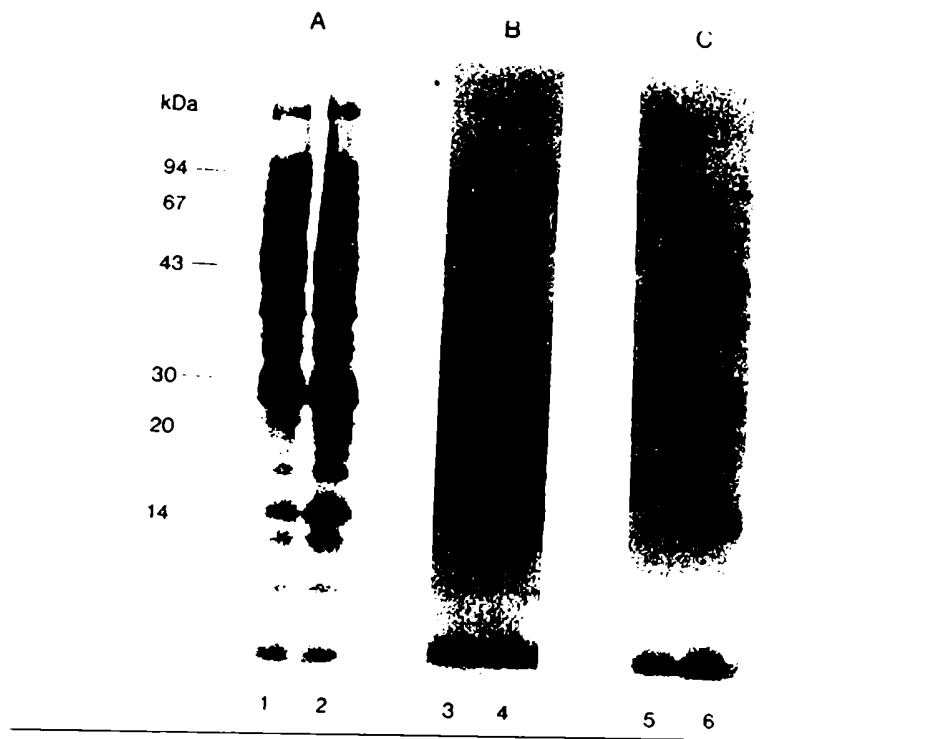


Figura 16: Patrones electroforéticos de proteínas marcadas obtenidas de bacterias infectadas o no con el fago Q $\beta$  antes o después del tratamiento con rifampicina o AMD.

Se tratan células de *E.coli* como se indica en cada caso y luego se marca con met S<sup>35</sup> (25  $\mu$ Ci/ml, 0,4  $\mu$ M) por 60 min. Los extractos bacterianos se someten luego a SDS PAGE.

A) Líneas 1 y 2 representan bacterias incubadas en ausencia de antibiótico.

B) Líneas 3 y 4 son patrones correspondientes a cultivos tratados con AMD ( 0,5  $\mu$ g/ml) luego de incubar 3 min. con 0,6 mM EDTA.

C) Líneas 5 y 6 representan muestras obtenidas a partir de bacterias incubadas con rifampicina (200  $\mu$ g/ml).

Cultivos no infectados: líneas 1,3,5.

Cultivos infectados: líneas 2,4,6.

A la izquierda se indican los pesos moleculares de proteínas marcadoras.

#### 4.3- Efecto de la actinomicina D y la rifampicina sobre la producción de fagos

La producción viral luego de varias horas de infección bacteriana es significativamente menor en presencia de rifampicina 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que en las bacterias tratadas con EDTA y AMD (figura 17).

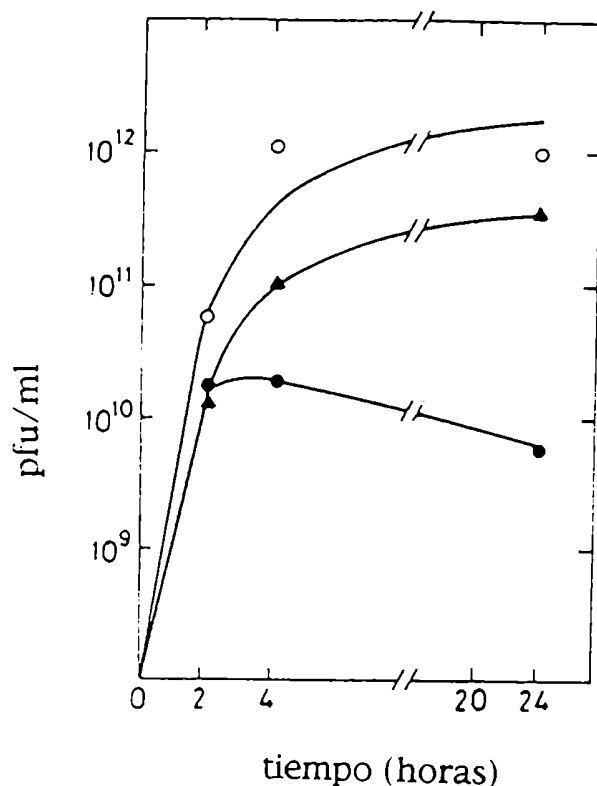


Figura 17: Efecto de AMD y rifampicina en la proliferación del fago Q $\beta$

Se incuban células infectadas con el fago Q $\beta$  sin antibiótico (o), con AMD 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  luego de tratamiento con EDTA ( $\Delta$ ) o con rifampicina 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\bullet$ ). Se toman alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  a distintos tiempos postinfección de cultivos y se realiza un dosaje de fagos como se indica en materiales y métodos.



#### 4.4- Utilidad de la Actinomicina D sobre una cepa rifampicina resistente

La inhibición de la síntesis proteica utilizando el método de la actinomicina D puede ser particularmente útil cuando se trabaja con bacterias resistentes a rifampicina. En este caso este antibiótico es totalmente ineficiente mientras que la actinomicina D inhibe por completo la transcripción y traducción bacteriana.

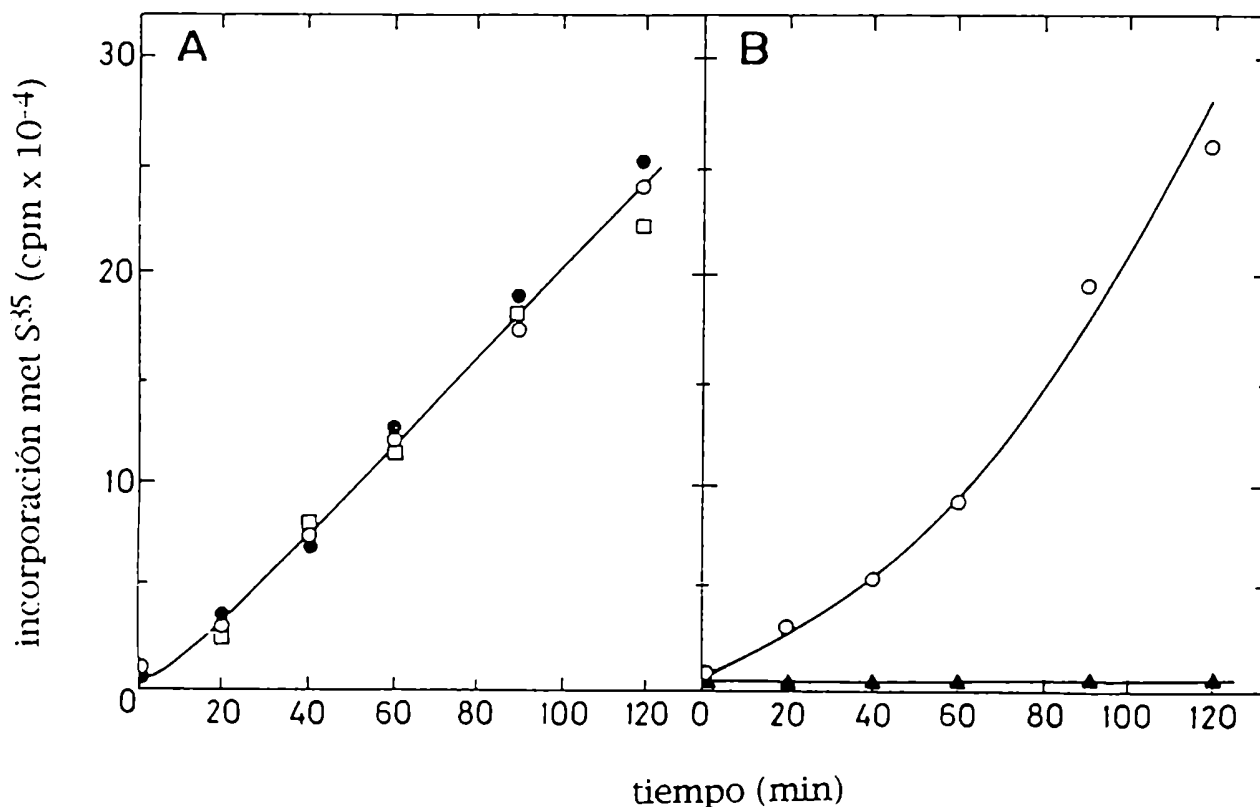


Figura 18: Síntesis de proteínas en células de *E.coli* resistentes a rifampicina tratadas con rifampicina (A) o con AMD (B).

El experimento se realizó en forma análoga a la descrita en figura 15. (●) control, (○) rifampicina 100 µg/ml, (◻) rifampicina 200 µg/ml, (▲) AMD 0,5 µg/ml.

DISCUSSION

DISCUSION

Hasta el presente se han adoptado tres estrategias fundamentales para determinar las posibles funciones de las poliaminas:

- a) Correlación con distintos parámetros de la fisiología celular con los niveles intracelulares de las mismas y sus funciones biosintéticas (6,61).
- b) Los estudios en sistemas libres de células (6,61).
- c) El estudio de las alteraciones que se producen en células u organismos que carecen de o tienen disminuido el contenido de poliaminas (61,11).

En el primer caso sólo podemos tener una primera aproximación a los procesos fisiológicos o metabólicos afectados por estas bases orgánicas sin tener evidencias directas de su participación en ellos. En el segundo caso, debido a que las poliaminas son altamente cargadas, interactúan con numerosos componentes celulares que pueden o no estar relacionados con sus funciones biológicas específicas, se debe tener mucho cuidado al interpretar los resultados experimentales.

Probablemente la mejor forma para determinar las funciones de las poliaminas en los organismos vivos es el estudio de los procesos metabólicos y fisiológicos afectados por la falta de ellas. Por tratarse de estudios *in vivo* aportan evidencias más directas de su participación en los procesos alterados.

Se han desarrollado dos sistemas para poder disminuir el contenido endógeno de poliaminas en los seres vivos: la obtención de mutantes auxótrofos para estos compuestos, y la utilización de inhibidores de la síntesis de las mismas (61,11). Esta última estrategia presenta una serie de inconvenientes: la inhibición de las enzimas suele ser parcial, algunos inhibidores producen efectos secundarios (62) y en algunos organismos no penetran fácilmente.

La obtención de mutantes auxótrofos en diversos organismos, por el contrario, ha permitido determinar algunos de los roles fisiológicos de las poliaminas, y constituyen una herramienta de trabajo para determinar los procesos metabólicos en los que participan estas poliaminas.

En el presente estudio se ha utilizado una cepa mutante de E.coli llamada LM27, que no puede sintetizar poliaminas. Es un modelo interesante para estudiar el rol de estas sustancias *in vivo*, ya que este organismo es fácilmente manipulable desde el punto de vista genético y bioquímico, y la mayoría de los procesos celulares como la replicación, la transcripción, síntesis de proteínas, etc son ampliamente conocidos.

En este trabajo se presentan evidencias que permiten asignar a las poliaminas un papel fisiológico en la fidelidad de traducción.

### Poliaminas y velocidad de crecimiento

La disminución de velocidad de crecimiento que se observa en bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas se debe a una deficiencia en la síntesis de sus macromoléculas fundamentales (DNA, RNA, proteínas). Este efecto se revierte por el agregado de putrescina. Un efecto similar ha sido observado en eucariotas como por ejemplo S. cerevisiae.

### Las poliaminas modulan los errores de lectura inducidos por estreptomicina

Las poliaminas juegan roles importantes en distintos pasos de la síntesis proteica (63,64,65). Además de reemplazar parcialmente los requerimientos de magnesio para la formación del aminoacil-tRNA (66), y la iniciación y elongación (64,67,68) de las cadenas polipeptídicas, estas bases orgánicas cumplen funciones esenciales en la biogénesis normal de las partículas ribosomales (22), y en el control de la fidelidad de traducción (26).

Estudios previos del laboratorio han demostrado que bacterias deficientes en poliaminas tienen una capacidad disminuida de síntesis proteica probablemente debido a la acumulación de partículas 30 S anormales (22) que contienen RNA 16 S submetilado y muy bajos niveles de proteína ribosomal S1 (69,70).

Los niveles endógenos de putrescina y espermidina parecen modular la fidelidad de síntesis proteica in vivo, pues bacterias de E.coli sometidas a un ayuno de poliaminas sufren terminación prematura de cadenas polipeptídicas y aumento de errores de traducción en ciertos codones (26,48).

Trabajando con bacterias sensibles a estreptomicina que requieren poliaminas para su crecimiento normal, hemos encontrado que este antibiótico causa una marcada inhibición de la síntesis proteica sólo en bacterias suplementadas con poliaminas, mientras que en ausencia de estas sustancias se convierten en resistentes a moderadas concentraciones del antibiótico. Estos resultados pueden explicarse por la unión deficiente de los antibióticos aminoglucósidos a las partículas ribosomales anormales presentes en células sometidas a un ayuno de poliaminas.

En el presente trabajo hemos mostrado que los efectos de la estreptomicina sobre la fidelidad de síntesis proteica varían de

acuerdo al nivel intracelular de poliaminas. El aumento de los errores de traducción inducidos por el antibiótico se observa sólo en bacterias suplementadas con poliaminas y no en aquellas células sometidas a un ayuno de putrescina.

La baja respuesta de las bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas no puede ser atribuida a diferencias en el transporte de la droga por parte de bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas pues Algranati et al demostraron que luego de una breve incubación con el antibiótico se induce el sistema de transporte. La captación de estreptomycin fue similar en bacterias auxótrofas para poliaminas crecidas en ausencia o presencia de putrescina (71).

Para estudiar más en detalle la influencia de las poliaminas sobre el efecto de la estreptomycin en la traducción bacteriana hemos seguido la síntesis *in vivo* de una única proteína: la proteína de la cápside viral. Con este propósito se infectó un cultivo E.coli LM27 con un virus a RNA (MS2 O Q $\beta$ ), y luego se trató con rifampicina. Bajo estas condiciones el RNA y la síntesis de proteínas de la bacteria huésped se bloquean casi completamente con la excepción de algunas proteínas que son sólo parcialmente afectadas (72,73,74)..

cuando se agregaron concentraciones crecientes de estreptomycin a bacterias E.coli LM27 cultivadas en presencia o ausencia de putrescina, la síntesis de la proteína de la cápside se redujo marcadamente sólo en bacterias suplementadas con poliaminas pero permaneció casi sin cambios en células sometidas a un ayuno de poliaminas.

El sistema de E.coli infectada con el bacteriófago MS2 ya había sido utilizado para estudiar la fidelidad de síntesis proteica *in vivo* (26,75,76). Durante la traducción de la proteína de la cápside se produce un nivel basal bastante alto de error de lectura que provoca la sustitución de lisina por asparagina ocasionando una heterogeneidad de carga con la formación de un satélite básico de la proteína de la cápside además de la proteína normal (75,76).

Ambos polipéptidos pueden ser fácilmente separados por isoelectroenfoque utilizado como primera dimensión de una electroforesis bidimensional.

Se ha demostrado que la estreptomycin puede aumentar considerablemente la frecuencia de errores de lectura que ocurren normalmente en ausencia del antibiótico (77).

Para investigar si los niveles intracelulares de putrescina pueden afectar la estimulación de los errores de lectura inducidos por este aminoglucósido, hemos agregado estreptomycin a bacterias crecidas en ausencia o presencia de poliaminas.

Los resultados de los geles bidimensionales indican que en ausencia del antibiótico el nivel de error de lectura (estimado por la cantidad relativa de satélites de la proteína de la cápside), fue mayor en bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (26).

En contraste, cuando se agrega estreptomina, la frecuencia de errores aumenta marcadamente sólo en aquellas bacterias que fueron suplementadas con poliaminas.

El hecho de que los errores de traducción inducidos por estreptomina sean muy reducidos en bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas mientras que los errores espontáneos estén aumentados en esas mismas células puede explicarse por el hecho de que bacterias auxótrofas para poliaminas crecidas en ausencia de estas sustancias contienen partículas ribosomales 30S defectivas que no son blancos apropiados para la unión funcional del antibiótico, el cual, por lo tanto no puede inducir una disminución adicional de fidelidad.

Por otro lado, bacterias suplementadas con poliaminas contienen ribosomas normales que pueden unirse a la estreptomina con alta afinidad. En este caso la estreptomina provoca una distorsión del sitio de reconocimiento de la subunidad 30 S con el concomitante aumento de errores de lectura (78,33).

Davis y colaboradores han propuesto un mecanismo de acción de la estreptomina en bacterias (78,33). Luego de la entrada inicial del antibiótico la fidelidad de traducción disminuye. Algunas de estas proteínas anormales pueden ser incorporadas en membrana causando un aumento de la captación de la droga. Los subsecuentes elevados niveles intracelulares de estreptomina provocan finalmente un bloqueo de la iniciación en ribosomas y la supresión de la síntesis proteica.

Los resultados presentados muestran que el efecto inhibitorio y la disminuída fidelidad de traducción inducidos por estreptomina en E.coli son altamente dependientes de las concentraciones intracelulares de poliaminas.

Estos hechos y la propuesta de Davis llevaron a la predicción de que el ayuno de poliaminas aumentaría considerablemente la supervivencia bacteriana en presencia del antibiótico. Experimentos preliminares prueban que la supervivencia de células sometidas a un ayuno de poliaminas es por lo menos cien veces mayor que la de las células suplementadas con estas sustancias.

## Inhibición de la transcripción de *E.coli* por tratamiento con actinomicina D

La rifampicina, que puede bloquear la síntesis de RNA dependiente de DNA, ha sido ampliamente utilizada para inhibir selectivamente la síntesis proteica del huésped en bacterias *E.coli* infectadas con fagos a RNA. Sin embargo hay muchos casos en los que es necesario aumentar los niveles de rifampicina hasta 200  $\mu\text{g/ml}$  para obtener una supresión casi completa de la síntesis proteica bacteriana, y estas altas concentraciones de antibiótico causan al mismo tiempo una fuerte inhibición de la proliferación de fagos resultando en una inhibición de 50-100 veces de la producción viral.

En el presente estudio hemos evitado parcialmente esta dificultad utilizando actinomicina D luego de una breve incubación con EDTA. La transcripción y la correspondiente síntesis proteica fueron eficientemente bloqueadas por actinomicina D 0,5  $\mu\text{g/ml}$  agregada a cultivos luego de permeabilizar las células con un breve tratamiento con EDTA 0,6 mM, que elimina la barrera de permeabilidad de células de *E.coli* que ha sido descrita previamente (6,7), y entonces el antibiótico puede ser tomado por la bacteria causando una rápida y casi completa inhibición de la síntesis de RNA, similar al efecto obtenido con altas dosis de rifampicina. Cuando el tratamiento con EDTA se omite, la actinomicina no puede penetrar en las células de *E.coli* y la síntesis proteica permanece inalterada.

