

## Tesis de Posgrado

# Ciclo ribosomal en bacterias : Terminación de la síntesis proteica

Azzam, Mansur E.

1980

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:**

Azzam, Mansur E.. (1980). Ciclo ribosomal en bacterias : Terminación de la síntesis proteica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1636\\_Azzam.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1636_Azzam.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Azzam, Mansur E.. "Ciclo ribosomal en bacterias : Terminación de la síntesis proteica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1636\\_Azzam.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1636_Azzam.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS NATURALES.

TITULO: CICLO RIBOSOMAL EN BACTERIAS: TERMINACION DE LA SINTESIS  
PROTEICA.

AUTOR : MANSUR E. AZZAM

DIRECTOR : PROF. DR. ISRAEL D. ALGRANATI

LUGAR DE  
TRABAJO : INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS  
(FUNDACION CAMPOMAR).

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR  
EN QUIMICA, ORIENTACION BIOLOGICA.  
1980.

1636  
Ej: 2

A MI ESPOSA  
A MIS HIJAS  
A MIS PADRES



## ABREVIATURAS.

A	: ADENINA
A 254 NM	: ABSORBANCIA A 254 NANOMETROS.
A 260 NM	: ABSORBANCIA A 260 NANOMETROS.
A 700 NM	: ABSORBANCIA A 700 NANOMETROS.
ATA	: ACIDO ADRENTRICARBOXILICO.
AMP	: ADENSINA 5' MONOFOSFATO.
ATP	: ADENSINA 5' TRIFOSFATO.
C	: CITOSINA.
C 14	: ISOTOPO 14 DEL CARBONO.
CC	: CENTIMETROS CUBICOS.
DNA	: ACIDO DEOXIRIBONUCLEICO.
EDTA	: ETILENE-DIAMINO-TETRA-ACETATO.
FD	: FACTOR DISOCIANTE.
F-MET	: FORMIL-METIONINA.
G	: GUANINA.
GDP	: GUANOSINA 5' DIFOSFATO.
GRADOS C	: GRADOS CENTIGRADOS.
GTP	: GUANOSINA 5' TRIFOSFATO.
GTPASA	: GUANOSINA 5' TRIFOSFATASA.
HEPES	: ACIDO (N-2-HIDROXIETILPIPERACIN-N'-2-ETANOSULFONICO).
M-RNA	: ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO.
NM	: NANOMETROS
PEP	: FOSFOENOLPIRUVATO.
PP	: PIROFOSFATO
P 32	: ISOTOPO 32 DEL FOSFORO.
RNA	: ACIDO RIBONUCLEICO.
T	: TIMINA.
TRIS	: TRIS HIDROXIAMINOMETANO.
T-RNA	: ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA.
TCA	: ACIDO TRICLOROACETICO.
U	: URACILO.
S	: UNIDADES DE SEDIMENTACION.
**	: INDICA POTENCIACION

## INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y TECNICAS	15
RESULTADOS	24
DISCUSION	36
BIBLIOGRAFIA	41
GRAFICOS	44

## INTRODUCCION

LAS PROTEINAS SON UN CONJUNTO DE SUSTANCIAS MUY DIVERSO EN CUANTO A DIMENSIONES, CARGA Y COMPOSICION DE AMINOACIDOS; PERO TODAS COMPARTEN LA CARACTERISTICA DE SER ESTRUCTURAS LINEALES FORMADAS POR LA UNION COVALENTE DE ALFA-AMINOACIDOS. SE CONOCEN MAS DE 20 AMINOACIDOS QUE INTEGRAN LA MOLECULA PROTEICA, DE LOS CUALES SOLO 20 INTERVIENEN EN EL MOMENTO DE LA BIOSINTESIS. LOS DEMAS SE ORIGINAN POR TRANSFORMACIONES (HABITUALMENTE ADICIONES DE RADICALES) DE LOS AMINOACIDOS ORIGINALES EN ALGUN MOMENTO POSTERIOR A LA SINTESIS DE LA UNION PEPTIDICA.

LA DIFERENCIA DE DIMENSION Y COMPOSICION DE AMINOACIDOS, ASI COMO LAS DISTINTAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS EN LAS CADENAS PEPTIDICAS SON LA CAUSA DE LA ENORME DIVERSIDAD DE LAS PROTEINAS. LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS, QUE CONSTITUYE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS CADENAS, DETERMINA POR SI SOLA LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIA, TERCIARIA Y CUATERNARIA, CUANDO ESTA ULTIMA EXISTE. POR OTRA PARTE ESA SECUENCIA O ESTRUCTURA PRIMARIA ESTA DETERMINADA GENETICAMENTE, Y LAS ALTERACIONES, SUSTITUCIONES Y DELECCIONES DE LOS AMINOACIDOS QUE LA COMPONEN SON CAUSA DE ANOMALIAS EN LA FUNCION Y ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS. ES POR ESO QUE LA SINTESIS PROTEICA ES UNA OPERACION MUY DELICADA DONDE PARTICIPA UNA COMPLEJA MAQUINARIA QUE DEBE GARANTIZAR LA ELABORACION TOTAL, VELOZ Y FIEL DE LAS PROTEINAS NECESARIAS Y PREVISTAS EN EL GENOMA CELULAR

DICHA MAQUINARIA ESTA FORMADA POR LOS RIBOSOMAS, EL RNA MENSAJERO, LOS RNA DE TRANSFERENCIA, Y NUMEROSAS ENZIMAS Y FACTORES PROTEICOS QUE INTERACTUAN DE UN MODO QUE, LEJOS DE SER ALEATORIO, ES SINCRONIZADO Y ALTAMENTE ORDENADO.

LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS ES LA CULMINACION DE UN PROCESO DE TRANSFERENCIA DE INFORMACION, E IMPLICA TAMBIEN UNA TRANSFERENCIA DE ENERGIA QUE SE CONSUME EN EL FUNCIONAMIENTO DE LA MAQUINARIA BIOSINTETICA. DESCRIBIREMOS BREVEMENTE AMBOS PROCESOS ANTES DE DISCUTIR LA MAQUINARIA EN SI.