Por otro lado, la incubación de las bacterias en presencia de EDTA por períodos mayores que 3 minutos a 37°C no produce una mayor inhibición de la síntesis proteica.

Con el tratamiento descrito hemos observado que el rendimiento de fagos es 10 veces mayor que el obtenido con rifampicina 200  $\mu\text{g/ml}$ .

### Utilidades del método

La inhibición de la síntesis de RNA y proteína de *E.coli* por bajos niveles de AMD en bacterias permeabilizadas con EDTA es una modificación de los procedimientos previamente descritos (6,7).

Los principales cambios son:

- a) infección viral anterior a la permeabilización bacteriana
- b) inhibición de la transcripción bacteriana con una dosis baja de AMD.

Este método puede ser particularmente útil cuando se trabaja con bacterias resistentes a rifampicina. En este caso, la rifampicina es



totalmente inefectiva, mientras que la AMD causa una completa supresión de la transcripción y traducción bacteriana.

Los resultados descriptos indican que la inhibición de la síntesis de RNA producida por el tratamiento con AMD de bacterias permeabilizadas con EDTA ofrece distintas ventajas sobre el método que utiliza rifampicina para bloquear la transcripción bacteriana en estudios de síntesis proteica de proteínas virales específicas, y desarrollo de fagos a RNA en bacterias infectadas.

## CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se estudió la influencia de las poliaminas en la fidelidad de traducción y en la acción de antibióticos aminoglucósidos.

A partir de los experimentos realizados se confirmó que las poliaminas aumentan la fidelidad de traducción *in vivo*.

Por otro lado, se puede concluir que los efectos de la estreptomina en la fidelidad de traducción varían de acuerdo al nivel intracelular de poliaminas.

El aumento de los errores de lectura inducidos por el antibiótico se observan sólo en bacterias suplementadas con poliaminas, y no en células sometidas a un ayuno de estas sustancias.

Además se comprobó que bacterias sometidas a un ayuno de poliaminas muestran una supervivencia aumentada en presencia de estreptomina con respecto a bacterias suplementadas con putrescina.

En el presente estudio se describe también un método alternativo a la rifampicina para bloquear la síntesis proteica de la bacteria huésped: la inhibición de la transcripción bacteriana por actinomicina D luego de permeabilizar las bacterias con EDTA.

Este método permite inhibir la síntesis de RNA y y proteínas del huésped obteniéndose una producción viral aproximadamente 10 veces mayor que la que se obtiene cuando se utiliza rifampicina para inhibir la síntesis proteica del huésped.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Oschima, T. 1983. *Advances in polyamine research*, Raven Press, New York, vol 4.
- 2) Rosano, C.L. 1983. *Journal of Bacteriol.* 153: 326.
- 3) Dion, A.S. 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 231.
- 4) Rodriguez-Gary, B., Phillips G.C. y Kuehn G.D. 1989. *Plant Physiol.* 89: 25.
- 5) Kuehn G.D., Rodriguez-gary B., Bagga S. y Phillips G.C. 1990. *Plant Physiol.* 89: 525.
- 6) Tabor C.W. y Tabor H. 1976. *Ann. Rev. of Bioch.* 45: 285.
- 7) Bachrach U.1973. *Function of Naturally occurring Polyamines*, Academic Press Inc. p. 29-35.
- 8) Umezagua H. 1983. *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4 p.1
- 9) Vásquez D. 1979. *Inhibitors of Protein Synthesis*, p. 31.
- 10) Heby, O. 1981. *Differentiation* 19: 1-20.
- 11) Heby, O. 1981. *Differentiation.* 19: 1.
- 12) Seiler, N y Deckard, K. 1978. *Advances in polyamine Research* 2:145-150. Raven press, N.Y.
- 13) Janne, J, Poso, H y Raina A. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* 473: 241-293.
- 14) Russel, D.H. 1989. *The physiology of polyamines* (Bachrach, U. y heimer, Y.M. eds.) 1:256-279. CRC Press, Inc., Boca Ratón Fl.
- 15) Miret, J.J.; Nainudel, S y Goldemberg, S.H. 1986. *FEBS Lett.* 200: 117
- 16) Frydman, B., Frydman, R., De los Santos, C., Alonso, D., Goldemberg S.H. y Algranati, I.D. 1984. *Biochem. Biophys. Acta* 805: 337.
- 17) Paulus T.J., Cramer C.L. y Davis, R.H.1983. *J. Biol. Chem.* 258: 8608.
- 18) Paulus T.J. y Davis, R.H. 1982. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 104: 228.
- 19) Geiger, L.E., Morris. 1980. *Journal of Bacteriology*,141:1192-1198.
- 20) Igarashi, K. et al. 1979. *Eur. J. Biochem.* 93: 345-353.
- 21) Takeda, Y. 1969. *J. of Biochem.* 66: 345-349.
- 22) Echandi, G y Algranati, I.D. 1975. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.*, 67: 1185-1191.
- 23) Godemberg, S.H. y Algranati, I.D. 1977. *Mol. and Cell Biochem.* 116: 71-77.
- 24) Igarashi, et al. 1979 . *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 91: 440-448.

- 25) Abraham, K.A., Olsnes, S y Phil, A. 1979. FEBS L. 101: 92-96.
- 26) Mc. Murry, L.M. y Algranati, I.D. 1986. Eur. J. Biochem. 155: 383-390.
- 27) Herbst, E.J., Weaver, R.H. y Keister, L.D. 1958. Arch. Biochem. Biophys. 75: 171-177.
- 28) Tabor, C.W. y Tabor, H . 1966. J. Biol.Chem. 241: 3714-3723.
- 29) Tabor H. y Tabor, C.W. 1969. J. Biol. Chem. 244: 2286-2292.
- 30) Tabor, H. y Tabor, C.W. e Irreverre, F. 1973. Anal. Biochem. 55: 457-467.
- 31) Lusk, J.E.; Williams, R.J. y Kennedy, P. 1968. J. Biol. Chem.243: 2618-2624.
- 32) Goodman, A. 1990. " The Pharmalogical Basis of Therapeutics", p. 1098-1117.
- 33) Davis, B.D. 1987. Microb. Rev. 51: 341-350.
- 34) Drake, J. 1969. Nature 221: 1132.
- 35) Files, J. et al. 1974. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 660-670 .
- 36) Murgola, E. 1988. Annu. Rev. Genet. 19: 57-80.
- 37) Fersht, A. 1986. The Charging of tRNA, p.67-82.
- 38) Lin, S. et al. 1984. Biochemistry. 23: 4109-4116.
- 39) Okamoto M. et al. 1984. Biochemistry 23:1701-1710.
- 40) Woese, C. 1967. Nucl. Acid. Res. 7:107-172.
- 41) Lagerkvist, U. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:1759-1762.
- 42) Valle, R. y Morch, M. 1988. FEBS Lett. 235:1-15.
- 43) Fiers, W., RNA Phages. 1975. p. 353-397.
- 44) Parker et al. 1980. Molec. Gen. Genet. 180: 275-281.
- 45) Grosgean et al. 1978. J. Mol. Evol. 12:113-119.
- 46) Fiers et al. 1972. Nature 237:8 2-88.
- 47) Boedker, H.1967. Biochemistry 6: 2718.
- 48) Godemberg, S.H. y Algranati, I.D. 1981. Eur. J. Biochem. 117: 251-255.
- 49) Kobayashi, Y. et al. 1974. Academic Press N.Y. p.51.
- 50) O' Farrel, P.H. 1975. J. Bioch. Chem. 260: 4007-4021.
- 51) O' Farrel, P.H. et al. 1977. Cell 12: 1133-1142.
- 52) Thomas, J.O. et al. 1978. Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry N.Y. p.1-22.
- 53) Miller, J.H. 1992. A short course in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, Lab. Press. N.Y.
- 54) Leive, L. 1965. Biochem. Biophis Res. Comm. 18:13-17.

- 55) Leive, L. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 53: 745-749.
- 56) Domingo, E. et al. 1978. Cell 13: 735-744.
- 57) Viñuela, E., Algranati, I.D. y Ochoa, S. 1967. Eur. J. Biochem. 1: 3-11.
- 58) Viñuela, E., Algranati, I.D. Feix, G. Y Ochoa, S. 1969. Bioch. Bioph. Acta 155: 558-565.
- 59) Haywood, A.M., y Harris, J. M. 1966. J. Mol. Biol. 18: 448-463.
- 60) Oeschger, M.P. y Nathans, D. 1966. J. Mol. Biol. 22: 235-247.
- 61) Tabor, C.W. y Tabor, H. 1984. Ann. Rev. Bioch. 53: 749.
- 62) Hapke, B. y Noll, H. 1976. J. Mol. Biol. 105:109.
- 63) Algranati, I.D. y Goldemberg, S.H. 1977. Trends Biochem. Sci. 2: 272-274.
- 64) Atkins, J.F., Lewis, J. B. y Gesteland, R.E. 1975. J. Biol. Chem. 250: 5688-5695.
- 65) Holta, E. y Hovi, T. 1985. Eur. J. Biochem. 152:229-237.
- 66) Takeda, Y. y Igarashi, K. 1972. J. Bacteriol. 111:1-6.
- 67) Barbiroli, B. et al. 1989. en "The physiology of polyamines", vol. 1:125-132.
- 68) Hunter, A.R. et al. 1977. Eur. J. Biochem. 75:149-157.
- 69) Igarashi, K et al . 1981. Eur. J. Biochem. 114:127-131.
- 70) Igarashi K. et al .1981. Eur J. Biochem. 113: 587-593.
- 71) Goldembreg, S.H. y Algranati, I.D. 1981. Med. Biol. 59: 360-367.
- 72) Fromageot, H.P. M. y Zinder N.D. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61:184-191.
- 73) Beremand, M.R. y Blumenthal, T. 1979. Cell 18: 257-266.
- 74) Khazaie, K. y Rosemberger, R.F. 1984. Eur. J. Biochem. 144: 485-489.
- 75) Parker, J. y Borgia, P.T. 1980. Mol. Gen. Genet. 180: 275-281.
- 76) Parker, J. et al . 1983. J. biol. Chem. 258: 10007-10012.
- 77) Johnston, T.C. y Parker, J. 1985. J. Mol. Biol. 181: 313-315.
- 78) Davis, B.D., Chen, L. y Tai, P.C. 1986. Proc. Nat. Acad. Sci. 83: 6164-6168.

CARACTERIZACION DE UN INHIBIDOR DE LA TRADUCCION  
EN EXTRACTOS DE LEISHMANIA MEXICANA

INTRODUCCION

## LEISHMANIASIS Y SU AGENTE ETIOLÓGICO

### 1- DESCRIPCIÓN GENERAL Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La Leishmania mexicana es un parásito del hombre causante de enfermedades difíciles de prevenir y curar.

En América del Sur, la epidemiología de la enfermedad en lo que respecta a la transmisión de leishmaniasis al hombre es extremadamente compleja. Factores de riesgo incluyen la edad joven y malnutrición (1).

Hay distintos tipos de leishmaniasis. La más grave es la leishmaniasis visceral, causada por la Leishmania donovani chagasi. Esta enfermedad es causante de altos índices de mortalidad infantil en el nordeste de Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y Honduras. Sin una terapia apropiada, el sistema retículo endotelial es progresivamente invadido por el parásito, se produce una severa inmunosupresión y la muerte sobreviene generalmente por infecciones secundarias del pulmón o intestino.

Otros parásitos han sido aislados de granulomas de piel en diversos países de América continental, con excepción de Chile, Uruguay y Canadá. Estos parásitos se dividen en dos grupos: Leishmania mexicana y Leishmania brasilienses, ambos agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea.

Leishmania mexicana inoculada en la piel de hamsters se reproduce con rapidez y forma histiocitomas en los que abundan los parásitos; la metástasis es frecuente.

La Leishmania brasilienses también produce múltiples lesiones en la piel con diseminación linfática.

La Leishmania mexicana, objeto del presente estudio, está distribuida por México, Guatemala, Belice y en el estado de San Pablo, Brasil, también en Texas, USA (2). Este parásito causa infecciones que se suelen localizar en el pabellón auricular, y le siguen en frecuencia las lesiones en la cara y extremidades. Las lesiones en el pabellón auricular son deformantes, tienden a ser crónicas, pueden persistir durante muchos años, mientras que en otras partes del cuerpo se curan en forma espontánea en unos seis meses.

En México, las principales víctimas son los trabajadores que deben viajar en la selva durante época de lluvias, cuando hay abundancia de flebótomos.



Cada año ocurren en el mundo 400.000 nuevos casos de leishmaniasis cutánea. La organización Mundial de la Salud la ha incluido entre las seis enfermedades tropicales más importantes (3). Los tratamientos terapéuticos con pentostan o glucantime (antimoniales), no han sido exitosos debido a la toxicidad de las drogas y a la gran variabilidad de la actividad de estos compuestos en los pacientes (4).

Es importante, por lo tanto, definir nuevos objetivos bioquímicos que permitan ser aprovechados desde el punto de vista quimioterápico.

## 2- CICLO DE VIDA DE LEISHMANIA

Las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de vida digenético en el que existen dos formas morfológicamente distintas: promastigote y amastigote (5).

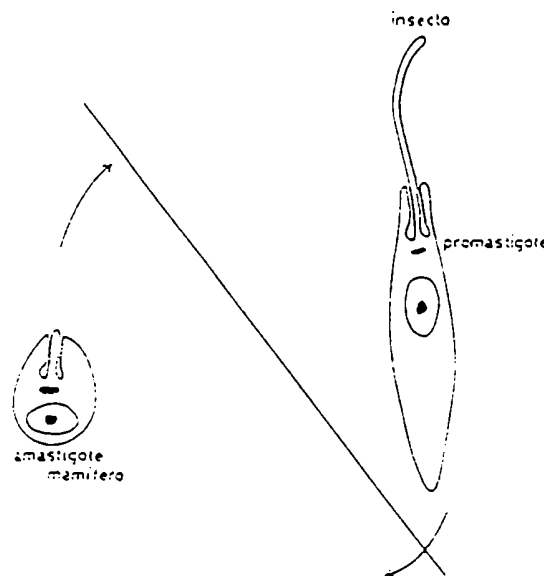
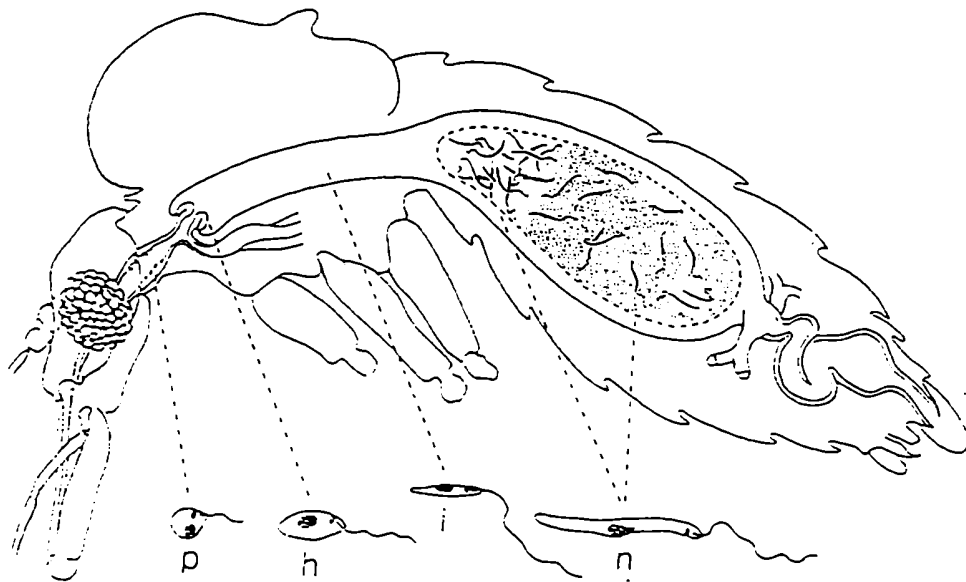


FIGURA A

Se puede comenzar el ciclo cuando el flebótomo vector (*Lutzumya longipalpis*), pica a un mamífero infectado con *Leishmania*. Los parásitos llegan junto con la sangre ingerida al intestino del vector, que segrega una membrana peritrófica (6) de quitina que envuelve la sangre ingerida. Dentro de ella los amastigotes se dividen y luego se diferencian a nectomonas (promastigotes), que migran a la región anterior de la membrana peritrófica, digieren la hemoglobina y segregan quitinasas (7,8), se rompe entonces la membrana

peritrófica por la zona anterior y se diferencian a haptomonas y paramastigotes (también formas promastigotes) que se dividen pegados al epitelio. Las nectomonas se diferencian a promastigotes infectivos. Cuando el vector pica a un mamífero, la transmisión de promastigotes ocurre por regurgitación. Los promastigotes llegan al flujo sanguíneo, son captados por los macrófagos, y se diferencian a amastigotes, que se replican en fagolisosomas e invaden nuevas células.



p: paramastigote  
h: haptomona  
i: promastigote infectivo  
n: nectomona

FIGURA B

## SINTESIS DE PROTEINAS

### 1- GENERALIDADES

La traducción de un mensajero para dar una proteína se realiza por polimerización enzimática de los aminoácidos sobre la superficie del ribosoma de una manera ordenadamente secuencial, según la información contenida en el RNA mensajero.

El dador de aminoácidos es el aminoacil tRNA, cuya síntesis tiene lugar por medio de una reacción enzimática extraribosomal.

El proceso de síntesis de proteínas puede dividirse en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Cada etapa tiene un alto grado de especificidad e involucra la asociación estrecha de dos o más componentes. Para estudiar el mecanismo molecular de cada paso se requiere conocer no sólo la estructura básica del ribosoma sino también caracterizar los factores no ribosomales involucrados en el proceso.

#### INICIACION:

La iniciación de la síntesis de proteínas se define como la secuencia de eventos que conducen a la formación del complejo ternario 80S-met-tRNA-mensajero, es decir el complejo de iniciación (9).

Se han purificado gran número de factores de iniciación a partir de reticulocitos de conejo (10,11,12,13,14,15,116,17,18,19,20), hígado de rata (21,22), hígado bovino (11,23), células Hela (24,25), germen de trigo (26,27,28,29), etc.

La reacción de iniciación procede a través de 4 pasos intermedios:

- 1) Formación de un complejo ternario: eIF2- GTP - met-tRNA<sub>i</sub>
- 2) Transferencia del complejo ternario a la subunidad 40S
- 3) Unión del mensajero al complejo
- 4) Unión de la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S.

En la figura se observa la secuencia de eventos que ocurren durante la iniciación (30).