### A. TRANSFERENCIA DE INFORMACION.

LA CONFLUENCIA DE LA GENETICA Y DE LA BIOQUIMICA PERMITIERON RESOLVER PROBLEMAS QUE AMBAS DISCIPLINAS POR SEPARADO NO HABIAN PODIDO HACER. LA CARACTERIZACION DEL MATERIAL GENETICO COMO ACIDO DEOXIRIBONUCLEICO, PRINCIPAL COMPONENTE DE LOS CROMOSOMAS, FUE LA CLAVE PARA INICIAR EL ESTUDIO DEL FLUJO DE LA INFORMACION DESDE SU LUGAR DE ALMACENAMIENTO HASTA SU EXPRESION FINAL. EL MODELO DE LA ESTRUCTURA DEL DNA PROPUESTO POR WATSON Y CRICK A PARTIR DE DATOS QUIMICOS Y DE DIFRACCION DE LOS RAYOS X, Y LUEGO CORROBORADO AL DEMOSTRARSE SUS PREDICCIONES, PERMITIO CONOCER EL MECANISMO DE APAREAMIENTO DE BASES COMPLEMENTARIAS, QUE ES EL FUNDAMENTO DE LA REPLICACION DE LA MOLECULA DE DNA DE UNA SECUENCIA DETERMINADA. ESTA REPLICACION ES LA QUE PERMITE LA TRANSFERENCIA DE INFORMACION DE UNA CELULA MADRE A UNA CELULA HIJA, MANTENIENDO LA IDENTIDAD DE DICHA INFORMACION GENETICA. EN EL PROCESO DE EXPRESION DE LA INFORMACION GENETICA EL DNA ES TRANSCRIPTO A OTRAS MOLECULAS DE ACIDO NUCLEICO DE MENORES DIMENSIONES Y MAS MANEJABLES TANTO QUIMICA,

COMO FISICAMENTE QUE EL DNA. ESTAS MOLECULAS RESULTANTES DE LA TRANSCRIPCION SON LAS DEL ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO (M-RNA), QUE MANTIENE FIELMENTE LAS CARACTERISTICAS DE LA INFORMACION GENETICA Y PUEDE SER TRADUCIDO A OTRO "LENGUAJE". ENTRE EL "LENGUAJE" DEL DNA (COMPUESTO POR CUATRO BASES: ADENINA, GUANINA, CITOSINA Y TIMINA ) Y EL DEL RNA, HAY UN SOLO CAMBIO DE BASE: EN VEZ DE TIMINA APARECE EL URACILO. LA TRANSCRIPCION TIENE UN GRADO AUN MAYOR DE COMPLEJIDAD QUE LA REPLICACION PUES, AL IGUAL QUE ELLA DEBE MANTENER LA FIDELIDAD, Y ADEMAS SELECCIONAR LAS PARTES DEL GENOMA QUE DEBEN TRANSCRIBIRSE DE ACUERDO A LAS NECESIDADES CELULARES, RECONOCIENDO CIERTAS SIGNOS DE INICIACION Y FINALIZACION DE LA TRANSCRIPCION.

LA TRADUCCION DEL MENSAJE TRANSCRIPTO EN EL M-RNA CONSISTE EN LEER INSTRUCCIONES "ESCRITAS" EN CUATRO SIMBOLOS (LAS BASES) Y PRODUCIR CON VEINTE CONSTITUYENTES DISTINTOS, UNA "ESTRUCTURA" PROTEICA QUE "SIRVA" PARA LA FUNCION A QUE ESTA DESTINADA. ES OBVIO QUE EN ESTE PROCESO DE TRADUCCION EXISTE UN MAYOR GRADO DE COMPLEJIDAD.

EL FLUJO DE LA INFORMACION GENETICA, DEFINIDO POR CRICK COMO EL DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGIA MOLECULAR, CONSISTE EN EL PASAJE DE LA INFORMACION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS A LAS PROTEINAS.

LA ELUCIDACION DEL CODIGO GENETICO, REALIZADA EN LA DECADA DEL SESENTA, INSUMIO EL TRABAJO DE MUCHOS EQUIPOS, Y PERMITE ASEVERAR SINTETICAMENTE QUE CADA SECUENCIA DE TRES BASES (TRIPLETES) SON TRADUCIDOS COMO UN AMINOACIDOS. HABIENDO 64 POSIBILIDADES DE COMBINACION DE LAS CUATRO BASES EN TRIPLETES, Y SOLO 20 AMINOACIDOS CODIFICADOS, SURGE QUE ALGUNOS AMINOACIDOS ESTAN CODIFICADOS POR MAS DE UN TRIPLETE (CODON), FENOMENO QUE SE LLAMA DEGENERACION DEL CODIGO GENETICO. EXISTEN ADEMAS TRES CODONES QUE NO REPRESENTAN AMINOACIDO ALGUNO, DESCUBRIENDOSE QUE FUNCIONAN COMO SIGNOS DE PUNTUACION, Y CODIFICAN LA TERMINACION DE LA CADENA PEPTIDICA: SON LOS TRIPLETES UAA, UGA, Y UAG.

#### B. TRANSFERENCIA DE ENERGIA.

LA SINTESIS PROTEICA ES UN PROCESO ENDERGONICO, ES DECIR QUE REQUIERE ENERGIA QUIMICA PARA QUE OCURRA. LA FUENTE DE ESA ENERGIA SON LOS NUCLEOSIDO TRIFOSFATOS, ESPECIFICAMENTE EL ATP, QUE INTERVIENE EN LA ACTIVACION DE LOS AMINOACIDOS, Y EL GTP QUE SE EMPLEA EN VARIAS DE LAS FUNCIONES RIBOSOMALES Y EN LA ELONGACION DE LA CADENA PEPTIDICA. CUANDO EL ATP Y EL GTP SE HIDROLIZAN, LIBERAN SU FOSFATO GAMMA Y EL NUCLEOSIDO DIFOSFATO CORRESPONDIENTE; AL MISMO TIEMPO CEDEN UNAS 7000 CALORIAS/MOL.