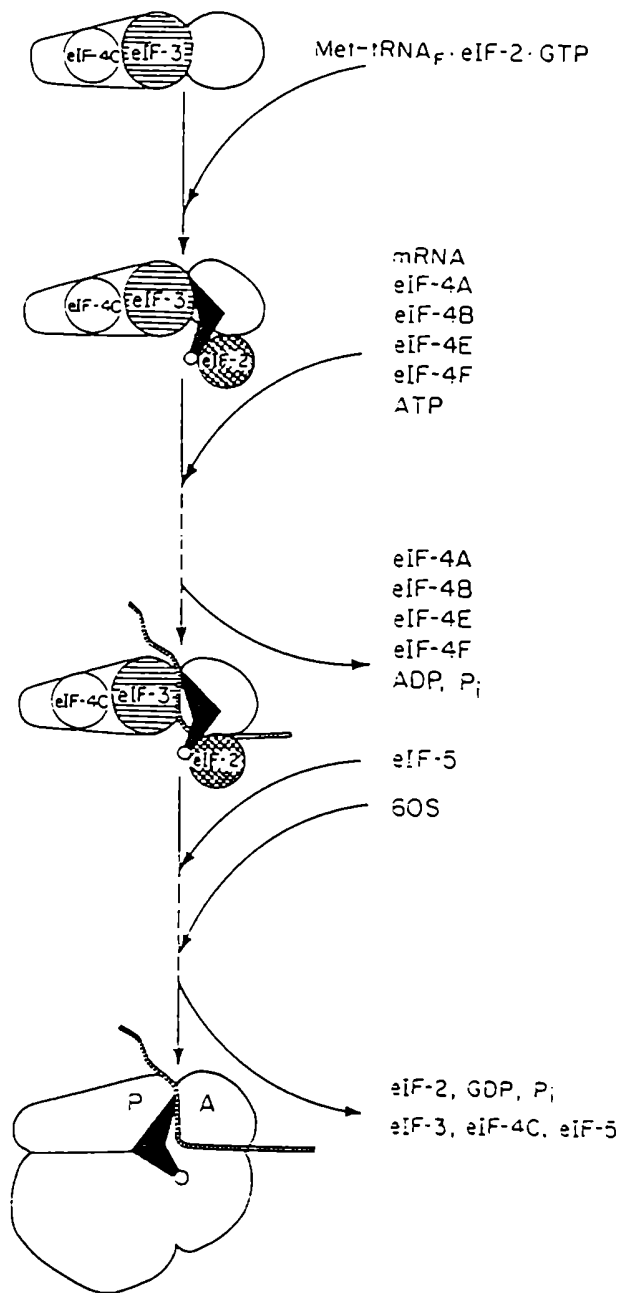


FIGURA C: Secuencia de eventos durante la iniciación en eucariotas. Tomado de Spirin, A. "Ribosome Structure and Protein Synthesis".

## ELONGACION:

Durante esta etapa se agregan aminoácidos sucesivamente según la secuencia de codones especificada en el mensajero. Comprende una serie de eventos que se repiten cíclicamente (31), que se describen a continuación.

### 1) UNION DE UN AMINOACIL tRNA AL SITIO A DEL RIBOSOMA:

El aminoacil tRNA está especificado por el codón del mensajero, también ubicado en el sitio A. La reacción requiere factores solubles, (eEF1) y GTP.

### 2) FORMACION DEL ENLACE PEPTIDICO:

la transferencia del péptido naciente ubicado en el sitio P al grupo  $\text{NH}_2$  del aminoacil tRNA que se encuentra en el sitio A es catalizada por la enzima peptidil transferasa, localizada en la subunidad ribosomal mayor. La reacción no requiere factores proteicos ni GTP.

### 3) TRANSLOCACION:

Involucra el movimiento relativo del mensajero y el ribosoma. Como consecuencia de este proceso, el ribosoma se mueve un triplete a lo largo del mensajero en dirección  $5' \rightarrow 3'$ , el peptidil tRNA pasa del sitio A al P y se libera el tRNA que ha quedado deacilado en el sitio P. La reacción requiere factor de elongación eEF2 y GTP.

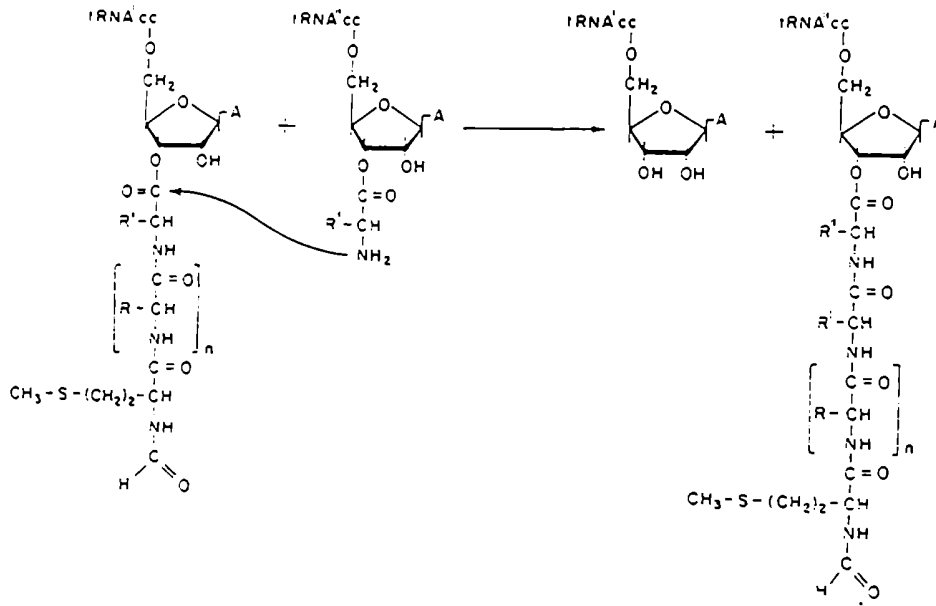


FIGURA D: Esquema de transpeptidación en el ribosoma.

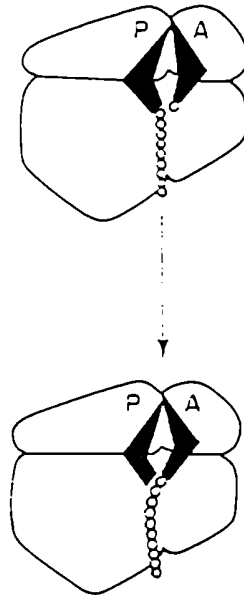


FIGURA E: Esquema de la traslocación en el ribosoma.  
Tomado de Spirin, A. "Ribosome Structure and protein Synthesis".

## TERMINACION:

Es la etapa en la cual el péptido terminado se libera al citoplasma. Esto tiene lugar cuando durante el movimiento relativo del ribosoma y el mensajero aparece un codón de terminación, que no codifica para ningún aminoácido, en el sitio A del ribosoma (32). Requiere la presencia de un solo factor soluble y GTP.

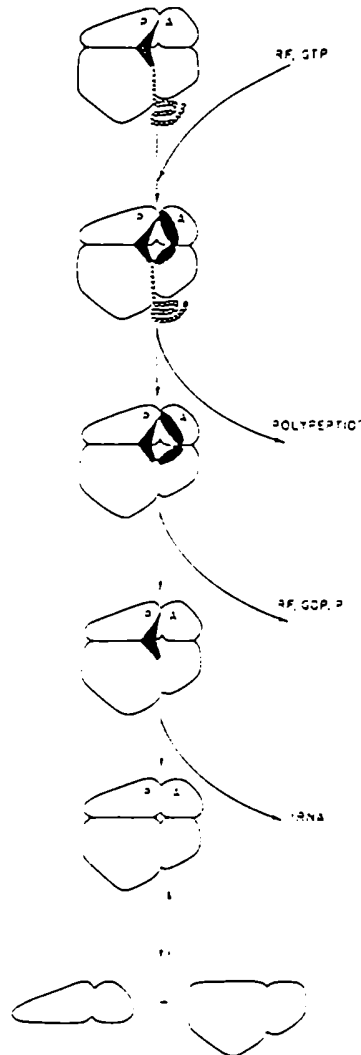


FIGURA F: Secuencia de eventos durante la terminación de la traducción.  
Tomado de Spirin, A. "Ribosome Structure and Protein Synthesis".

## 2- REGULACION DE LA SINTESIS PROTEICA

Las células tienen gran capacidad de variar la expresión de los genes. Pueden variar la cantidad de proteínas que producen de acuerdo a las necesidades de la célula.

Gran parte de la regulación de la expresión genética ocurre a nivel transcripcional. Por ejemplo por presencia de promotores con mayor o menor poder de dirigir la síntesis de RNA, mecanismos de represión o inducción de enzimas, etc.

Existe otra serie de procesos de regulación a nivel síntesis proteica. La variación en la cantidad de aminoácidos, tRNA, mRNA, ribosomas, factores de iniciación, elongación o terminación determina cambios en la traducción.

Hay múltiples mecanismos por los cuales se regula la traducción:

### 1) Cambios a nivel tRNA

Se describió en células infectadas con virus. Estos usan codones poco utilizados por la célula huésped. Algunas veces los virus destruyen un tRNA abundante que usa la célula huésped pero ellos no, y por lo tanto el aparato de síntesis proteica funciona para el virus y no para la célula.

### 2) Regulación a nivel mRNA

a) En ciertas circunstancias los mensajeros pueden ser secuestrados por proteínas que impidan su traducción.

b) Distintos mensajeros presentan diferentes grados de afinidad por los ribosomas. Los más afines inician más frecuentemente y por lo tanto se traducen más en proteínas.

### 3) Ribosomas

Los ribosomas pueden modular la cantidad de polipéptidos producidos. Si el ensamble de las subunidades ribosomales no es perfecto, la síntesis proteica transcurre a menor velocidad, y la frecuencia de iniciación disminuye porque el reconocimiento de los mensajeros es menos eficiente.

### 4) Factores de traducción

Los factores también pueden regular la síntesis proteica. Hay factores que pueden reconocer a ciertos mensajeros con mayor afinidad que a otros, regulando así también la síntesis proteica (33, 34, 35 36).

La modificación de factores, por ejemplo por toxinas bacterianas o vegetales puede regular cuantitativamente la síntesis proteica,



pudiendo llegar a extremos en los que se detiene la traducción, por ejemplo por modificación química de factores de elongación.

5) Modulación de la síntesis proteica por ácidos ribonucleicos  
Se han descrito una serie de RNAs de bajo peso molecular (6-14 kDa) capaces de modular la traducción en eucariotas. Algunos, aislados por ejemplo de reticulocitos de conejo, estimulan la traducción de manera no específica (37). Otros, por ejemplo de *Artemia salina* (38) hígado de rata (39) y músculo de embrión de pollo (40) inhiben la traducción.

Existen varias clases diferentes de este tipo de inhibidores; uno de ellos, rico en ácido uridílico, llamado tRNA, ha sido aislado de músculo de embrión de pollo e inhibe en forma discriminatoria la traducción (40). En cambio, el que se aísla de *Artemia salina* inhibe la traducción de manera inespecífica (41,36).

En músculo de embrión de pollo se ha caracterizado otro RNA que inhibe la traducción. Se encuentra en el citoplasma como una ribonucleoproteína de 10S y contiene RNAs (iRNA) de 4S que ejercen su efecto a nivel iniciación. Estos RNAs de 70-90 nucleótidos tienen muy poca estructura secundaria.

### 5.1) Interferón

Los interferones son una familia de glicoproteínas secretadas por células infectadas por virus, cuyo principal efecto biológico es producir un estado antiviral en células no infectadas (41,42).

En células humanas existen tres tipos antigénicamente distintos:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Los tipos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden ser inducidos en células animales por varios agentes, por ejemplo ciertos virus, bacterias y RNA doble cadena virales o sintéticos (41). El interferón es inducido en células linfoides por mitógenos y por antígenos (42).

En la figura H se esquematiza la inducción de enzimas producida por interferón en células animales.

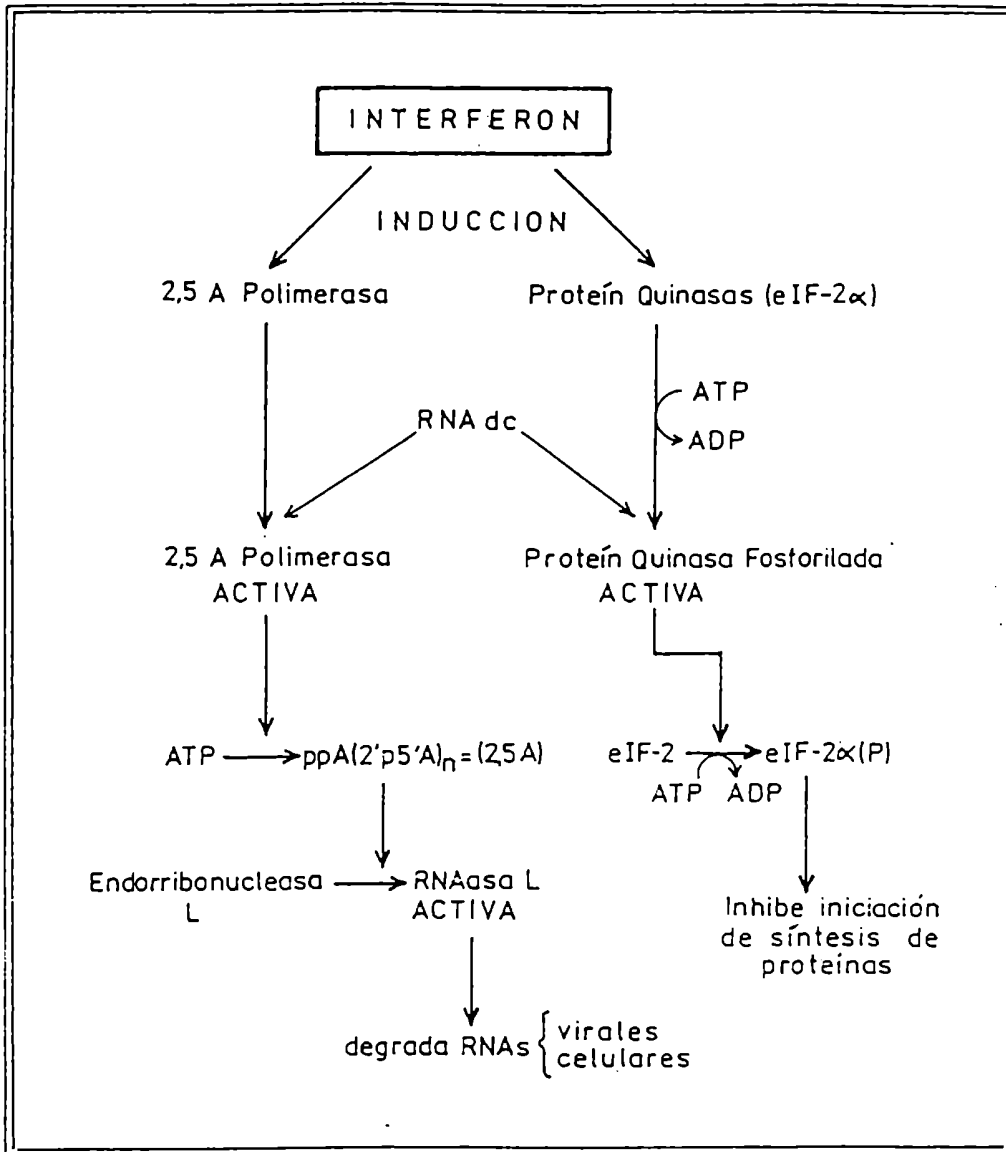
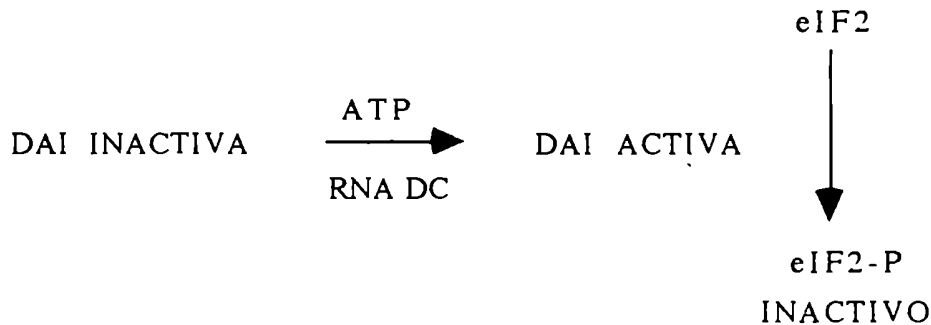


FIGURA G: Esquema de inducción de enzimas producido por interferón.

## 5.2) Control de la iniciación por kinasa de eIF2

Es ampliamente conocida la existencia de kinasas dependientes de RNA doble cadena. Estos RNA doble cadena actúan como inhibidores de la síntesis proteica induciendo la fosforilación del factor eIF2. El mecanismo de inhibición involucra la activación de una kinasa específica.

Esta enzima, aislada de extractos de reticulocitos, se la llamó DAI (44,45,46,47).



Una enzima con función similar ha sido hallada en células eritroides. En este último caso se induce por tratamiento con interferón. El único sustrato fisiológico de esta kinasa es eIF2, que es fosforilado por la enzima en su subunidad alfa.

En células infectadas por virus la inducción de esta kinasa y su activación por RNA doble cadena y la resultante inhibición de la síntesis proteica es uno de los mecanismos en la acción antiviral del interferón.

La kinasa dependiente de RNA doble cadena se activa por preincubación con RNA en presencia de ATP, este proceso es acompañado por autofosforilación de la enzima.

Un modelo para la autofosforilación involucra la unión de múltiples moléculas de la kinasa a una molécula de RNA doble cadena, seguida

de la fosforilación intermolecular en la cual una molécula unida al RNA doble cadena fosforila a su vecina (48).

#### 6) Metilación

Es bien conocido el hecho de que la eficiencia de traducción de un mensajero disminuye si se inhibe la metilación (43). La metilación de RNA virales está disminuida en células tratadas con interferón (42); este mecanismo permite entonces inhibir la traducción de mensajeros virales.

#### 7) Regulación por hemina

La principal función de los reticulocitos, inmediatos precursores de los eritrocitos, es la síntesis de globina, la proteína componente de la hemoglobina. Óptimas concentraciones de hemina (20-40  $\mu\text{M}$ ) mantienen la síntesis proteica por períodos prolongados. En ausencia de hemina se activa un inhibidor de la iniciación de la síntesis proteica llamado HCR, que es una proteína de 90 kDa que se fosforila y cataliza la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , inhibiendo la iniciación.

### 3- SINTESIS PROTEICA: PROCARIOTAS vs EUCARIOTAS

Una diferencia clave entre procariotas y eucariotas concierne al mecanismo básico por el cual los ribosomas se unen al mRNA. Mientras que los ribosomas de procariotas entran directamente al AUG del codón iniciador o en la cercana región de Shine-Dalgarno (49), los ribosomas de eucariotas entran por el 5' del mensajero y avanzan hasta el AUG iniciador (50).

Otra diferencia importante es la prevalencia del mRNA policistrónico en procariotes vs los mRNA monocistrónicos de los eucariotas. Mientras que el contacto inicial entre ribosomas bacterianos y mRNA no requiere factores de iniciación (51), la unión de ribosomas eucariotas con el mRNA requiere ATP y un considerable número de factores proteicos (52).

Otra diferencia es que en procariotas la subunidad menor del ribosoma se une al mRNA en la región de Shine-Dalgarno antes de la unión del met-tRNA iniciador (53), mientras que en eucariotas la subunidad menor del ribosoma se une establemente al mRNA sólo después de que se haya unido el met-tRNA iniciador.

Entre procariotas y eucariotas hay más diferencias que similitudes en cuanto a mecanismos de regulación de la traducción.

En los procariotas (54,55) hay dos mecanismos ampliamente distribuidos:

a) represión de la traducción por proteínas que unen al mRNA (56,57).

b) regulación vía cambios en la conformación del mRNA que expone sitios de unión al ribosoma, previamente secuestrados. Los cambios conformacionales pueden deberse a una proteína activadora (58,59) o a la traducción de una región anterior del mRNA (60,61,62), o por procesamiento endonucleolítico del transcrito (63) o por cambios en el sitio de iniciación de la transcripción (64).

En eucariotas, por otro lado, no se ha descrito regulación por cambio de conformación del mRNA y se han descrito escasos ejemplos de proteínas represoras de la traducción.

#### 4- INHIBIDORES DE LA SINTESIS PROTEICA

En los últimos años se han desarrollado ampliamente estudios relacionados con selectividad, sitio y modo de acción de inhibidores de la traducción.

El proceso de síntesis proteica puede ser arbitrariamente dividido en:

a) reacciones tempranas de la síntesis proteica.

b) etapas que ocurren a nivel ribosomal(65)

Los inhibidores de las reacciones tempranas de la síntesis proteica incluyen:

1) aquellos inhibidores de la formación del aminoacil tRNA: inhibidores de la activación de aminoácidos, análogos de aminoácidos que específicamente reemplazan o compiten con los correspondientes aminoácidos., como por ejemplo borrelidina, furanomicina y minosina, que específicamente inhiben la síntesis del treonil, isoleucil y fenil-alanil tRNA respectivamente.

2) Inhibidores que son transferidos al tRNA llevando a la síntesis de proteínas anormales.

Sin embargo, considerando especificidad, selectividad y permeabilidad de los inhibidores de la síntesis proteica, los compuestos más importantes están indudablemente incluidos dentro del amplio grupo de inhibidores de la traducción a nivel ribosomal.

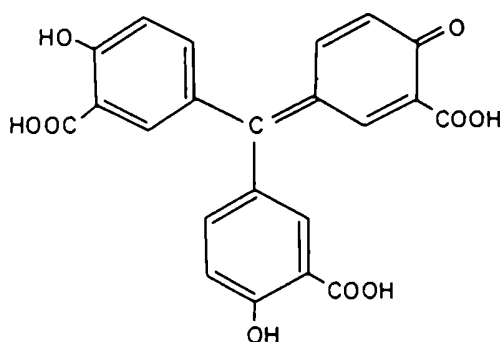
Sin embargo existe un gran número de inhibidores que poseen efectos pleiotrópicos e inhiben más de una reacción, dando cuenta de la complejidad de la interrelación maquinaria de síntesis proteica-inhibidores.

Otra clasificación de inhibidores de la traducción, los agrupa convenientemente en inhibidores de la iniciación, elongación o terminación, de acuerdo con los eventos funcionales que perturban.

#### 4.1- INHIBIDORES DE INICIACION

Agrupación a los inhibidores que impiden la formación del complejo entre ribosomas, RNAm y metionil tRNA.

En la presente investigación se utilizó el ácido aurintricarboxílico. (ATA)

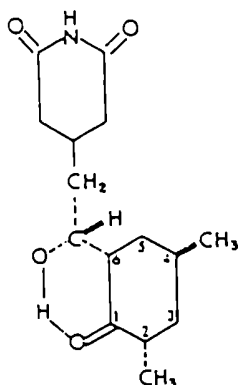


ATA es una molécula orgánica que afecta la formación del complejo de iniciación (66). Interactúa con la subunidad 40S y evita el reconocimiento del RNAm, también impide la formación del complejo ternario eIF2-met-tRNA-GTP.

#### 4.2- INHIBIDORES DE ELONGACION

Agrupación a los inhibidores que interfieren en los eventos de elongación, que involucran: unión del tRNA al ribosoma, formación de unión peptídica y traslocación.

En este estudio se ha utilizado cicloheximida.



Esta droga fue aislada inicialmente de Streptomyces griseus en mezcla con estreptomicina (67).

El mecanismo de acción fue ampliamente estudiado. La cicloheximida inhibe la formación de la unión peptídica en células eucariotas (68) y en sistemas libres de células (69,70,71,72,73).

Inhibe la síntesis proteica de un amplio rango de células eucariotas y sus extractos pero no inhibe células procariotas. Más aún, no inhibe la síntesis proteica de la mitocondria intacta o de sus extractos.

#### 4.3- INHIBIDORES DE TERMINACION

La terminación de la traducción comienza cuando un codón sin sentido es reconocido, determinando entonces la interacción de los factores de liberación del ribosoma.

Se han caracterizado diversos factores de terminación de la traducción tanto en sistemas procariotas como eucariotas, siendo negamicina el inhibidor de la terminación más estudiado.

## OBJETIVOS

En estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la síntesis proteica de tripanosomátidos, se ha encontrado que los sistemas de traducción *in vitro* obtenidos a partir de Leishmania mexicana eran inactivos, tanto con sus RNA mensajeros endógenos como con mensajeros exógenos sintéticos.

A partir de estos resultados se ha iniciado una búsqueda de una actividad inhibitoria de la traducción en extractos de Leishmania mexicana.

Los estudios preliminares indicaron la existencia de un inhibidor que es capaz de reducir considerablemente la síntesis proteica de otro sistema (Crithidia fasciculata) tomado como referencia.

En este estudio se utilizarán como referencia de síntesis proteica, los extractos de germen de trigo y de hígado de rata, y se investigarán las propiedades bioquímicas del inhibidor.

El objetivo de este trabajo es la caracterización del inhibidor de la traducción aislado de extractos de Leishmania.



MATERIALES Y METODOS

### DESCRIPCION DE LAS CEPAS:

- a) Formas promastigotes de Leishmania mexicana mexicana aisladas originalmente por el Dr. Rodrigo Zeledón (Universidad de Costa Rica).
- b) Crithidia fasciculata(ATCC 11745).

### MEDIOS DE CULTIVO:

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

#### Medio BHT:

Posee una composición en gr/l de: infusión de cerebro-corazón, 33; triptosa, 3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,2; KCl, 0,4; glucosa, 0,3; hemina, 20 mg; suero fetal bovino, 20% del volumen final.

### CONDICIONES DE CULTIVO:

Los parásitos se cultivaron aeróbicamente a 24°C (L.mexicana) o a 28°C (Crithidia fasciculata) en un incubador con agitación rotatoria. El incremento en el número de organismos se determinó por conteo en cámara de Neubauer.

### REACTIVOS RADIOACTIVOS:

Se utilizó metionina S<sup>35</sup> y fenilalanina C<sup>14</sup>

### PREPARACION DE LOS EXTRACTOS Y OBTENCION DE LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES:

Para una preparación estandar se cosechan 1000 ml de un cultivo en fase exponencial de L.m. o C.f. cuya densidad celular va de 30 a 60 millones de células por mililitro. Los parásitos se rompen congelando y descongelando 5 veces en nitrógeno líquido, y se resuspenden en 25 ml de buffer de lisis (Tris-Cl, 20 mM pH 7,5; AcO<sub>2</sub>Mg, 1 mM; KCl, 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 3 mM; sacarosa, 250 mM; β-mercaptoetanol, 5 mM) de manera de obtener una concentración de aproximadamente 2000 millones de parásitos por mililitro.

La suspensión se centrifuga a 12000 x g durante 15 minutos para sedimentar restos celulares, organelas y núcleos. Se recupera el sobrenadante y se dializa contra 1 litro de buffer de diálisis (Tris-HCl

20 mM pH 7,5; Ac<sub>2</sub>Mg 1mM; KCl 50 mM; ) durante 3 horas. El extracto obtenido se denomina fracción S12.

Parte de la fracción S12 se ultracentrifuga a 45000 rpm durante 3 horas a 4 °C. El sobrenadante resultante de la centrifugación se denomina S150. El pellet obtenido , denominado fracción ribosomal, se resuspende en buffer de ribosomas (Tris-Cl 20 mM pH7,5; Ac<sub>2</sub>Mg 1 mM; KCl 100 mM; DTT 2 mM).

La suspensión de ribosomas se lleva a 0,5 M de NH<sub>4</sub>Cl y se deja en frío con agitación durante toda la noche. Los ribosomas lavados se recuperan ultracentrifugando a 45.000 rpm durante 3 horas en frío. El pellet recuperado se resuspende en un volumen igual al original de buffer de ribosomas. El sobrenadante , denominado líquido de lavado de ribosomas se dializa contra 1 litro de buffer de diálisis durante 3 horas en frío.

### OBTENCION DEL EXTRACTO DE GERMEN DE TRIGO

Se muelen 3 gr de germen de trigo General Mills en un mortero (74). Se agregan 18 ml de buffer de molienda (KCl, 90 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2mM; Ac<sub>2</sub>Mg, 1 mM), se homogeiniza la suspensión y se centrifuga a 11.000 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega Tris-HCl pH 7,4 hasta llegar a una concentración de 20 mM, y Ac<sub>2</sub>Mg (2 mM final). Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se dializa contra buffer de diálisis durante 3 horas. Todas las operaciones se realizan en frío.

### PREPARACION DE DISTINTOS EXTRACTOS A PARTIR DE HIGADO DE RATA

#### Preparación de S150 de hígado de rata:

Se realizó según el método descrito por Blobel y Potter (75). Se decapita una rata de 200 gr con guillotina. Rápidamente se le extrae el hígado y se lo coloca en una solución de sacarosa 0,25 M a 0°C. Se desmenuzan los hígados con tijeras estériles y se suspenden en dos volúmenes de sacarosa 0,25 M en Tris 50 mM pH 7,5, ClK 50 mM, Ac<sub>2</sub>Mg 5 mM (TKM). La homogeinización se realiza mediante 10 a 12 golpes en homogeinizador de vidrio con émbolo de teflón accionado con motor. La suspensión resultante se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min. Se recoge el líquido sobrenadante y se lo ultracentrifuga durante 3 horas a 50.000 rpm. El sobrenadante resultante se denomina fracción S150.

### Preparación de polisomas libres a partir de hígado de rata:

Se decapita una rata con guillotina. Se le extrae el hígado y se lo coloca en una solución de sacarosa 0,25 M. Se desmenuza con tijera y se suspende en 4 volúmenes de sacarosa que contiene 10% de fracción S150, Tris 50 mM pH 7,5, KCl 250 mM,  $\text{Ac}_2\text{Mg}$  5 mM. Se homogeneiza en homogeneizador de vidrio, y se trata la suspensión con alfa amilasa cristalina (10 unidades/ml de extracto de hígado) y 0,1 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  durante 15 min. a 4°C. Luego se centrifuga a 1500 rpm por 2 a 4 min. descartando el pellet. El sobrenadante se centrifuga nuevamente a 23.000 rpm durante 20 min. y se separa cuidadosamente el sobrenadante, que contiene los polisomas libres del pellet de microsomas.

Al sobrenadante de la centrifugación anterior se le agrega Tritón X 100 y deoxicolato, hasta concentraciones finales de 1 y 0,5 % respectivamente. Después de mezclar cuidadosamente se centrifuga 5 min. a 13.000 rpm y se recoge el sobrenadante (fracción de polisomas libres), que es luego purificado por centrifugación a través de un gradiente de capas de sacarosa preparadas de la siguiente forma:

- 3 ml de sacarosa 1,38 M con S150 ( 10 ml de sacarosa 2,3 M en TKM + 8 ml de S150), y DTT 2mM
- 2ml de sacarosa 2 M con S150 (10 ml de sacarosa 2,3 M en TKM + 1,5 ml de S150).

Sobre ellas se coloca la fracción de polisomas y se centrifuga 12 hs en Spinco a 48.000 rpm. Los pellets de polisomas obtenidos se lavan con buffer Tris 10 mM pH 7,5; KCl 10 mM, acetato de magnesio 1,5 mM.

### ENSAYO DE SINTESIS PROTEICA IN VITRO

Se utilizaron dos sistemas alternativos de síntesis proteica:

#### a) Síntesis proteica en germen de trigo con poli U como mensajero exógeno:

La reacción se realiza en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  que contiene los siguientes componentes:

- Energía: buffer Hepes 25 mM, pH 7,5; ATP, 1,25 mM, GTP, 0,25 mM; creatina fosfato, 10 mM; creatinafosfoquinasa, 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- Acetato de potasio, 80 mM.
- Acetato de magnesio, 6 mM.
- tRNA de germen de trigo, 0,5 mg/ml
- fenilalanina  $\text{C}^{14}$ , 0,14  $\mu\text{Ci}$  (497,6 mCi/mmol)
- germen de trigo, 15  $\mu\text{l}$

- ácido poliuridílico, 0,5 mg/ml
- buffer de diálisis, 15  $\mu$ l.

b) Síntesis proteica en un sistema de hígado de rata:

La reacción se realiza en un volumen de 50  $\mu$ l con los siguientes componentes:

- Energía: igual composición que en a).
- Mezcla de 19 aminoácidos (sin metionina), 0,03 mM cada uno
- DTT, 2,5 mM
- Acetato de potasio, 75 mM
- Acetato de magnesio, 3 mM
- Metionina, 1  $\mu$ M
- Metionina S<sup>35</sup>, 1  $\mu$ Ci (11,55 mCi/mmol)
- Fracción sobrenadante de 150.000 del extracto de hígado de rata, 5  $\mu$ l.
- Fracción de polisomas de hígado de rata, 10  $\mu$ l (O.D.<sub>260</sub> = 168 unidades por ml).
- buffer de diálisis hasta completar los 50  $\mu$ l.

La reacción de síntesis proteica se produce por incubación durante 30-60 min. a 30°C.

Procesamiento de muestras:

Finalizada la incubación se diluyen las muestras en 0,5 ml de agua que contiene fenilalanina fría (a) o metionina fría (b), y 100  $\mu$ g/ml de albumina, luego se agrega NaOH hasta una concentración final de 0,5 M, se incuba 15 min. a 30°C y se precipitan las proteínas agregando TCA hasta concentración final 10%. La suspensión se filtra por Millipore (0,45  $\mu$ m de diámetro de poro), se lava con TCA 8% y los filtros se secan al aire. Se determina la radioactividad incorporada con un contador de centelleo líquido utilizando tolueno-PPO dimetil POPOP como mezcla centelladora.

ESTUDIOS CINÉTICOS:

Se realiza un ensayo de síntesis proteica como se describió previamente. Luego de 10 min. de incubación a 30°C se agrega cicloeximida (1 mM) o ATA (0,1 mM) o distintas fracciones del extracto de Leishmania, se continua la incubación durante 20-30 min., se toman alícuotas a distintos tiempos y se procesan las muestras determinándose la incorporación de radioactividad en proteínas.

Para estudiar en detalle el sitio de inhibición se realizan ensayos de aminoacilación y de polimerización a partir de fenilalanil tRNA en presencia o ausencia del inhibidor de Leishmania:

#### Preparación de aminoacil tRNA:

La mezcla de reacción contiene los siguientes componentes por ml:

- Phe C<sup>14</sup>, (300 Ci/mol), 1,25  $\mu$ Ci
- Acetato de magnesio, 10 mM
- Tris-acetato 43 mM pH 7,5
- Cloruro de potasio, 30 mM
- ATP, 1,3 mM
- Creatina fosfato, 10 mM
- Creatina fosfo kinasa, 53  $\mu$ g
- DTT, 6 mM
- tRNA de germen de trigo, 1 mg
- S150 de germen de trigo, 0,06 ml.

La mezcla de reacción se incuba 30 min. a 30°C. El phe C<sup>14</sup> tRNA formado en esta incubación se purifica por precipitación con etanol. El precipitado obtenido se disuelve en buffer de diálisis.

#### Síntesis de polifenilalanina:

La mezcla de reacción para la polimerización contiene los siguientes componentes por mililitro:

- Tris-acetato 50 mM pH8
- Creatina fosfato, 10 mM
- Creatina fosfo kinasa, 53  $\mu$ g
- DTT, 2 mM
- Acetato de magnesio, 6.5 mM
- Acetato de potasio, 70 mM
- GTP, 100  $\mu$ M
- Poli U, 25  $\mu$ g
- Ribosomas de germen de trigo, 3-6 unidades de absorción a 260 nm por ml de ensayo
- Fenil alanil tRNA C<sup>14</sup>, 15-30 picomoles, (8000 cpm)

Se incuba la mezcla de reacción 30 min. a 30°C. Las muestras se procesan como se describió previamente.

### PERFILES RIBOSOMALES:

Para determinar si las distintas fracciones de Leishmania alteran la distribución normal de las partículas ribosomales obtenidas a partir de hígado de rata, se incubó 1 unidad de absorción a 260 nm de fracción poliribosomal con el inhibidor de Leishmania durante 30 min. a 37°C y se sembró luego sobre un gradiente lineal continuo de sacarosa de 6,6 a 45 % que se prepara sobre un "colchón" de 0,5 ml de sacarosa 50 %. La solución de sacarosa contiene buffer Hepes-KOH pH 7,5 20 mM, Ac<sub>2</sub>Mg 5 mM y Ac<sub>2</sub>K (50 mM). Después de centrifugar a 45000 rpm durante 1 hora. se midió la absorción en forma continua con un analizador UV ISCO a 254 nm.

### CARACTERIZACION DEL INHIBIDOR DE SINTESIS PROTEICA OBTENIDO DE EXTRACTOS DE LEISHMANIA

#### ENSAYO DE ACTIVIDAD RNASA:

Se realizó según el método descrito por Hawkins y Freedman (76). Se incuban 250  $\mu$ g de poli U con 5  $\mu$ M RNasa en 1 ml de buffer TKM', que contiene Tris 50 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 25 mM durante 15 min. en una cubeta de cuarzo. La actividad RNasa se determina midiendo el aumento en absorción a 260 nm en un espectrofotómetro capaz de registrar pequeños cambios sobre un alto background (se utiliza como blanco una solución de poli U de 250  $\mu$ g/ml).

#### ENSAYO DE SENSIBILIDAD A PROTEASA:

Se determinó la sensibilidad del inhibidor de la síntesis proteica a distintas proteasas:

##### a) Ensayo de sensibilidad a tripsina:

En un volumen total de 17  $\mu$ l se incuban 5  $\mu$ l de inhibidor de Leishmania con tripsina (280  $\mu$ g/ml) durante 1 hora a 37°C; luego se agrega inhibidor de tripsina tipo I-S de Soybean (2,35 mg/ml), se continúa la incubación durante 1 hora más, y se realiza luego un ensayo de síntesis proteica determinando la actividad residual del inhibidor.

##### b) Ensayo de sensibilidad a proteinasa K:

En un volumen total de 17  $\mu$ l se incuban 5  $\mu$ l de inhibidor de Leishmania con proteinasa K (120  $\mu$ g/ml) en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1

mM a 55°C durante 1 hora y luego se disminuye la temperatura a 37°C y se continua la incubación durante toda la noche. Al día siguiente se agrega PMSF (7,6 mM), que detiene la acción de la proteinasa K, y se incuba durante 1 hora a 30°C. Luego se realiza un ensayo de síntesis proteica y se determina la actividad residual del inhibidor.