ES EVIDENTE QUE PARA QUE LA SINTESIS PROTEICA PROCEDA CON NORMALIDAD EL APORTE ENERGETICO DEBERA ESTAR GARANTIZADO. SIGNIFICA QUE "IN VIVO", LAS FUNCIONES GLICOLITICAS Y RESPIRATORIAS CELULARES DEBEN CUMPLIRSE SATISFACTORIAMENTE, PROVEYENDO EL ATP Y GTP NECESARIAS.

## I.2. MAQUINARIA BIOSINTETICA

### A. ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO (M-RNA).

REPRESENTA EL 2% DEL RNA TOTAL DE UNA BACTERIA EN PLENO CRECIMIENTO. ES UN POLINUCLEOTIDO DE UNA SOLA CADENA, AUNQUE EN SU SENO SE HALLAN REGIONES CON APAREAMIENTO INTERNO DE BASES, QUE ORIGINAN ESTRUCTURAS SECUNDARIAS. EN LA REGION CORRESPONDIENTE A SU EXTREMO 5' (QUE ES EL PRIMERO EN SINTETIZARSE) COMIENZA LA TRADUCCION. ALLI EXISTE UN SITIO DE UNION AL RIBOSOMA, QUE ESTE ULTIMO DEBERA RECONOCER. CERCA DE ESTA REGION, O EN LA MISMA SE HALLA EL CODON DE INICIACION AUG, QUE CODIFICA LA FORMILMETIONINA.

LA SINTESIS DEL MENSAJERO SE HACE UTILIZANDO COMO MATRIZ UNA PORCION DEL DNA. CADA SECTOR FUNCIONAL DEL GENOMA SE TRANSCRIBE FORMANDO UN M-RNA, CON LA EXCEPCION DE LAS REGIONES QUE CODIFICAN LOS RNA RIBOSOMALES Y DE TRANSFERENCIA.

EN UNA BACTERIA, LA SINTESIS DE RNA Y SU TRADUCCION SON DOS FENOMENOS SINCRONIZADOS, CONTINUOS Y ACOPLADOS EN "TANDEM". ES DECIR QUE MIENTRAS LA RNA POLIMERASA VA SINTETIZANDO LA MOLECULA DE RNA, LOS RIBOSOMAS VAN RECONOCIENDO EL SITIO DE UNION, SE ACOPLAN AL MISMO Y VAN INICIANDO LA TRADUCCION.

POR ULTIMO, LA MOLECULA DE RNA MENSAJERO ES DE Poca ESTABILIDAD EN LAS BACTERIAS, ES DECIR QUE TIENE UN ALTO INDICE DE RECAMBIO. EN PROMEDIO LAS DISTINTAS CLASES DE RNA MENSAJERO TIENEN UNA VIDA MEDIA DE DOS A CINCO MINUTOS. ESTA CARACTERISTICA NO ES AJENA A LA IMPORTANCIA DE LA TRANSCRIPCION COMO PROCESO REGULADORIO CELULAR, PUES EN MUY CONTADOS SEGUNDOS PUEDE PONER EN MARCHA MECANISMOS CELULARES, Y EN POCOS MINUTOS LOS PUEDE DETENER.

### B. EL ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA (T-RNA) Y LAS AMINOACIL T-RNA SINTETASAS.

EN TODO PROCESO DE BIOSINTESIS MACROMOLECULAR, LOS MONOMEROS QUE LAS COMPONEN SON PREVIAMENTE ACTIVADOS. ASI, EN LA POLIMERIZACION DE LOS RIBONUCLEOSIDOS MONOFOSFATOS (ACIDO RIBONUCLEICO) LOS PRECURSORES QUE SE UTILIZAN SON LOS NUCLEOSIDOS TRIFOSFATOS; LO MISMO PASA CON LA SINTESIS DEL GLUCOGENO, EL ALMIDON Y DE LOS ACIDOS GRASOS, EN LA QUE LOS PRECURSORES SON EL UDPG, ADPG, Y LA ACETIL COENZIMA A RESPECTIVAMENTE.

EN EL CASO DE LA BIOSINTESIS PROTEICA TAMBIEN SE REQUIERE UNA ACTIVACION PREVIA, PUES EL SUBSTRATO EN EL MOMENTO DE EFECTUARSE LA UNION PEPTIDICA NO ES EL AMINOACIDO LIBRE, SINO QUE SE HALLA ESTERIFICANDO UNA MOLECULA DE ACIDO RIBONUCLEICO DE ALREDEDOR DE 24.000 DALTONS DE PESO MOLECULAR. ESTA CARACTERISTICA DEL AMINOACIL-T-RNA SUGIERE QUE ADEMAS DE ACTIVAR EL AMINOACIDO, LA FUNCION DE UNA MOLECULA TAN GRANDE ESTA VINCULADA AL NOT DEFINEDECODIFICACION QUE TIENE LUGAR EN EL RIBOSOMA. EN REALIDAD YA HACE MAS DE VEINTE AÑOS QUE SE VISLUMBRO QUE LOS AMINOACIDOS NO PODRIAN ADSORBERSE DIRECTAMENTE AL RNA MENSAJERO, PARA ORDENARSE DE ACUERDO A LA SECUENCIA INDICADA, Y SE POSTULO UNA MOLECULA ADAPTADORA QUE HICIERA DE NEXO ENTRE LA CONFORMACION DEL AMINOACIDO Y LA ESTRUCTURA

DE LOS TRIPLETES , QUE NO SON RECONOCIDOS DIRECTAMENTE POR LOS AMINOACIDOS.

LOS T-RNA, DE UN COEFICIENTE DE SEDIMENTACION DE 4 S, HAN SIDO EN MUCHOS CASOS PURIFICADOS, Y ACTUALMENTE SE CONOCE LA SECUENCIA DE SUS BASES. EN TODOS LOS CASOS CONOCIDOS SE REPITEN DOS HECHOS: 1) LA REGION DEL ANTI-CODON (TRIPLETE COMPLEMENTARIO DEL CODON) SE HALLA EN LA MITAD DE LA MOLECULA LINEAL; Y 2) EL EXTREMO 3' DE LA SECUENCIA ES C,C,A.

LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MAS PROBABLE ES UNA QUE COMPRENDE UN APAREAMIENTO INTERNO DE ALREDEDOR DEL 50% DE LAS BASES, DEJANDO ZONAS ALTERNADAS SIN APAREAMIENTO. SI SE LO DIBUJA ESQUEMATICAMENTE ADQUIERE LA FORMA DE UN TRESOL DE TRES HOJAS CON UN TALLO CONSTITUIDO POR AMBAS REGIONES TERMINALES (EXTREMOS 3' Y 5'). LAS HOJAS SON LOS TRES "RULOS" DONDE NO HAY APAREAMIENTO INTERNO. LAS FUNCIONES CONOCIDAS Y LOCALIZADAS SON LAS DEL EXTREMO 3' QUE ES LA ZONA DE UNION DEL AMINOACIDO ESTERIFICANDO EL ADENILATO DE LA SECUENCIA TERMINAL CCA ; Y LA DEL ANTICODON QUE ES LA ZONA DE APAREAMIENTO CON EL MENSAJERO.

LA REDUNDANCIA Y DEGENERACION YA MENCIONADAS DEL CODIGO GENETICO TIENE SU CONSECUENCIA A NIVEL DE LA ESTRUCTURA DEL T-RNA, YA QUE SE HAN ENCONTRADO VARIAS ESPECIES QUIMICAS DISTINTAS DE T-RNA QUE SE CARGAN CON EL MISMO AMINOACIDO.

LAS AMINOACIL-T-RNA SINTETASAS SON LA ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS REACCIONES DE ACTIVACION DE LOS AMINOACIDOS, Y LA POSTERIOR ESTERIFICACION DE LOS T-RNA. HASTA EL MOMENTO, Y EN BACTERIAS, NO SE HA ENCONTRADO MAS QUE UNA SINTETASA POR AMINOACIDO. ESTAS ENZIMAS CATALIZAN DOS REACCIONES:

R 1 ENZIMA + AMINOACIDO + ATP-----> AMINOACIDO-AMP-ENZIMA + PP

R 2 AMINOACIDO-AMP-ENZIMA + T-RNA-----> AMINOACIL-T-RNA + ENZIMA

EN LA REACCION 1 SE TRANSFIERE ENERGIA DEL ATP A LA UNION ANHIDRIDO ENTRE EL AMINOACIDO Y EL AMP, LO QUE PROVOCA LA ACTIVACION DEL AMINOACIDO. PERO TAMBIEN IMPLICA UNA SELECCION PERFECTA DEL AMINOACIDO ADECUADO POR PARTE DE LA ENZIMA, QUE SERVIRA LUEGO PARA QUE EN LA REACCION 2 EL AMINOACIDO SE UNA AL T-RNA CORRESPONDIENTE. DE ESTE MODO EL PAPEL DE LA ENZIMA ACTIVANTE ES IMPORTANTE POR LA PREDECODIFICACION QUE EFECTUA.

### C. EL RIBOSOMA.

ES LA PARTICULA CATALITICA MAS GRANDE Y COMPLEJA QUE SE CONOCE. SU TAMAÑO DE 270 A Y SU PESO MOLECULAR DE  $2.65 \times 10^{*6}$  (1) SON SOLO DOS PARAMETROS QUE ILUSTRAN ESA SITUACION. SU CARACTERISTICA SEDIMENTACION EN LA ULTRACENTRIFUGA HACE QUE SE LO CONOZCA POR SU COEFICIENTE DE SEDIMENTACION, ( 70 S EN EL CASO DEL RIBOSOMA BACTERIANO). DESDE LOS PRIMEROS ESTUDIOS SE NOTO QUE LOS LISADOS DE BACTERIAS MOSTRABAN, AL SER ANALIZADOS EN LA ULTRACENTRIFUGA, VARIOS TIPOS DE PARTICULAS QUE ABSOR-

BIAN LUZ A 256-260 NM DEL ESPECTRO ULTRAVIOLETA. ES UN SISTEMA PAUCIDIS-  
PERSO, CUYA COMPONENTE MAS IMPORTANTE SEDIMENTA ALREDEDOR DE LOS 70 S.  
SE ENCUENTRAN OTROS DOS PICOS QUE INDICAN LA PRESENCIA DE DOS PARTICU-  
LAS MENORES DE 30 S Y 50 S. CUANDO LA CONCENTRACION DE ION MAGNESIO ES  
BAJA O NULA EN EL LISADO, SE NOTA UN GRAN DESCENSO EN EL PICO DE 70 S Y  
UN AUMENTO EN LAS CANTIDADES DE LAS PARTICULAS QUE SEDIMENTAN A 30  
Y 50 S. ESTA DISOCIACION REVERSIBLE EN CIERTAS CONDICIONES, HACE PENSAR  
QUE EL RIBOSOMA ESTA COMPUESTO POR DOS SUBUNIDADES DE LOS COEFICIENTES  
DE SEDIMENTACION MENCIONADOS (2).

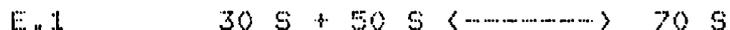
UN ANALISIS QUIMICO DEL RIBOSOMA REVELA LA SIGUIENTE COMPOSICION:

#1. RNA RIBOSOMAL: ES EL COMPONENTE CUANTITATIVAMENTE MAS IMPORTANTE  
DEL RIBOSOMA: CONSTITUYE ALREDEDOR DEL 63% DEL MISMO. SE HAN ENCONTRADO  
TRES MOLECULAS DE RNA DE DISTINTO TAMANO. SUS COEFICIENTES DE SEDIMENTA-  
CION SON DE 5 S, 16 S Y 23 S (3), CON PESOS MOLECULARES DE  $3,6 \times 10^{**4}$ ,  
 $5,5 \times 10^{**5}$  Y  $2,1 \times 10^{**6}$  RESPECTIVAMENTE (4).