#### DETERMINACION DE LA CARGA DEL INHIBIDOR:

La carga del inhibidor se determinó por cromatografía en columna (0,5 x 5 cm) de DEAE celulosa a pH en que sólo se retienen aniones . La columna se equilibró con buffer de diálisis. La fracción S150 de Leishmania se sembró en la columna, y la elución se realizó aumentando escalonadamente la concentración de KCl.

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS:

Las concentraciones de proteínas presentes en las muestras se determinaron utilizando el método descripto por Bradford.

#### TRATAMIENTO DEL INHIBIDOR CON CLORURO DE LITIO:

Se realizó según el método descripto por M. Jacket et al (77). El RNA se precipita por adición de un volumen de urea 8 M , Cloruro de litio 4 M a la fracción S150 de Leishmania calentada previamente a 70°C. Se deja toda la noche a 4°C. Se centrifuga y el pellet se lava con urea 4 M, LiCl 2 M, y se resuspende en buffer de diálisis. El RNA se precipita durante toda la noche a -20°C luego de la adición de 2 volúmenes de etanol.

#### TRATAMIENTO CON ALKALI:

Con el objeto de destruir el ácido ribonucleico se incuba la fracción S150 de Leishmania con NaOH 0,3 M durante 1 hora a 37°C. La neutralización se realiza con HCl hasta pH 7,5.



### CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR:

Durante la purificación del inhibidor se realizó una cromatografía en Sephadex G-75 empleando una columna de 1 x 120 cm. La columna se equilibró con buffer de diálisis.

El volumen de exclusión se determinó con Blue Dextran 2000.

Un mililitro de la fracción S150 se sometió a un calentamiento a 70°C durante 10 minutos, se centrifugó 10 min. a 10.000 rpm y el sobrenadante obtenido se sembró en la columna, y la elución se realizó con buffer de diálisis. Se recogieron fracciones de 1 ml.

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION 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  $\mu\text{g}$  de RNA/ml (78).

### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA:

#### a) Condiciones disociantes:

Se utilizaron geles de acrilamida 8 % (acrilamida:bisacrilamida, 19:1), 8 M urea. Se utilizó TBE 1x como buffer de corrida.

Las muestras se diluyeron en buffer de siembra (bromofenol blue, 0,25 %; glicerol, 15 %; EDTA pH 8, 0,5 mM; urea 8 M). Se las calentó 3 min. a 95°C, se sembraron y se corrieron en el gel durante 2 horas a 50 V.

La visualización de las bandas se realizó por tinción con bromuro de etidio.

Se utilizaron marcadores moleculares de RNA GIBCO.

#### b) Condiciones no disociantes:

Se utilizaron geles de acrilamida 8 %. Los geles se corrieron en buffer TBE 1 x .

Las muestras se diluyeron en buffer de siembra (bromofenol blue, 25 %; glicerol, 15 %; EDTA pH 8, 0,5 mM), se sembraron en el gel y se corrieron durante 2 horas a 50 V.

La visualización de las bandas se realizó por tinción con bromuro de etidio.

RESULTADOS

## 1- EFECTO DE EXTRACTOS DE *L. MEXICANA* Y *C. FASCICULATA* SOBRE LA SÍNTESIS PROTEICA

Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que extractos de *Leishmania mexicana* contenían una actividad inhibitoria de la traducción. Estudiamos entonces el efecto de distintos extractos de *Leishmania* sobre un sistema de síntesis proteica *in vitro* obtenido a partir de germen de trigo, y lo comparamos con extractos de *Crithidia fasciculata* preparados en foma análoga.

Como se observa en las figuras 19 y 20, distintas fracciones subcelulares de *Leishmania* produjeron una dramática inhibición de la síntesis proteica (alrededor del 90%), mientras que extractos similares de *Crithidia fasciculata* prácticamente no produjeron inhibición. Estos resultados indican que el extracto de *Leishmania* posee un potente inhibidor de síntesis proteica, que está ausente en extractos de *Crithidia fasciculata*. Los lisados de ambos parásitos corresponden al mismo número de células /ml.

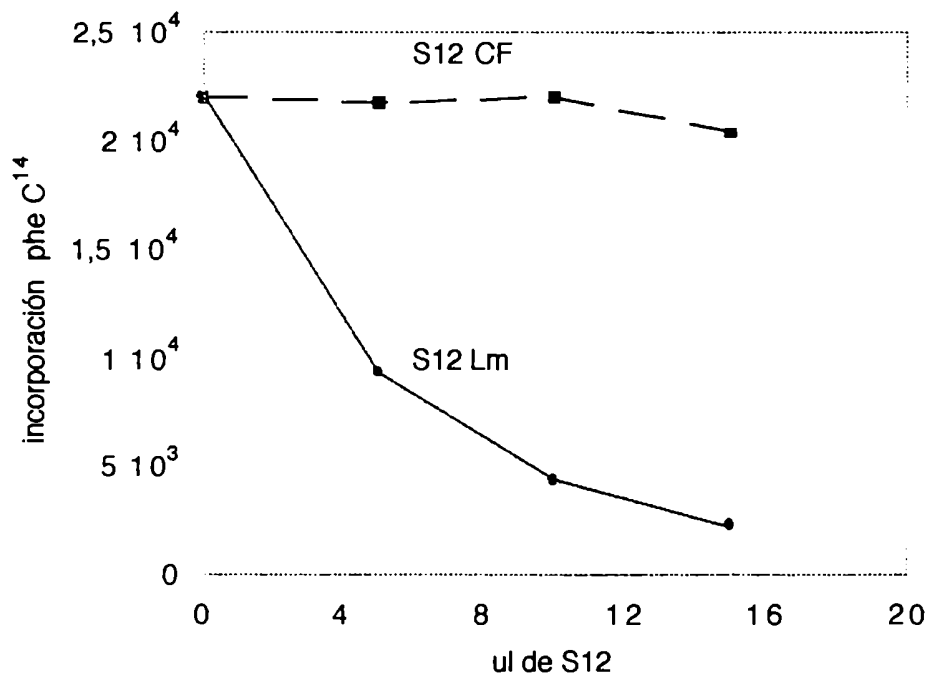


Figura 19: Efecto de la fracción S12 de *Leishmania* o *Crithidia* sobre la síntesis proteica:

Se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro* en un sistema de germen de trigo en presencia de distintas cantidades de fracción S12 de *Leishmania* o de *Crithidia*. Luego de 1 hora de incubación a 30°C, se procesan las muestras como se describe en materiales y métodos, y se mide la incorporación de radioactividad en proteínas (insoluble en TCA 10%).

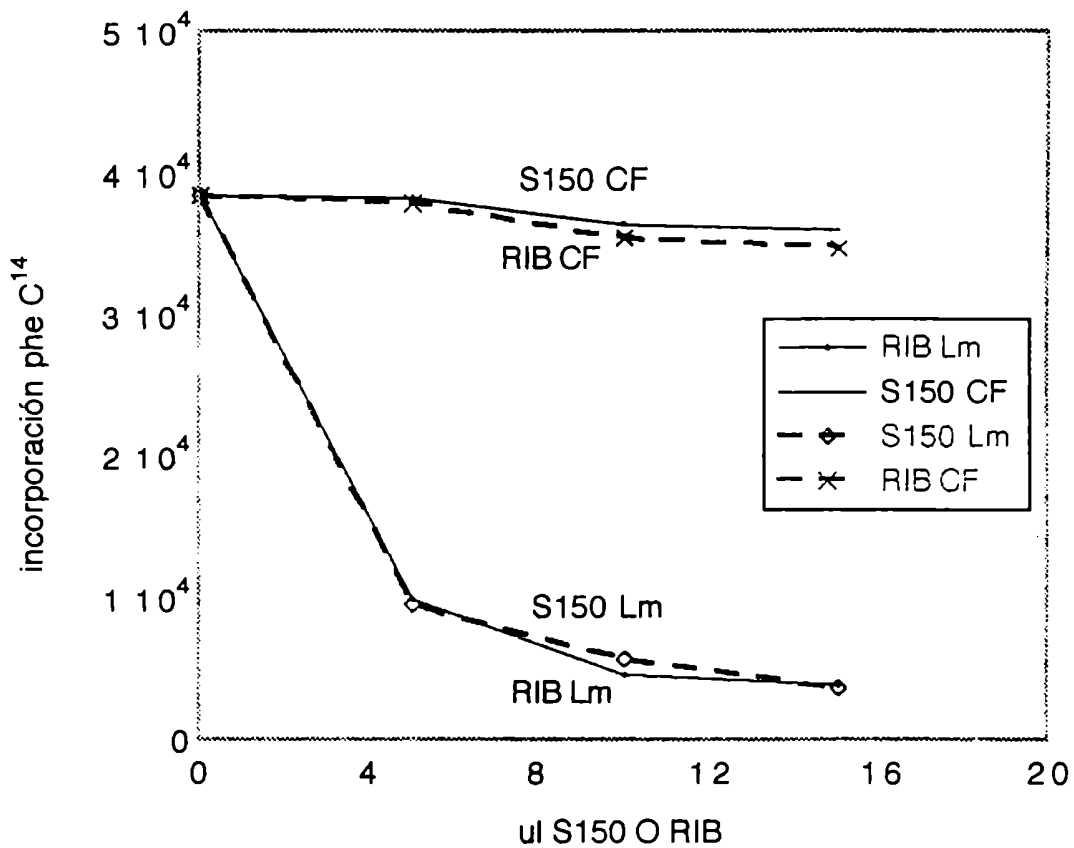


Figura 20 : Efecto de las fracciones S150 y lavado ribosomal sobre la síntesis proteica.

El experimento se realizó en forma análoga a la descrita en la figura 1 .

RIB Lm: Lavado ribosomal obtenido a partir de Leishmania.

RIB CF: Lavado ribosomal obtenido a partir de Crithidia.

NOTA: De ahora en más al referirnos al inhibidor de Leishmania en los siguientes gráficos lo llamaremos "I".

## 2- ESTUDIOS CINETICOS DE LA INHIBICION

Se analizó la cinética de inhibición de distintas fracciones del extracto de *Leishmania* sobre un sistema de síntesis proteica obtenido a partir de germen de trigo. El objetivo fue determinar a qué nivel del proceso de traducción actúa el inhibidor. Se comparó la cinética de inhibición de las fracciones de *Leishmania* con la inhibición producida por cicloheximida (1 mM), que es un inhibidor de la elongación de las cadenas polipeptídicas, y con ácido aurintricarboxílico (0,1 mM), que inhibe la iniciación de la traducción. Como se observa en la figura 21, luego del agregado de ATA se produce un lag de varios minutos antes de que la inhibición se evidencie, en cambio la cicloheximida inhibe la síntesis proteica inmediatamente después de que la droga se agrega a la reacción. La cinética de inhibición del extracto de *Leishmania* es semejante a la producida por cicloheximida.

Un experimento similar realizado en un sistema de traducción obtenido a partir de hígado de rata dio el mismo resultado (figura 22).

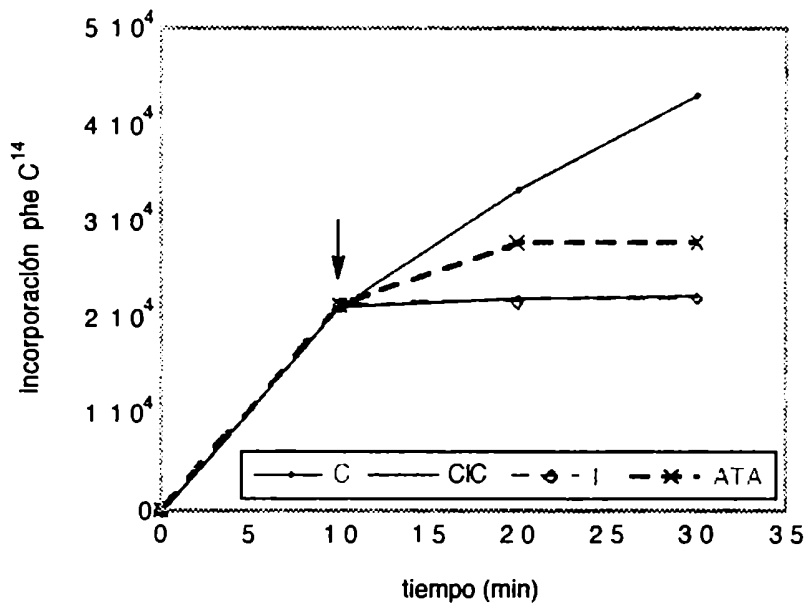


Figura 21: Cinética de inhibición.

Se realizó un ensayo de síntesis proteica *in vitro* a partir de un extracto de germen de trigo. Luego de 10 min. de incubación se agregan 10  $\mu$ l de la fracción S150 de *Leishmania*, cicloheximida 1 mM o ATA 0,2 mM. Se toman alícuotas a distintos tiempos y se mide la incorporación de radioactividad en proteínas. C, control sin inhibidor; CIC, cicloheximida; I, inhibidor de *Leishmania*; ATA, ácido aurintricarboxílico. La flecha indica el momento en que se agrega el inhibidor de *Leishmania*, cicloheximida o ATA según corresponda.

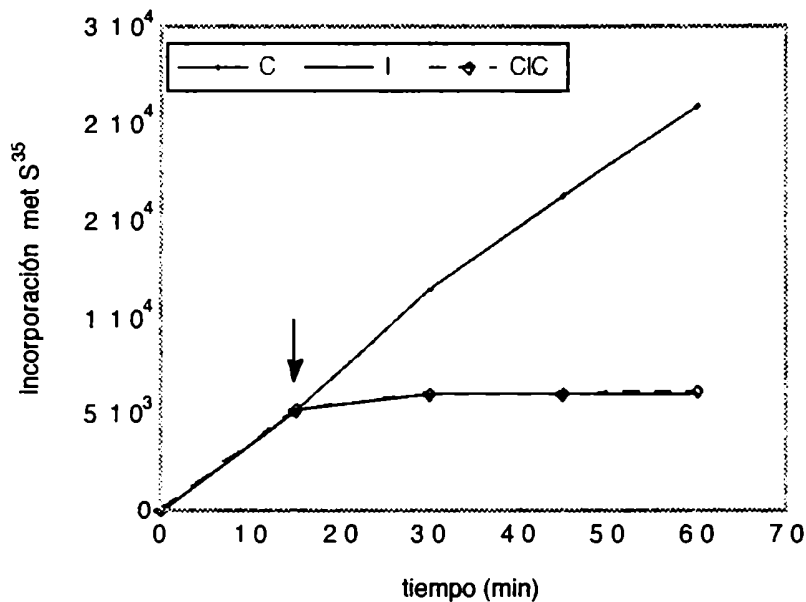


Figura 22: Cinética de inhibición.

El experimento se realizó en forma análoga a la descrita en figura 3. Se utilizó un sistema de síntesis proteica a partir de hígado de rata.

Todos los extractos de *Im* o *C.f.* se prepararon con  $2 \times 10^9$  parásitos por ml.

La flecha indica el momento en el que se agrega el inhibidor de *Leishmania* o la cicloheximida según corresponda.

Para estudiar más en detalle el sitio de inhibición se reprodujeron las distintas etapas de la síntesis proteica:

#### 1) Activación de aminoácidos:

Hicimos un ensayo de aminoacilación *in vitro*, en presencia o ausencia del inhibidor de *Leishmania*.

El inhibidor redujo la formación del phe C<sup>14</sup> tRNA en un 75-85 % como máximo. Similares resultados se obtuvieron cuando se utilizó lisina C<sup>14</sup>.

La figura 23 muestra la cinética de inhibición de aminoacilación.

#### 2) Polimerización:

A partir del fenil alanil tRNA formado, realizamos un ensayo de polimerización para obtener polipéptidos. Nos propusimos entonces determinar si el inhibidor disminuye la polimerización de aminoácidos. Para ello purificamos el phe C<sup>14</sup> tRNA obtenido en el ensayo de aminoacilación por medio de una precipitación con etanol, y realizamos un ensayo de polimerización *in vitro* en presencia o ausencia del inhibidor de *Leishmania*. El inhibidor redujo la

polimerización de aminoácidos en un 50% como máximo. Estos resultados indican que el inhibidor tiene un efecto dual: inhibe la aminoacilación y la polimerización de aminoácidos.

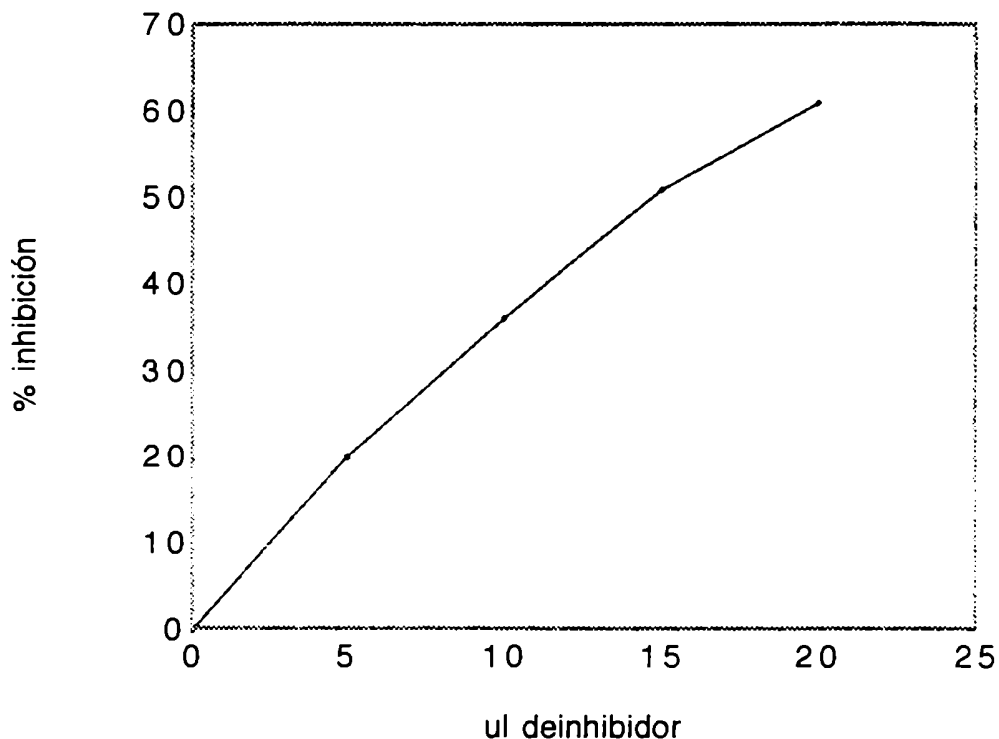


Figura 23: Cinética de inhibición de aminoacilación

Se realizó un ensayo de aminoacilación *in vitro* en presencia o ausencia de distintas dosis de inhibidor de *Leishmania* (fracción S150, diluída 10 veces en buffer de diálisis). Luego de 30 min de incubación se procesan las muestras como se describe en materiales y métodos, y se mide la incorporación de radioactividad en proteínas.

Las aminoacil tRNA sintetasas catalizan la siguiente reacción:



Nos propusimos analizar el tipo de inhibición ejercida sobre la aminoacilación. La figura 24 muestra que la inhibición es de tipo competitiva ya que el grado de inhibición depende de la concentración de tRNA. La inhibición disminuye a medida que aumenta la concentración de tRNA. Las curvas control y la realizada en presencia de inhibidor se intersectan sobre el eje Y , indicando que la inhibición desaparece si la concentración de sustrato es infinita.

Cuando realizamos el mismo experimento pero en función de la concentración creciente de fenilalanina, observamos que el porcentaje de inhibición es independiente de la concentración de aminoácido utilizada en la reacción.

Estos resultados indican que el inhibidor de Leishmania compite específicamente con uno de los sustratos de la fenilalanil tRNA sintetasa: el tRNA.

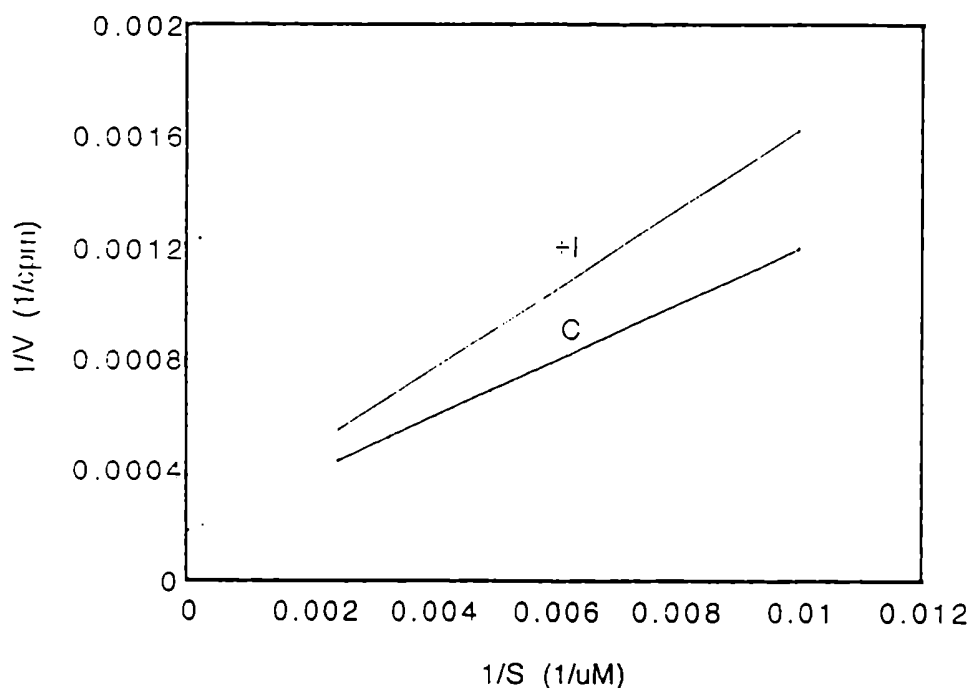


Figura 24: Efecto competitivo del inhibidor sobre la aminoacilación

Se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro* en un sistema de germen de trigo en presencia de distintas concentraciones de tRNA. Luego de 5 min de incubación a 20°C se procesan las muestras como se indica en materiales y métodos y se mide incorporación de radioactividad en aminoacil-tRNA (insoluble en TCA 10% frío). S: tRNA.



### 3- ESTUDIOS CINETICOS DE PROTECCION

Ensayos cinéticos de protección indican que los polisomas protegen parcialmente del efecto del inhibidor (figura 25), pues si éste se agrega luego de que los polisomas se hayan formado, la inhibición disminuye. Este experimento indica que el efecto máximo de inhibición se logra cuando el inhibidor está presente desde el inicio de la traducción.

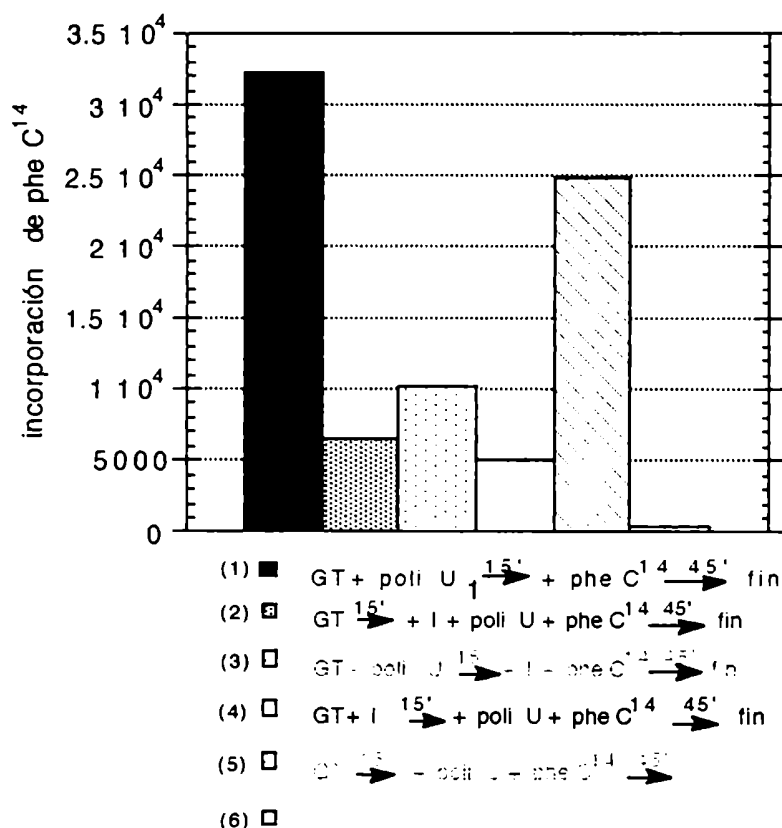


Figura 25: Los ribosomas protegen parcialmente del inhibidor

Se realizó un ensayo de síntesis proteica a partir de un extracto de germen de trigo y se determinó material precipitable por TCA en las condiciones que se describen a continuación.

- (1) Se prepara una mezcla de reacción completa en ausencia de phe C<sup>14</sup>. Luego de 15 min de incubación se agrega phe C<sup>14</sup> y se continúa la incubación durante 45 min. (control).
- (2) Se incubaba un sistema de síntesis proteica en ausencia de poli U durante 15 min. Luego se agrega phe C<sup>14</sup>, inhibidor y poli U, y se continúa la incubación 45 min.
- (3) Ensayo similar a (1) pero agregando inhibidor luego de 15 min. de incubación.
- (4) Ensayo similar a (2) pero agregando inhibidor desde el inicio de la incubación.
- (5) Ensayo similar a (4) sin el agregado del inhibidor (control).
- (6) Ensayo similar a (5) pero sin el templado de poli U (blanco).

#### 4- EFFECTO DEL INHIBIDOR SOBRE AGREGADOS POLIRIBOSOMALES

Se estudió el efecto del inhibidor de Leishmania sobre agregados poliribosomales de hígado de rata.

Como se observa en la figura 26, el inhibidor produce una leve disrupción de los polisomas. La ribonucleasa A tiene un efecto similar aunque mucho más pronunciado. Se estudió entonces si el inhibidor tiene actividad ribonucleasa. Como se observa en la figura 27, cuando se incubaba ácido poliuridílico en presencia de RNasa A se produce un aumento importante en la absorbancia a 260 nm. Este efecto hiperocrómico se debe a la ruptura del RNA en nucleótidos sueltos.

Por el contrario, la incubación de poli U en presencia de inhibidor de Leishmania no produce un aumento en la absorbancia a 260 nm, indicando que el RNA no es digerido por el extracto de Leishmania. Esto indica que inhibidor de Leishmania no tiene actividad de RNasa.

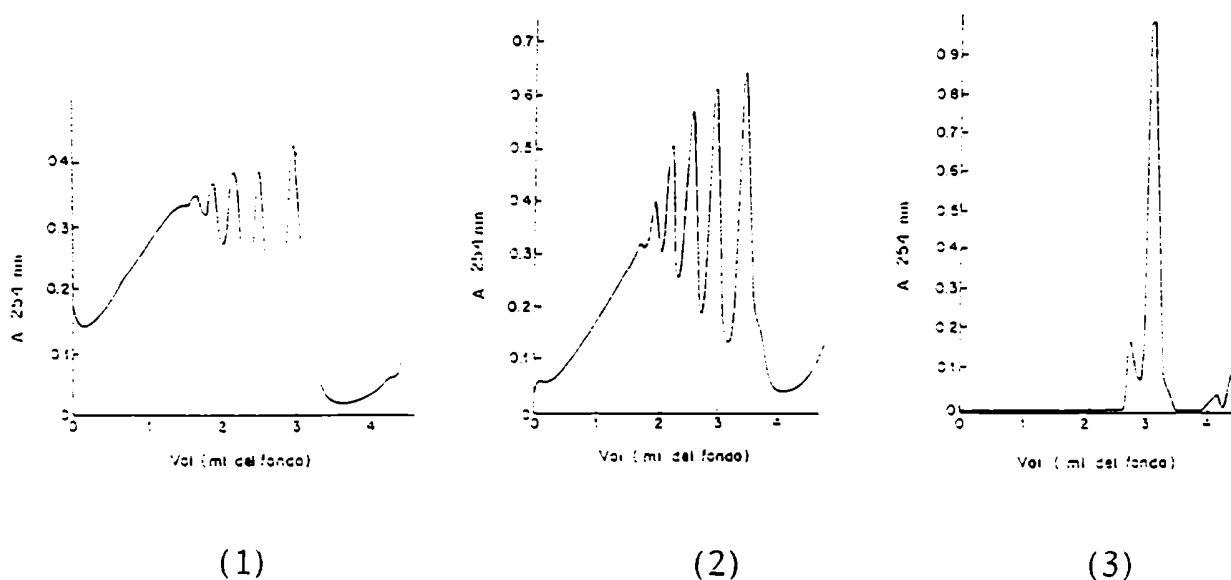


Figura 26: Perfiles ribosomales.

Se incubó una unidad de absorción a 260 nm de fracción ribosomal de hígado de rata con el inhibidor de Leishmania durante 30 min. a 37°C, y luego se siembra sobre un gradiente continuo lineal de sacarosa 6,6-45 %. Se centrifuga 1 hora a 45.000 rpm. La absorción se mide en forma continua con un analizador UV ISCO. (1) control, (2) Inhibidor, (3) RNasa 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

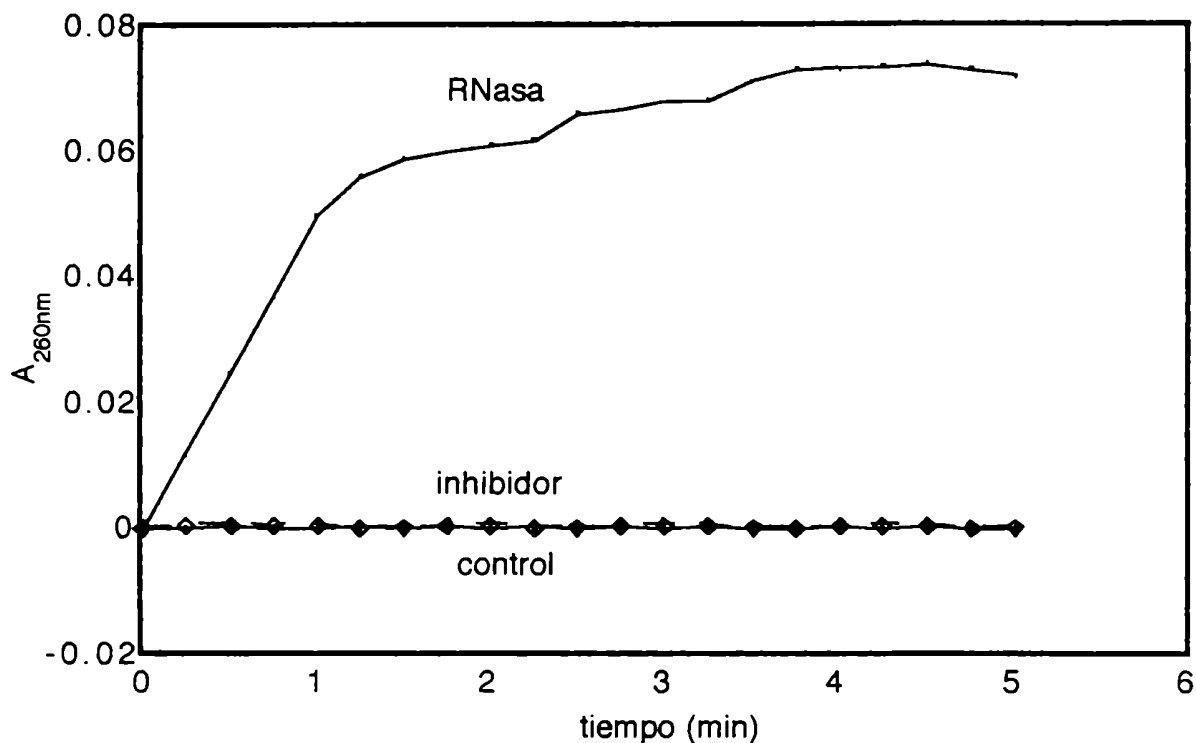


Figura 27 : Ensayo de actividad RNasa.

Se incuban 250  $\mu\text{g}$  de ácido poliuridílico en ausencia o presencia de 5  $\mu\text{M}$  ribonucleasa A o de inhibidor de Leishmania en 1 ml de buffer TKM' durante 15 min. en una cubeta de cuarzo. La reacción se realiza en un espectrofotómetro capaz de registrar pequeños cambios de A<sub>260</sub> sobre un background alto.

## 5- ESTUDIOS SOBRE LA NATURALEZA DEL INHIBIDOR

### 5.1- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL INHIBIDOR

Se estudió el efecto de distintas temperaturas sobre el inhibidor de Leishmania. La figura 28 muestra que el inhibidor es termoresistente. Conserva íntegramente su actividad luego de ser sometido a temperaturas de hasta 70°C, a temperaturas mayores disminuye levemente su actividad inhibitoria.

Esta termoresistencia que presenta el inhibidor nos permitió purificarlo 10-12 veces con respecto al extracto S150 en términos de contenido proteico, calentando a 70°C durante 15 min. Ensayos cinéticos realizados con esta fracción más purificada dieron un resultado similar al obtenido con el extracto S150.

Además, esta elevada resistencia a altas temperaturas nos hizo sospechar que el inhibidor podía no ser una proteína.

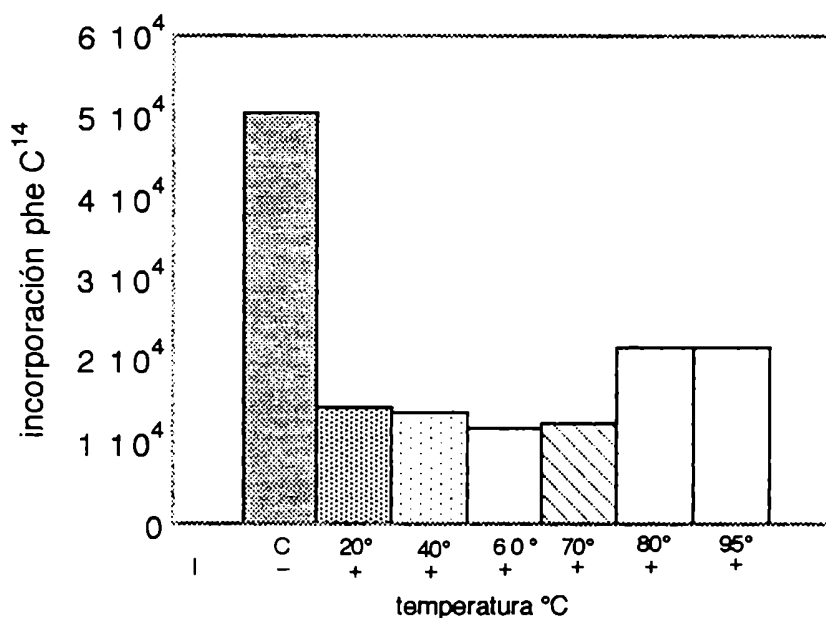


Figura 28: Efecto de la temperatura sobre el inhibidor.

Se toman alícuotas de 5  $\mu$ l a partir de la fracción S150 de Leishmania, y se incuban durante 15 min. a las temperaturas indicadas. Se centrifuga luego 5 min a 10.000 rpm, se extrae el sobrenadante y se determina la actividad residual de inhibición de 5  $\mu$ l de los sobrenadantes obtenidos.

c: control de síntesis proteica sin inhibidor. Los signos (+) y (-) indican la presencia o ausencia de inhibidor respectivamente.

## 5.2- EFECTO DE PROTEASAS SOBRE EL INHIBIDOR

Para determinar la naturaleza química del inhibidor de Leishmania, lo sometimos a tratamientos con distintas proteasas: proteinasa K (figura 29 ) y tripsina (figura 30), midiendo luego la actividad inhibitoria residual de sistemas de síntesis proteica *in vitro* obtenidos a partir de germen de trigo o hígado de rata.

En ambos casos los tratamientos con proteasas no afectaron la actividad del inhibidor. Como se ve en las figuras 29 y 30 la proteinasa K o la tripsina previamente inactivadas por PMSF o inhibidor de tripsina respectivamente, no afectan la síntesis proteica del sistema utilizado.

El tratamiento con proteinasa K tampoco eliminó la acción del inhibidor sobre un sistema de síntesis proteica de hígado de rata.

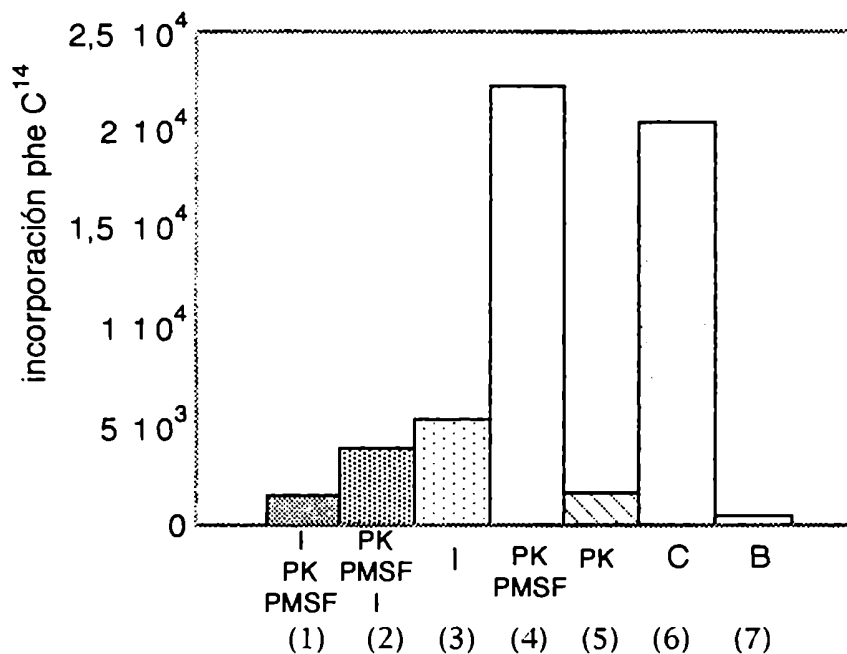


Figura 29: Efecto de la proteinasa K sobre el inhibidor.