#2. PROTEINAS RIBOSOMALES: COMPONEN EL 37% DEL PESO TOTAL DEL RIBOSOMA.  
SON LOS COMPONENTES MAS ESTUDIADOS Y MEJOR CONOCIDOS, Y CONTRARIAMENTE A  
LO QUE SE PENSO AGUNA VEZ, HOY SE SABE QUE SU PAPEL ES FUNDAMENTAL  
Y NO SECUNDARIO EN LA FUNCION RIBOSOMAL. LA MAYORIA SON BASICAS (5,6),  
CON PUNTOS ISOELECTRICOS DE ALREDEDOR DE 10, PERO HAY ALGUNAS NEUTRAS Y  
MUY POCAS ACIDAS.

LA SUBUNIDAD MENOR CONTIENE ALREDEDOR DE 21 PROTEINAS, Y LA MAYOR UNAS  
34. SON EN GENERAL MOLECULAS PEQUEÑAS. SUS PESOS MOLECULARES VAN DESDE  
 $9,6 \times 10^{**3}$  ( L 34 ) A  $3,1 \times 10^{**4}$  ( L 2 ). SOLO UNA DE ELLAS SOBREPASA  
ESTE RANGO ( S 1 =  $6,5 \times 10^{**4}$  ) (7). LA PURIFICACION DE LAS PROTEINAS  
RIBOSOMALES HA PERMITIDO ESTUDIAR LA RECONSTITUCION DE LAS SUBUNIDADES  
"IN VITRO" Y DIRIGIR EL ESTUDIO DE SU CONSTRUCCION "IN VIVO". AMBAS SUB-  
UNIDADES PUEDEN RECONSTRUIRSE, Y EL MECANISMO ES SECUENCIAL, ORDENADO Y  
HAY EVIDENCIAS DE COOPERATIVISMO EN EL PROCESO (8,9,10,11).

LA RELACION ENTRE LAS SUBUNIDADES CON LA FORMA ASOCIADA 70 S, SE EXPRESA  
EN LA ECUACION



EN LA QUE DISTINTAS CONDICIONES VAN DESPLAZANDO EL EQUILIBRIO EN UNO U  
OTRO SENTIDO; LAS CONCENTRACIONES DE MAGNESIO INFERIORES A 1 MILIMOLAR,  
LAS CONCENTRACIONES DE POTASIO SUPERIORES A 300 MILIMOLAR Y EL AUMENTO  
DE LA TEMPERATURA, TIENDEN A DISOCIAR LOS RIBOSOMAS. EN CAMBIO LAS  
SUBUNIDADES TIENDEN A ASOCIARSE EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE  
MAGNESIO, DE POLIAMINAS, Y SON MAS ESTABLES, SI TIENEN UNIDOS PEPTIDIL O  
AMINOACIL-T-RNA, (12,13,14).

SE HAN DETERMINADO ALGUNAS CONSTANTES TERMODINAMICAS PARA ESTE EQUILI-  
BRIO EN TAMPON TRIS-CLORHIDRICO PH 7,8 50 MILIMOLAR; Y CLORURO DE  
POTASIO 50 MILIMOLAR :  $G = -35,5 \text{ KCAL/MOL}$  ( A 25 GRADOS C );  $H = -70$   
 $\text{KCAL/MOL}$  ;  $S = 120 \text{ E.U.}$  (13).

D. FACTORES PROTEICOS.

LOS ESTUDIOS FISICO-QUIMICOS DE DISOCIACION Y REASOCIACION DE LOS RIBOSOMAS DEBIDO AL CAMBIO DEL MEDIO IONICO (15), LO MISMO QUE CIERTAS INVESTIGACIONES SOBRE EL FUNCIONAMIENTO RIBOSOMAL SIN AGREGADO DE SOBRENADANTES PROVENIENTES DEL LISADO CELULAR (16,17,18,19,20), SUGIEREN ENFATICAMENTE QUE LA ESTRUCTURA DEL RIBOSOMA, ES EN SI MISMA AUTOSUFICIENTE PARA EFECTUAR LA TRADUCCION DE POR LO MENOS UN HOMOPOLIMERO SINTETICO. SIN EMBARGO EN EL MEDIO INTRACELULAR SE ENCUENTRAN CIERTOS FACTORES PROTEICOS QUE FACILITAN, HACEN POSIBLE, O ACELERAN LA FUNCION RIBOSOMAL EN CONDICIONES MAS FISIOLOGICAS, EN LO QUE SE REFIERE A CONCENTRACIONES SALINAS, TEMPERATURA, Y CONCENTRACIONES DE NUCLEOSIDO TRIFOSFATOS. EN OTROS CASOS PERMITEN EL RECONOCIMIENTO DE MENSAJEROS NATURALES QUE SON MAS COMPLEJOS QUE LOS HOMOPOLIMEROS. DICHS FACTORES SON:

NOMBRE	ABREVIATURA	PESO MOLECULAR
FACTOR DE INICIACION 1	FI 1	9.000 (90)
FACTOR DE INICIACION 2	FI 2	70.000 (29,91)
FACTOR DE INICIACION 3	FI 3 (FI)	21.000 (28)
FACTOR DE ELONGACION TU	FE TU	19.000 (39,41)
FACTOR DE ELONGACION TS	FE TS	42.000 (39,41)
FACTOR DE ELONGACION G	FE G	73.000 (39,41)
FACTOR DE LIBERACION 1	FL 1	44.000 (55,56)
FACTOR DE LIBERACION 2	FL 2	47.000 (55,56)
FACTOR DE LIBERACION 0	FL 3	46.000 (55,56)

### I.3 MECANISMO DE LA SINTESIS PROTEICA.

SE HA DIVIDIDO ESQUEMATICAMENTE LA SINTESIS PROTEICA EN TRES ETAPAS, QUE SE CARACTERIZAN POR TENER REQUERIMIENTOS DISTINTOS. LA INICIACION DE LA SINTESIS PROTEICA COMPRENDE DESDE LA UNION DEL RIBOSOMA AL M-RNA HASTA LA PRIMERA TRASLOCACION, PASANDO POR LA ADSORCION DEL PRIMER AMINOACIL T-RNA. A PARTIR DE ESTE MOMENTO, Y HASTA QUE EL RIBOSOMA SE ENCUENTRA CON UNA SENAL DE TERMINACION OCURRE LA ELONGACION DE LA CADENA POLIPEPTIDICA. LOS FENOMENOS QUE SUCEDEN POSTERIORMENTE CONSTITUYEN LA ETAPA DE TERMINACION.