1) Se incuban 5  $\mu$ l del inhibidor de Leishmania con proteinasa K 120  $\mu$ g/ml toda la noche a 37°C. Luego se agrega PMSF 7,6 mM, se incuba 1 hora a 30°C y se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro* en un extracto de germen de trigo como se indica en materiales y métodos.

Se realizan además todos los controles necesarios como se indica a continuación:

2) Se incuban 120  $\mu$ g/ml de proteinasa K con PMSF durante 1 hora a 30°C, luego se agrega inhibidor de Leishmania, se continúa la incubación durante 1 hora y se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro*.

3) Se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro* en presencia del inhibidor de Leishmania sin tratar.

4) Se incuban 120  $\mu$ g/ml de proteinasa K durante una hora con PMSF 7,6 mM. Luego se realiza un ensayo de síntesis proteica.

5) Se realiza un ensayo de síntesis proteica en presencia de proteinasa K.

6) Control de síntesis proteica *in vitro*.

7) Ensayo similar a 6) pero sin templado de poli U.

I: inhibidor de Leishmania

PK: proteinasa K

C: control

B: blanco

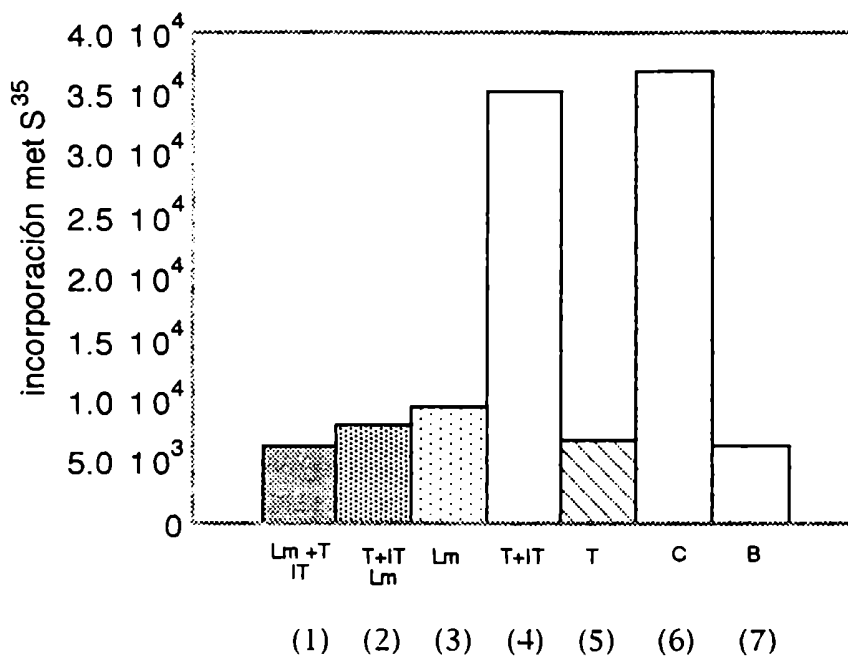


Figura 30: Efecto de tripsina sobre el inhibidor.

1) Se incuban 5  $\mu$ l de inhibidor de Leishmania con tripsina 280  $\mu$ g/ml durante 1 hora a 37°C, luego se agrega inhibidor de tripsina 2,35  $\mu$ g/ml, se continúa la incubación durante 1 hora más y se realiza un ensayo de síntesis proteica en polisomas de hígado de rata como se describe en materiales y métodos.

Se realizan además todos los controles necesarios como se indica a continuación:

2) Se incuban 280  $\mu$ g/ml de tripsina con inhibidor de tripsina durante 1 hora a 30°C, luego se agrega inhibidor de Leishmania y se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro*.

3) Se realiza un ensayo de síntesis proteica en presencia del inhibidor de Leishmania.

4) Se incuban tripsina con inhibidor de tripsina durante 1 hora a 30°C, luego se realiza un ensayo de síntesis proteica.

5) Se realiza un ensayo de síntesis proteica en presencia de tripsina.

6) Control de síntesis proteica *in vitro*.

7) Ensayo similar a 6) pero sin templado de poli U.

I: inhibidor de Leishmania

IT: inhibidor de tripsina

T: tripsina

### 5.3- EFECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA SOBRE EL INHIBIDOR

Se sometió al inhibidor a un tratamiento con N-etilmaleimida, sustancia que reacciona con grupos tioles de proteínas, para descartar aún más la posibilidad de que el inhibidor de *Leishmania* fuera de origen proteico.

La figura 31 muestra que el inhibidor no es sensible al tratamiento con esta droga ya que su poder inhibitorio no disminuye luego de la incubación con N-etilmaleimida 5 mM .

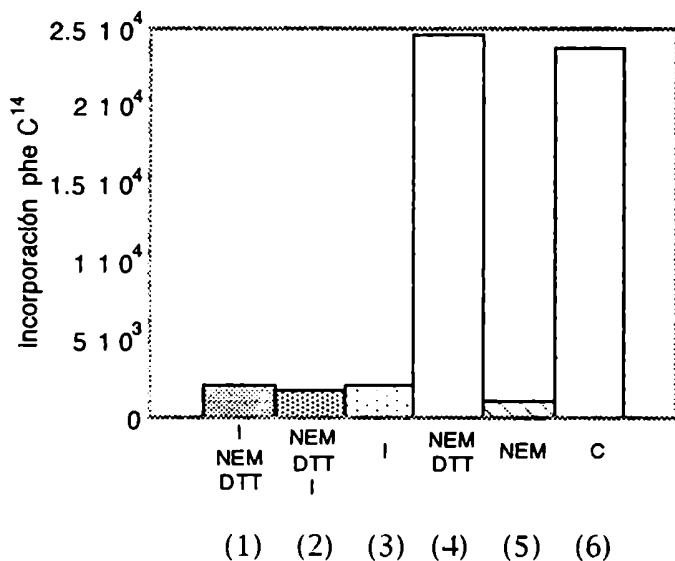


Figura 31: Efecto de N-etilmaleimida sobre el inhibidor.

1) Se incuban  $5 \mu\text{l}$  de inhibidor de *Leishmania* con N-etilmaleimida 5 mM durante 30 min. a  $30^\circ\text{C}$ . Luego se agrega DTT 10 mM, para suprimir el efecto de la N-etilmaleimida, y se realiza un ensayo de síntesis proteica *in vitro* en un extracto de germen de trigo como se indica en materiales y métodos.

2) Se incuban N-etilmaleimida 5 mM con DTT 10 mM, luego se agregan  $5 \mu\text{l}$  de inhibidor de *Leishmania* y se continúa la incubación durante 30 min a  $30^\circ\text{C}$ , y se realiza un ensayo de síntesis proteica.

3) Se realiza un ensayo de síntesis proteica en presencia de inhibidor de *Leishmania* sin tratar.

4) Control de síntesis proteica en presencia de NEM y DTT.

5) Se realiza un ensayo de síntesis proteica en presencia de NEM.

6) Control de síntesis proteica.



#### 5.4- DETERMINACION DE LA CARGA DEL INHIBIDOR

Para conocer la carga del inhibidor nos propusimos determinar la carga del mismo. Se analizó entonces su comportamiento en DEAE celulosa. Como se observa en la figura 32, el inhibidor demostró ser una sustancia cargada negativamente pues es retenida por una columna de intercambio aniónico a pH 7, y sólo puede ser eluída por un buffer que contiene  $\text{Cl}^-$  0,3 M.

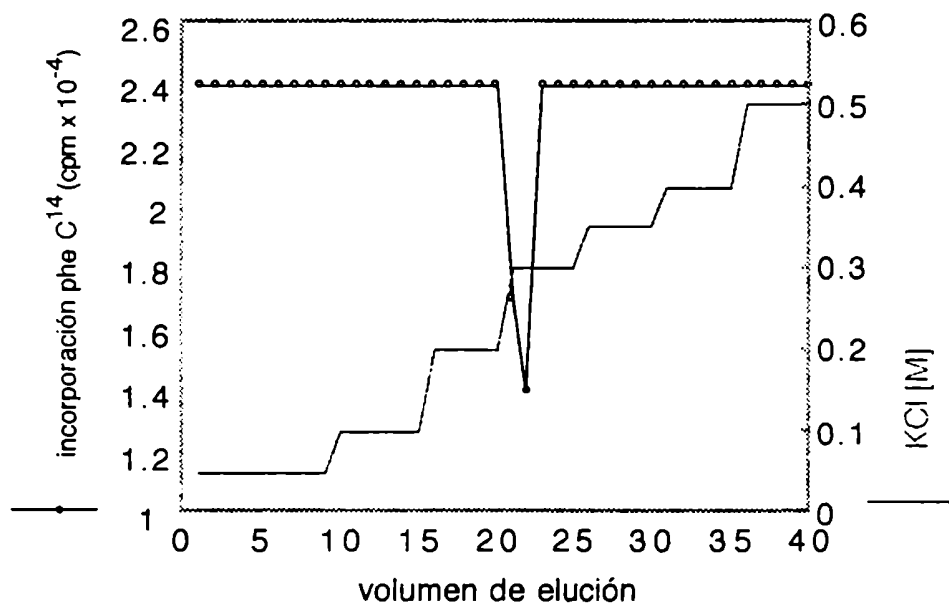


Figura 32: Determinación de la carga del inhibidor.

La columna se equilibró con buffer de diálisis. Se sembró la fracción S150 de Leishmania. Después de lavar con el mismo buffer se realizó la elución aumentando escalonadamente la concentración de  $\text{KCl}$ , como se indica en materiales y métodos. Se determinó el efecto inhibitorio sobre la traducción de las distintas fracciones eluídas de la columna.

## 5.5 - FILTRACION MOLECULAR

Se analizó el comportamiento del inhibidor en una columna de filtración molecular Sephadex G75. Debido a que el inhibidor es termoestable, se calentó previamente el S150 de *Leishmania* a 70°C durante 10 min. Se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante obtenido se sembró en la columna. La figura 33 muestra que el pico de inhibición coincide con el pico en el cual la OD 260/280 = 2, factor que se considera correspondiente a RNA puro, sin contaminaciones de proteínas.

Por otro lado, se observa que en las fracciones del eluido de la columna que presentan actividad inhibitoria no se detectaron proteínas ( medidas por el método de Bradford), y éstas se recuperan en su totalidad en las fracciones que eluyen antes del inhibidor.

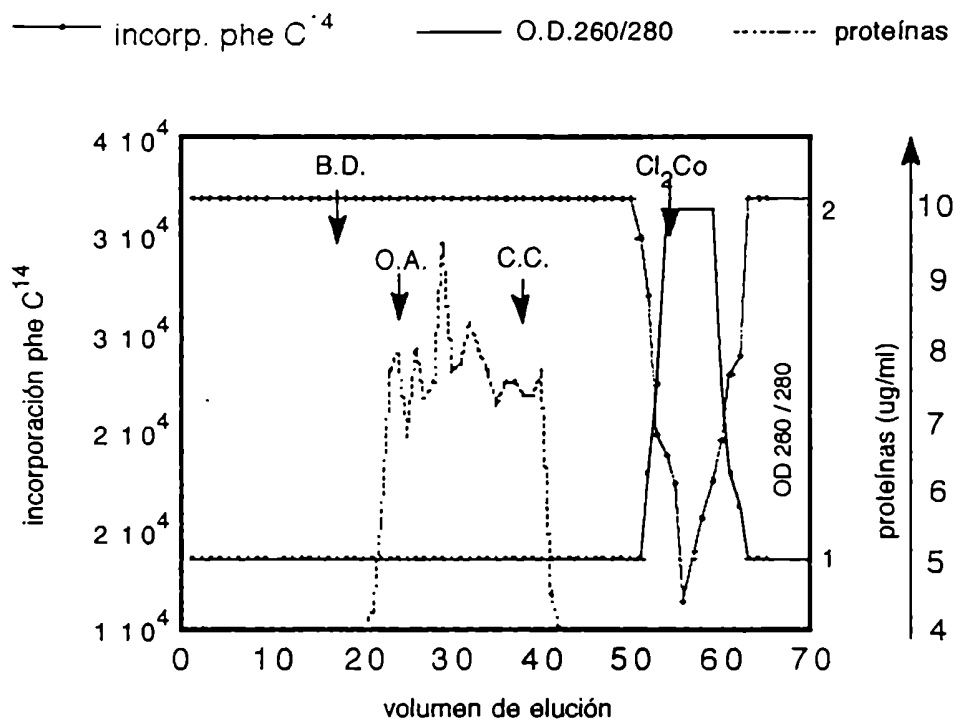


Figura 33: Cromatografía de exclusión molecular.

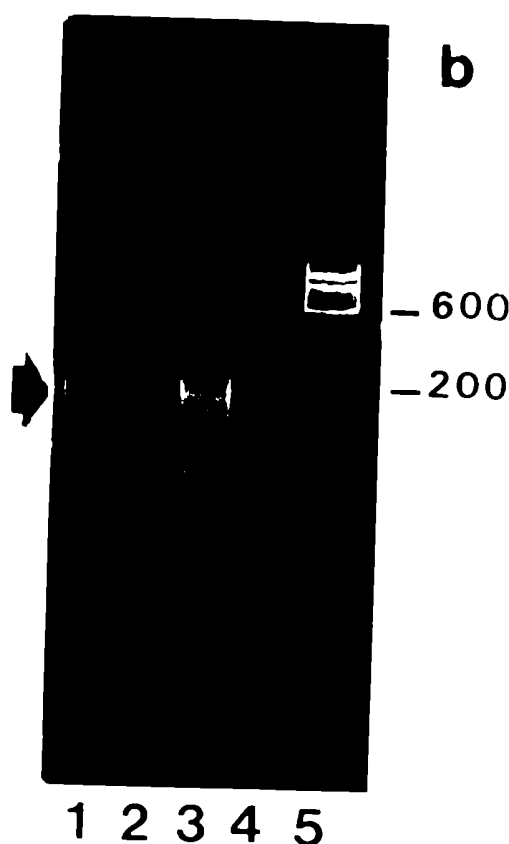
Se usó una columna de Sephadex G-75 equilibrada con buffer de diálisis. Se sembró 1 ml de la fracción S150 sometida a un calentamiento a 70°C, con un contenido proteico de 0,17 mg/ml. La elución se realizó con buffer de diálisis. Se tomaron alícuotas de las distintas fracciones y se midió la actividad inhibitoria de las mismas en un sistema de síntesis proteica *in vitro* obtenido a partir de germen de trigo.

Se determinó también la relación OD 260/280 de las distintas fracciones y la cantidad de proteínas de las mismas se obtuvo por el método de Bradford.

Marcadores de peso molecular conocido: Cl<sub>2</sub>Co, blue dextran (B.D.), ovoalbúmina (O.A.), citocromo C (C.C.).

## 5.6 - ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular, realizamos una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas de las fracciones con actividad inhibitoria. Como se observa en la figura 34, sólo se detecta una banda de ácido nucleico por coloración con bromuro de etidio, a partir de las fracciones purificadas del inhibidor, apoyando la hipótesis de que la inhibición es causada por un ácido ribonucleico con actividad biológica.



**Figura 34:** Electroforesis en geles de poliacrilamida  
Alícuotas del inhibidor de *Leishmania* en distintos grados de purificación fueron analizadas en geles de poliacrilamida 8%.  
Línea 1: fracción 56 de la columna de sephadex  
Línea 2: fracción 56 de la columna de sephadex diluida 5 veces  
Línea 3: precipitado con etanol  
Línea 4: sobrenadante S150 sometido a calentamiento.  
Línea 5: marcadores de peso molecular  
La flecha indica la posición del inhibidor.

## 5.7 - COMPORTAMIENTO DEL INHIBIDOR FRENTE A DISTINTOS TRATAMIENTOS QUIMICOS

Realizamos estudios con agentes químicos que pudieran confirmar la hipótesis de que el inhibidor de Leishmania es un ácido ribonucleico.

### 5.7.1 -TRATAMIENTO CON ALKALI:

Como se muestra en la tabla 1 la incubación del inhibidor con NaOH 0,3 M durante 1 hora a 37°C destruye totalmente su actividad inhibitoria. En este sentido el inhibidor se comporta como RNA, que es sensible al álkalí.

### 5.7.2-PRECIPTACION CON CLORURO DE LITIO

La precipitación con cloruro de litio es un método que permite precipitar RNA selectivamente. Utilizamos este método para determinar si el inhibidor de Leishmania es un ácido ribonucleico. Se precipitó RNA a partir de un S150 de Leishmania sometido previamente a un calentamiento a 70 °C, para eliminar la mayor parte de las proteínas. El precipitado fue resuspendido en buffer de diálisis y se lo precipitó luego con etanol. Como se observa en la tabla1, el RNA obtenido luego de la precipitación con cloruro de litio presentó actividad inhibitoria de la traducción.

### 5.7.3- PRECIPITACION CON ETANOL

La tabla 1 muestra que luego de una precipitación con etanol se recupera la actividad inhibitoria. Este resultado también es compatible con la hipótesis de que se trata de un ácido nucleico.

TABLA 1: COMPORTAMIENTO DEL INHIBIDOR FRENTE A DISTINTOS TRATAMIENTOS QUIMICOS

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD INHIBITORIA ESPECIFICA <sup>1</sup> (%)
-	100 <sup>2</sup>
Alkali	0
Precipitación con etanol	98
Precipitación con cloruro de litio + precipitación con etanol	97

<sup>1</sup> 100% es un porcentaje de inhibición de síntesis proteica que produce el inhibidor

que no fue sometido a tratamientos químicos.

<sup>2</sup> La actividad inhibitoria se normalizó por unidad de densidad óptica medida a 260 nm.

## 6 - PURIFICACION DEL INHIBIDOR

La tabla 2 resume el esquema de purificación del inhibidor. Este fue purificado a partir de una fracción S12 de Leishmania, por ultracentrifugación obteniéndose la fracción S150, la cual por calentamiento a 70°C durante 10-15 min. fue purificada aproximadamente 10 veces respecto del contenido proteico. Las proteínas residuales fueron eliminadas alternativamente por cromatografía de exclusión molecular, precipitación con cloruro de litio o precipitación con etanol.

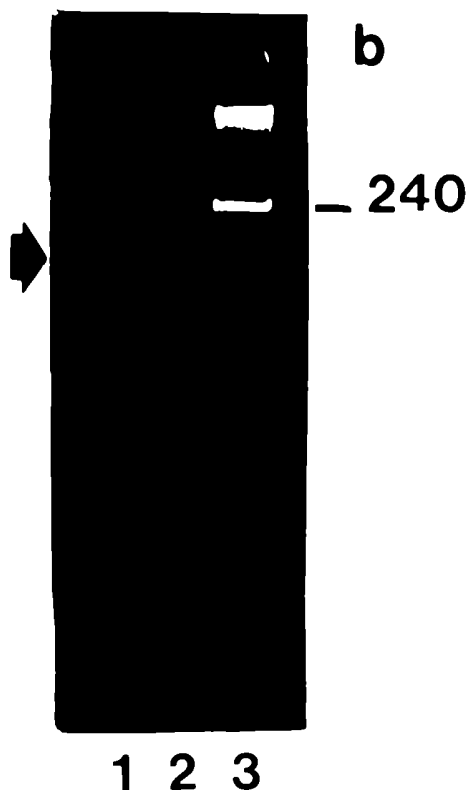
TABLA 2: ESQUEMA DE PURIFICACION

FRACCION	PROTEINA (mg/ml)	O.D. 260/280
sbte 12.000 x g	2,5	1
sbte 150.000 x g	2	1
sbte 150.000 x g calentado a 70°C	0,17	1
sephadex G 75	0	2
pp. con ClLi	0	2
pp. con etanol	0	2

## 7 -DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL INHIBIDOR

El tamaño del inhibidor fue determinado en geles de poliacrilamida 8% en condiciones desnaturalizantes.