#### A. INICIACION:

SI BIEN LOS MECANISMOS POR LOS QUE SE INICIA LA SINTESIS DE UNA CADENA PEPTIDICA SON LOS MAS ESTUDIADOS DE LA BIOSINTESIS PROTEICA, SE LA CONOCE AUN MUCHO MENOS QUE LA ELONGACION. SIN EMBARGO SE SABE QUE SE EFECTUA EN TRES ETAPAS, QUE DAN LUGAR A TRES PRODUCTOS INTERMEDIARIOS DISTINTOS LLAMADOS COMPLEJOS DE INICIACION.

EL COMPLEJO DE INICIACION I, ESTA FORMADO POR EL M-RNA (O EL TRIPLETE AUG), EL FORMIL-METIONIL-T-RNA (F-MET-T-RNA), Y LA SUBUNIDAD 30 S (21). REQUIERE PARA SU FORMACION GTP Y FACTORES DE INICIACION (21,23,24), EN CASO DE UTILIZARSE SUBUNIDADES 30 S LAVADAS CON SOLUCIONES DE CLORURO DE POTASIO O DE AMONIO DE ALTA FUERZA IONICA. LOS FACTORES DE INICIACION (FI 1, FI 2 Y FI 3) PROVIENEN DEL LAVADO RIBOSOMAL CON LAS SOLUCIONES YA MENCIONADAS.

DE LOS FACTORES DE INICIACION, EL MAS IMPORTANTE PARECE SER EL FI 2 (25,26), PORQUE FUNCIONA COMO EJE DEL PROCESO, Y CATALIZA LA UNION DEL F-MET-T-RNA A LA SUBUNIDAD MENOR, EN PRESENCIA DEL TRIPLETE AUG, INCORPORANDOLO AL COMPLEJO. EL FI 1 ESTABILIZA Y ESTIMULA LA MENCIONADA REACCION (26,27).

EL PAPEL DEL FI 3 ES IMPORTANTE EN LA SELECCION DEL M-RNA, PUES ES INDISPENSABLE PARA LA INICIACION CON MENSAJEROS NATURALES, Y ESPECIALMENTE A PARTIR DE LA OBSERVACION DE CIERTA ESPECIFICIDAD PARA ALGUNOS DE LOS MENSAJEROS. SURGE ASI EL CONCEPTO DE HETEROGENEIDAD DEL FI 3. ES DECIR LA EXISTENCIA DE DISTINTAS ESPECIES MOLECULARES DEL MISMO (28).

EL GTP, REQUISITO INDISPENSABLE PARA LA INICIACION, NO SE HIDROLIZA EN LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION I, Y ES PARTE INTEGRANTE DEL MISMO. EL FI 2 TIENE UNA ACTIVIDAD GTPASA EN PRESENCIA DEL RIBOSOMA COMPLETO, POTENCIABLE POR EL FI 1 (29,30).

ALGUNOS AUTORES SUGIEREN (31) QUE LOS FACTORES FI 1 Y FI 2 UNIDOS COMO SE LOS AISLO EN FORMA DE COMPLEJO, SE COMPORTAN EN FORMA SIMILAR A LOS FACTORES DE ELONGACION FE TU-FE TS, PERO ESPECIFICAMENTE PARA EL F-MET-T-RNA. SI BIEN ES UNA HIPOTESIS QUE PLANTEA UN MECANISMO INTERESANTE, NO HA SIDO PROBADA CON EL RIGOR QUE SE UTILIZO EN EL CASO DE LOS FACTORES DE ELONGACION.

LOS FACTORES DE INICIACION NO SE HAN ENCONTRADO NUNCA EN LAS SUBUNIDADES MAYORES, NI EN EL RIBOSOMA COMPLETO, PERO SI SE LOS ENCONTRA EN LA SUBUNIDAD MENOR. ESTO HACE PENSAR QUE EN CUANTO SE FORMA EL COMPLEJO DE INICIACION II, LOS FACTORES DE INICIACION SE LIBERAN DEL COMPLEJO DE INICIACION I.

A CONTINUACION DE LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION I, SE LE UNE LA SUBUNIDAD 50 S, FORMANDOSE ASI EL COMPLEJO DE INICIACION II (32,33), EN EL CUAL EL F-MET-T-RNA SE HALLA APARENTEMENTE EN EL SITIO A, PUES NO REACCIONA CON PUROMICINA. ESTO SE SABE PORQUE UTILIZANDO EN VEZ DE GTP, UN ANALOGO, EL GMP-P-C-P (34), SE FORMA EL COMPLEJO DE INICIACION II, PERO NO HAY FORMACION DE F-MET-PUROMICINA, LO QUE INDICA QUE EL GTP ES NECESARIO PARA UNA TRASLOCACION QUE UBIQUE EL F-MET-T-RNA EN EL SITIO P (35,36,37).

EL COMPLEJO DE INICIACION III ES EN DEFINITIVA EL MISMO COMPLEJO II DESPUES DE LA TRANSLOCACION Y DE QUE HAYA OCURRIDO UNA HIDROLISIS DE GTP (37).

EXISTE, SIN EMBARGO OTRA INTERPRETACION QUE ATRIBUYE EL GASTO DE ENERGIA A UN CAMBIO DE CONFORMACION DE LA SUBUNIDAD 50 S, PARA ADECUARSE AL COMIENZO DE LA SINTESIS PROTEICA. DESDE ESTE PUNTO DE VISTA (38) EL F-MET-T-RNA SE HALLARIA DESDE EL COMIENZO EN EL SITIO P, NO SIENDO NECESARIA LA TRASLOCACION DEL MISMO.

#### B. ELONGACION.

EL F-MET-T-RNA SE ENCUENTRA EN EL SITIO P DEL COMPLEJO DE INICIACION Y EL SITIO A SE HALLA LIBRE CON UN NUEVO CODON, EL QUE CODIFICA AL SEGUNDO AMINOACIDO, EN ESTRECHA VINCULACION CON EL. EN CONDICIONES CERCANAS A LAS FISIOLOGICAS, LA UNION DEL AMINOACIL-T-RNA REQUIERE LA PARTICIPACION DE DOS DE LOS FACTORES DE ELONGACION, EL FE TU Y EL FE TS ADEMAS DEL GTP, QUE ACTUA COMO COFACTOR. LA SECUENCIA DE REACCIONES QUE LLEVAN A LA UNION DEL AA-T-RNA CON EL RIBOSOMA SON LOS SIGUIENTES:



LA FORMA FE TU-FE TS ES LA FORMA ACTIVA DEL FACTOR DE ELONGACION T, QUE ES COMO SE LO DESCUBRIO EN BACTERIAS. ES INTERESANTE MENCIONAR QUE EN LOS EUCARIOTES, EL FACTOR DE ELONGACION QUE HACE LAS VECES DE T ES UNA SOLA MOLECULA PROTEICA. EL FE TS ES DESPLAZADO A SU VEZ POR UNA NUEVA MOLECULA DE GTP, SIN HIDROLISIS DE LA MISMA, Quedando LIBRE EL FE TS :



ESTE COMPLEJO LIGA EL AA-T-RNA, LOS T-RNA DESCARGADOS, Y F-MET-TRNA NUNCA PARTICIPAN DE ESTE COMPLEJO (43).

R 6            FE TU-GTP    AA-T-RNA-----> AA-T-RNA-FETU-GTP    (39,40,44)

EN ESTA FORMA EL AA-T-RNA SE UNE AL COMPLEJO DE INICIACION III, O A CUALQUIER ESTADO RIBOSOMAL CON EL SITIO P OCUPADO POR PEPTIDIL-T-RNA Y EL SITIO A LIBRE, HIDROLIZANDOSE EL FOSFATO GAMMA DEL GTP, LIBERANDOSE FE TU-GDP QUE ES REUTILIZADO COMO EN R 4.

R 7                    AA-T-RNA-FE TU-GDP + RIBOSOMA-M-RNA ----->  
-----> AA-T-RNA-M-RNA-RIBOSOMA + FE TU-GDP + P

ESTA SECUENCIA DE REACCIONES HACE PENSAR QUE LA R 3 SEA QUIZAS UNA REACCION INEXISTENTE "IN VIVO", O DE MUY POCA IMPORTANCIA, SIENDO LA SECUENCIA NATURAL EL PASO DE R 7 A R 4 .

UNA VEZ UBICADO EL AA-T-RNA EN EL SITIO A, TIENE LUGAR LA REACCION DE FORMACION DE LA UNION PEPTIDICA, ENTRE LA F-MET-T-RNA O PEPTIDIL-T-RNA EN EL SITIO P Y EL AMINO DEL AMINOACIDO QUE ACILA EL T-RNA RECIENTEMENTE LIGADO EN EL SITIO A. ESTA REACCION HA SIDO MUY ESTUDIADA UTILIZANDO UN ANALOGO DEL AA-T-RNA , LA PUROMICINA (46). EL PRODUCTO DE LA REACCION EN ESTE CASO ES LA F-MET-PUROMICINA, O PEPTIDIL-PUROMICINA. LA ENZIMA QUE CATALIZA ESTA REACCION ES PARTE CONSTITUYENTE DEL RIBOSOMA, ESPECIFICAMENTE DE SU SUBUNIDAD MAYOR (47), Y ES LLAMADA PEPTIDIL TRANSFERASA O PEPTIDIL SINTETASA. ESTA REACCION NO CONSUME MAS ENERGIA QUE LA QUE ESTA CONTENIDA EN LA UNION ESTER ENTRE EL AMINOACIDO Y LA RIBOSA DEL ADENILO 3' TERMINAL DEL T-RNA. ES DECIR QUE LA ENERGIA QUE SE UTILIZA ES LA DE LA ACTIVACION DEL AMINOACIDO,( VER R1 Y R2 ).(48).

UNA VEZ EFECTUADA LA REACCION, QUEDA EN EL SITIO P UN T-RNA DESCARGADO, Y EN EL SITIO A UN PEPTIDIL-T-RNA. ES LOGICO PENSAR QUE EL SITIO P TIENE UNA AFINIDAD COMPARATIVAMENTE MENOR POR EL T-RNA DESCARGADO QUE POR EL PEPTIDIL-T-RNA, LO QUE LLEVA A QUE ESTE DESPLACE A AQUEL DEL SITIO P. ESTE PROCESO OCURRE CONCOMITANTEMENTE CON UN MOVIMIENTO RIBOSOMAL A LO LARGO DEL M-RNA, EN UN INTERVALO DE UN TRIPLETE, LO QUE HACE QUE UN NUEVO CODON , EL SIGUIENTE, SE ENCUENTRE EN EL SITIO A .

ESTE PROCESO, LA TRASLOCACION, REQUIERE LA PRESENCIA DE UN FACTOR PROTEICO, FE G (49), COMUNMENTE LLAMADO TRASLOCASA, AISLADO DE LA FRACCION SOLUBLE DEL LISADO BACTERIANO, Y QUE TIENE ACTIVIDAD GTPASA (50). ESTA ACTIVIDAD PUEDE DETECTARSE AUN EN AUSENCIA DE TRASLOCACION , PERO SIEMPRE EN PRESENCIA DE LOS RIBOSOMAS,(51).