Como se observa en la figura 35, el inhibidor de Leishmania tiene un tamaño de aproximadamente 200 nucleótidos, a juzgar por la movilidad de marcadores de RNA de tamaño conocido.



**Figura 35:** Determinación del tamaño del inhibidor.

Alícuotas del inhibidor en distintos grados de purificación fueron analizadas en geles de poliacrilamida 8 %, urea 7 M.

Línea 1: precipitado con etanol

Línea 2: S150 calentado a 70 °C

Línea 3: marcadores de peso molecular

La flecha indica la posición del inhibidor.

DISCUSSION



La *Leishmania* es un protozoo que se transmite a huéspedes vertebrados a través de insectos vectores.

Ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años. Los modelos más estudiados son *Leishmania donovani* , que causa la forma visceral de la enfermedad y *Leishmania mexicana*, que causa la forma cutánea, y es objeto del presente estudio.

Las enfermedades que resultan del parasitismo de macrófagos por estos protozoos no son todavía comprendidas a fondo.

Se han publicado numerosos estudios sobre la infección cutánea causada por *Leishmania*, que incluyen detalles clínicos y observaciones histológicas de biopsias de piel. Estos estudios reportan una amplia variedad de manifestaciones de la enfermedad que varían desde piel normal a infiltración celular intensa, formación de granuloma y/o necrosis. No es sorprendente entonces que muchos autores han concluido que no pueden conectar tales características dentro de un patrón provocado por la enfermedad o analizar la histología en relación con la carga parasitaria (79).

En general, la infiltración cutánea involucra células epiteliales, linfocitos, células plasmáticas (80) .

La imposibilidad del macrófago de destruir los parásitos de *Leishmania* contribuye a la cronicidad de la enfermedad.

Estudios *in vitro* han demostrado que la interacción de las *Leishmanias* con los macrófagos del huésped es un evento mediado por receptor (81), y depende de la microviscosidad de la membrana celular (82), y que el nicho ecológico del parásito es el fagolisosoma del macrófago .

La supervivencia intracelular depende de un delicado balance entre la potencia de los mecanismos antiparasitarios del macrófago y la eficacia de las estrategias evasivas de la *Leishmania* (83).

El indudable éxito de los parásitos se debe al hecho de que pueden establecer y mantener un equilibrio que asegura su supervivencia y la del huésped en una compleja interrelación.

Se han desarrollado algunas vacunas contra la Leishmaniasis cutánea. El resultado neto no es protección sino inducción de lesiones controladas que luego de ser curadas confieren inmunidad a largo plazo. Ha habido un gran número de pruebas clínicas principalmente en la ex Unión Soviética (84), involucrando a miles de pacientes. Sin embargo estas vacunas son difíciles de producir y distribuir, y provocan serios efectos secundarios, incluyendo lesiones diseminadas o incurables inducidas por la vacuna, reacciones alérgicas y psoriasis. Estos impedimentos hacen necesario plantear nuevos objetivos bioquímicos que ayuden a esclarecer mecanismos moleculares del parásito y contribuyan a un mayor entendimiento de la enfermedad.

En el presente trabajo se estudiaron aspectos de la regulación de la síntesis proteica de la *Leishmania mexicana*.

La síntesis proteica es una de las etapas fundamentales de la expresión genética. Los eventos de síntesis proteica han provisto de un desafío estimulante para bioquímicos, biólogos moleculares y químicos biofísicos a lo largo de más de tres décadas. Sin embargo muchas cuestiones fundamentales permanecen sin resolver.

Los sistemas libres de células se han convertido en logros poderosos para estudiar los mecanismos y controles de la síntesis proteica y la regulación génica.

El descubrimiento de moléculas de RNA con actividad biológica ha revolucionado el entendimiento de la química en sistemas biológicos. Antes de ese descubrimiento se suponía que los ácidos nucleicos sólo proveían pasivamente información genética y un esqueleto estructural (85,86).

Moléculas de RNA pueden llevar a cabo funciones que habían sido otorgadas sólo a proteínas, como actuar como enzimas que catalizan el clivaje de otras moléculas de RNA o de sí mismas (ribozimas).

Actualmente ya no se cuestiona que el RNA puede combinar funciones de transmisión de información genética junto con propiedades catalíticas y/o regulatorias.

Se han publicado numerosos trabajos que involucran moléculas de RNA que actúan como inhibidores o estimuladores de la síntesis proteica (87,88,89).

Todas estas moléculas halladas hasta el momento tienen la particularidad de ser de bajo peso molecular. Se las ha caracterizado en sistemas tan diversos como Artemia salina (90), tejido conectivo (91), músculo embrionario (92), sobrenadante postpolisosomal de hígado de rata (93), reticulocitos de conejo (94), etc.

En este estudio se purificó y caracterizó un inhibidor de la traducción aislado de extractos de Leishmania mexicana.

Se analizó el efecto de fracciones subcelulares de *Leishmania* y *Crithidia* sobre la síntesis proteica. Las distintas fracciones de *Leishmania* produjeron una dramática inhibición de alrededor de 90% mientras que extractos similares de *Crithidia fasciculata* no produjeron inhibición.

Cuando se analizó la cinética de inhibición del extracto de *Leishmania* se observó que es similar a la de cicloheximida, que es un conocido inhibidor de la elongación de las cadenas polipeptídicas. La síntesis proteica se inhibe inmediatamente luego del agregado del extracto de *Leishmania* o de cicloheximida. Por el contrario, luego del agregado del ácido aurintricarboxílico, que es un inhibidor de la iniciación se produce un lag de varios minutos hasta que la inhibición se evidencia, ya que las cadenas polipeptídicas ya iniciadas pueden terminar de sintetizarse en presencia de ATA.

Nuestros resultados cinéticos también prueban que el inhibidor no es una proteasa, pues el agregado del mismo a un sistema de síntesis proteica obtenido a partir de germen de trigo o de hígado de rata no produjo disminución del material proteico radioactivo precipitable por TCA.

El estudio en detalle del efecto del inhibidor sobre las distintas etapas de síntesis proteica indicó que tiene un efecto inhibitorio dual: reduce la aminoacilación en un 75-85 %, y disminuye la polimerización de aminoácidos en un 50 %. Estudios cinéticos de la inhibición de la aminoacilación indicaron que se trata de una inhibición de tipo competitiva.

Estudios cinéticos de protección indicaron que los polisomas protegen parcialmente del efecto del inhibidor, pues si éste se agrega luego de que los polisomas se hayan formado, la inhibición disminuye.

Se estudió también, el efecto del inhibidor sobre agregados poliribosomales de hígado de rata. El inhibidor produce una leve disrupción de polisomas. Un efecto similar aunque mucho más pronunciado es causado por la ribonucleasa A. Al analizar si el inhibidor tiene actividad RNasa sobre un polinucleótido, se obtuvieron resultados negativos.

## ESTUDIOS SOBRE LA NATURALEZA DEL INHIBIDOR:

Se realizaron distintos estudios para determinar la naturaleza química del inhibidor.

Los análisis del efecto de la temperatura sobre el inhibidor mostraron que es termoresistente. Conserva íntegramente su actividad luego de ser sometido a temperaturas de hasta 70°C; a temperaturas mayores disminuye levemente su actividad inhibitoria. Esta característica nos permitió reducir su contenido proteico 10-12 veces con respecto al extracto S150, al calentarlo a 70°C durante 15 min.

Además, la elevada termoresistencia fue el primer indicio de que el inhibidor podía no ser una proteína (sabíamos que se trataba de una macromolécula pues no es dializable).

Para determinar la veracidad de esta hipótesis sometimos al inhibidor a tratamientos con proteinasa K y tripsina, midiendo luego la actividad inhibitoria residual sobre un sistema de síntesis proteica *in vitro* obtenido a partir de germen de trigo o hígado de rata. Ninguno de estos tratamientos afectó la actividad del inhibidor.

Estudios de cromatografía en DEAE celulosa dieron como resultado que el inhibidor es una molécula cargada negativamente.

Para avanzar en el estudio de la naturaleza del inhibidor lo sometimos a distintos tratamientos químicos. Luego de una incubación con NaOH 0,3 M el inhibidor pierde totalmente su actividad. La inestabilidad frente al álcali es una propiedad que posee el RNA. Para determinar si el inhibidor es un ácido ribonucleico se realizó una precipitación con cloruro de litio. El RNA precipitado conservó la actividad inhibitoria de la traducción.

## PURIFICACION DEL INHIBIDOR:

El inhibidor de la traducción se purificó a partir de un extracto de promastigotes de Leishmania mexicana que se centrifugó primero a 12.000 g por 20 minutos y luego a 150.000 g durante 1 h., descartando los precipitados. La fracción soluble obtenida se sometió a un calentamiento a 70°C lo que permitió eliminar el 90% de las proteínas que forman un precipitado y se separan por centrifugación sin pérdida de actividad del inhibidor en el sobrenadante. Esta fracción se sometió a una filtración molecular a través de una columna de Sephadex G75. El pico eluido con máximo poder inhibitorio presentó una absorción en el rango UV, la relación O.D. 260/280 resultó igual a 2, indicando que el factor de inhibición de la

traducción es un RNA puro. Esta conclusión está de acuerdo con el hecho de que no se detectan proteínas (ensayo negativo por el método de Bradford) en las fracciones correspondientes al inhibidor de la traducción y que éste corre como una banda de RNA de alrededor de 200 nucleótidos después de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 %. La precipitación con cloruro de litio y etanol también indicó que el factor en estudio se comporta como un RNA.

Nuestros resultados indican que el inhibidor es un RNA que tiene un efecto dual: inhibe la aminoacilación en un 75-85 % y la polimerización de aminoacil tRNAs para formar polipéptidos en un 50 %.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aisló un inhibidor de síntesis proteica a partir de extractos de Leishmania mexicana.

Se lo purificó y se estudiaron sus características bioquímicas.

Los resultados descriptos indican que el inhibidor de síntesis proteica hallado en extractos de Leishmania es un ácido ribonucleico de aproximadamente 200 bases, que tiene un efecto inhibitorio dual: reduce la aminoacilación y la elongación de las cadenas polipeptídicas. La inhibición ejercida sobre la aminoacilación es de tipo competitiva.

Es interesante señalar que aún no sabemos si la existencia del inhibidor de la traducción en extractos de Leishmania tiene algún significado fisiológico, pero se podría especular que después de la infección de los macrófagos por las Leishmanias, el inhibidor de la síntesis proteica contribuye al control que los parásitos podrían ejercer sobre las células hospedadoras.

*Gustavo F. Restrepo*

*J. S. S. S.*

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Badaró, R. 1986. *J. Infect. Dis.* 154: 639-649.
- 2) Lainsor, R., Leishmaniasis. 1982. En Jacobs, L. Y P. Arambulo (sección eds.), *CRC Hznbook series in zoonosis. Sección C, vol 1.* Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- 3) Lainson, R. 1981. *Epidemiología y ecología de Leishmaniasis tegumentaria en Amazonia. Hilera Med. (Belem).* 3: 35-40.
- 4) Gutteridge, W.E. 1987. *Int. Parasitol.* 17: 121-129.
- 5) Scelein, Y. 1993. *Parasitology Today.* Vol 9, N° 7.
- 6) Blackbun, K et al. 1989. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 82: 613-619.
- 7) Schlein, Y. et al. 1991. *Proc. R. Sac. London, ser. B.* 245:121-126.
- 8) Schlein, Y. et al. 1992. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 89: 9944-9948.
- 9) Schreier, M.H. J. 1977. *J. Mol. Biol.* 116: 727-753.
- 10) Benner, R. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 3078-3087.
- 11) Thomas, A.A. y Benne, R. 1981. *FEBBS Lett.* 128: 177-185.
- 12) Safer, B. et al. 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 2584-3586.
- 13) Benner, R, et al. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 7675-7681.
- 14) Grifo, A. J. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 5246-5252.
- 15) Trachsel, h et al. 1979. *Biochim. Biophys. Acta.* 565: 305-314.
- 16) Goumans, H. 1980. *Biochim. Biophys. Acta.* 608:39-46.
- 17) Benne, R. et al. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:3005-3009.
- 18) Benne, R. et al. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 3070-3077.
- 19) Meyer, L. J. 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 351-356.
- 20) Grifo, J. A. et al. *J. Biol. Chem.* 258: 5804-5810.
- 21) Jones, R.L. 1980. *Arch. Biochem. Biophys.*199: 277-285.
- 22) Proud, C. G. et al. 1982. *FEBBS Lett.* 148: 214-220.
- 23) Valenzuela, D. 1981. *Fed. Proc.* 40: 1749.
- 24) Brown-Luedi, M.L. et al. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 4202-4206.
- 25) Duncan, R. et al. 1983. *J. biol. Chem.* 258: 7228-7235.
- 26) Russel, D.W. et al . 1980. *Arch. Biochem. Biophys.* 201: 518-526.
- 27) Russel, D.W. 1979. *J. Biol. Chem.* 254: 8796-8800.
- 28) Seal, S.N. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 10573-10576.
- 29) Seal, S.N. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 859-863 y 866-871.
- 30) Spirin, A.S. 1986. *Ribosome Structure and protein synthesis,* pág. 339-368.
- 31) Clerk, B. 1980. *Trends. Biochem. Sci.* 5: 207-210.
- 32) Caskey, C. 1980. *Trends. Biochem. Sci.* 5: 234-237.
- 33) Ochoa., S. 1983. *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- 34) Safer, B. 1983. *Cell* 33:7-8.
- 35) Maitra, U. et al. 1982. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 869-900.
- 36) Ochoa, S. et al. 1979. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 549-580.

- 37) Berns, A. et al. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 714-718.
- 38) De Herdt, E. et al. 1979. Nucl. Acid. Res. 7: 1363-1373.
- 39) Northeman, W. et al. 1980. Eur. J. Biochem. 112: 451-459.
- 40) Kennedy, D.S. et al. 1978. FEBBS Lett. 90: 209-214.
- 41) Baglioni, C. 1979. Cell 17: 255-264.
- 42) Lengyel, P. 1982. Ann. Rev. Biochem. 51: 251-282.
- 43) Benarjee, A.K. 1980. Micr. Rev. 44: 175-205.
- 44) Ochoa, S. 1983. Arch. Biochem. Biophys. 223: 325-349.
- 45) London, I.M. The Enzymes. 18: 360-381.
- 46) Clemens, M.J. 1985. Biochem. J. 226: 345-360.
- 47) Farrel, P.J. 1977. Cell 11: 187-200.
- 48) Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. y Krebs, E.G. 1987. Ann. Rev. Biochem. 58: 586-587.
- 49) Calogero, R. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6427-6431.
- 50) Kozak, M et al . 1981. J. Cell. Biol. 108: 229-241.
- 51) Calogero, R.A. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6427-6443.
- 52) Hershey, J.W. 1991. Ann. Rev. Biochem. 60: 717-755.
- 53) Hartz, D. 1991. J. Mol. Biol. 218: 99-105.
- 54) Gold, L. et al. 1988. Ann. Rev. Biochem. 57: 199-233.
- 55) Mc Carthy, J.E.G. 1990. Trends. genet. : 78-85.
- 56) Dolan, K.M. y Oliver, D.B. 1991. J. Biol. Chem. 266: 23329-23333.
- 57) Kozak, M. et al. 1988. J. Cell. Biol. 107:1-7.
- 58) Alutvia, S. et al. 1991. J. Mol. Biol. 218; 723-733.
- 59) Hattman, S. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10027-10031.
- 60) Asano, K. et al. 1991. J. Biol. Chem. 266:24549-24556.
- 61) Berkhout, B. 1985. Nucleic Acid. Res. 13: 6955-6967.
- 62) Dick, T. 1990. J. Mol. Biol. 212: 661-668.
- 63) Dunn, J. 1975. J. Mol. Biol. 99: 487-499.
- 64) Anhele, N. et al. 1991. Gene 105: 113-117.
- 65) Vazquez, D. 1979. Inhibitors of Protein Synthesis, pag. 1-14.
- 66) Cundliffe, E., Reynolds, P.E. 1981. The Molecular Basis of Antibiotic Action, pag. 442-443.
- 67) Whiffn, A.J. et al . 1946. J. of Bacteriology 52: 610-611.
- 68) Kerridge, D. 1958. J. Gen. Microbiol. 19: 497-506.
- 69) Felicetti, L. et al. 1966. Biochim. Biophys. Acta 119: 120-129.
- 70) Siegel, M.R. 1965. Biochim. Biophys. Acta 103: 558-567.
- 71) Ennis, H.L. et al. 1966. Mol. Pharmac. 2: 444-452.
- 72) Bennet, L.L. 1965. Biochim. Biophys. Acta 103: 478-485.
- 73) Viau, J.P. 1970. Biochim. Biophys. Acta 209: 190-195.
- 74) Abrahm, J. 1982. Eur. J. Biochem. 24: 383-388.
- 75) Blobel, G. y Potter, U.R. 1967. J. Mol. Biol. 28:539.
- 76) Hawkins, H. et al. 1991. Biochem. J. 275: 349-353.
- 77) Jacket, D.C. et al. 1977. Biochimie 59: 189-195.



- 78) Saambrook, J. et al. 1989. *Molecular Cloning*, cap. 6. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 79) Ridley, D.S. et al. 1980. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 223-225.
- 80) Hass et al. 1987. *Journal of Parasitology* 73:568-577.
- 81) Blackwell, J.M. 1985. *Journal of Experimental Medicine* 162: 324-331.
- 82) Mukhlerjee, S. 1988. *experimental Parasitology* 66: 18-26.
- 83) Maxwel, J. 1984. *Parasitology* 88: 579-592.
- 84) Creenblatt, C.L. 1988. *Parasitology Today* 4:53-54.
- 85) Kruger, K. et al. 1982. *Cell* 31: 147.
- 86) Guerrier, C. et al 35:88.
- 87) Fuhr, J.E. et al. 1972. *Nature New Biology* 240:274.
- 88) Reichman, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2678-2682.
- 89) Goldstein, E. et al. 1973. *J. Mol. Biol.* 80: 243-354.
- 90) Guang, L et al. 1977. *Arch. Bioch. Bioph.* 180: 276-287.
- 91) Zeichner, M et al. *Arch. Bioch. Bioph.*, en prensa.
- 92) Bester, A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1523-1527.
- 93) Northeman, E. 1980. *Eur. J. Bioch.* 112: 451-459.
- 94) Berns, A. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 714-718.