LUEGO DE LA TRASLOCACION, EL PEPTIDIL-T-RNA SE ENCUENTRA EN EL SITIO P. EL SITIO A ESTA ENFRENTADO A UN NUEVO CODON, Y EN CONDICIONES DE LIGAR UN NUEVO AA-T-RNA. ESTA SECUENCIA DE REACCIONES SE REPITE HASTA LA TERMINACION DE LA CADENA PEPTIDICA CODIFICADA EN EL M-RNA.

### C. TERMINACION.

SI EN EL SITIO A DEL RIBOSOMA QUEDA UN CODON SIN SENTIDO EL PEPTIDIL-T-RNA SE HIDROLIZA, LIBERANDOSE LA CADENA PEPTIDICA. ESTE PROCESO SE LLAMA TERMINACION. PUEDE SER UNA TERMINACION FISIOLÓGICA. EN ESTE CASO LA PROTEINA LIBERADA EXPRESA TOTALMENTE LA FUNCIÓN GENÉTICAMENTE TRASMITIDA. PERO TAMBIÉN PUEDE SER UNA TERMINACION PREMATURA DEBIDO A UNA MUTACION QUE MODIFICA ALGUNOS CODONES DANDO ORIGEN A ALGUNA DE LAS SEÑALES DE TERMINACION UAA, UAG, O UGA.

ADEMÁS DE LAS SEÑALES DE TERMINACION, SE REQUIEREN FACTORES PROTEICOS, QUE SE HALLAN EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL LISADO BACTERIANO (52,53). PARA ESTUDIAR ESTE PROCESO SE UTILIZARON DOS SISTEMAS. EL PRIMERO FUE LA TRADUCCIÓN DE LOS PRIMEROS SEIS CODONES DEL RNA DE UNA MUTACION AMBER DEL FAGO R 17 ( CAPECCHI). SE SINTETIZA EL HEXAPEPTIDO Y SE ESTUDIAN LAS CONDICIONES Y REQUERIMIENTOS PARA LA LIBERACION DEL MISMO AL LLEGAR AL SEPTIMO CODON QUE EN ESTE CASO ES UAG EN VEZ DEL UGG ( TRIPTOFANO ) QUE SE ENCUENTRA EN LA CEPA SILVESTRE. EL OTRO SISTEMA ( CASKEY Y COL.) MIDE LA LIBERACION DE F-METIONINA DEL COMPLEJO DE INICIACION F-MET-T-RNA-AUG-RIBOSOMA, AL AGREGARLE LOS DISTINTOS CODONES DE TERMINACION (54). SI BIEN ESTE METODO ES MENOS "FISIOLÓGICO", PERMITIO UN AVANCE MÁS ACELERADO, Y SE PUDIERON SEPARAR DOS FACTORES LLAMADOS FL 1 Y FL 2 (55,56), AMBOS ACTIVOS CON EL TRIPLETE UAA. ADEMÁS EL FL 1 ES ESPECÍFICO PARA EL TRIPLETE UAG, Y EL FL 2 ES ESPECÍFICO PARA UGA. AMBOS FACTORES SON PROTEINAS (56,57) Y CUMPLEN LAS SIGUIENTES FUNCIONES:

# 1: LA DE LIGARSE AL RIBOSOMA EN PRESENCIA DEL TRIPLETE DE TERMINACION, ES DECIR QUE RECONOCEN EL TRIPLETE. ES UNA REACCIÓN MUY ESPECÍFICA. ASOCIADO A ESTA REACCIÓN SE HA AISLADO UN TERCER FACTOR, EL FL 3, LLAMADO ANTERIORMENTE S (58), QUE ESTIMULA LA ACTIVIDAD DE AMBOS FACTORES, AUMENTANDO LA AFINIDAD POR EL RIBOSOMA. POR EJEMPLO DISMINUYE LA  $K_M$  DEL FL 2 POR EL TRIPLETE UAA DE  $8,3 \times 10^{-5}$  A  $1,3 \times 10^{-5}$ .

# 2: PARTICIPAR EN LA HIDROLISIS DEL PEPTIDIL-T-RNA, ES DECIR EN LA TRANSFERENCIA DEL PEPTIDOLO A UNA MOLECULA DE AGUA QUE ACTUA COMO MOLECULA ACEPTADORA EN VEZ DE OTRO AMINOACIL-T-RNA. EL HECHO DE QUE EL PEPTIDIL-T-RNA DEBE ESTAR EN EL SITIO P PARA QUE LA HIDROLISIS OCURRA, NO SIENDO REACTIVO SI SE HALLA EN EL SITIO A HACE PENSAR EN LA PARTICIPACION CONJUNTA DE LA PEPTIDIL SINTETASA.

UNA FUNCIÓN QUE PUEDE SER MUY IMPORTANTE A MEDIDA QUE AVANCE SU ESTUDIO ES LA PARTICIPACION DEL FL 3 EN LA DISOCIACION DEL COMPLEJO T-RNA-UAA-RIBOSOMA UNA VEZ LIBERADA LA PROTEINA (59). NO ESTA DEFINIDA AUN LA POSIBLE INTERVENCION E HIDROLISIS DEL GTP EN LA REACCIÓN DE TERMINACION. DE ESTE MODO, UNA VEZ TERMINADA SU SINTESIS, SE LIBERA LA CADENA PEPTIDICA DEL RIBOSOMA.

## I. 4. EL CICLO RIBOSOMAL.

EN UNA BACTERIA QUE CRECE LOGARITMICAMENTE, EN UN MEDIO RICO EN NUTRIENTES, LA CANTIDAD DE RIBOSOMAS PUEDE LLEGAR A ALREDEDOR DE 30.000 (61,62), Y EN SU GRAN MAYORIA SE LOS ENCUENTRA SINTETIZANDO PROTEINAS EN FORMA ACTIVA (63). EL TIEMPO DE SINTESIS DE LOS RIBOSOMAS ES DE ALREDEDOR DE CINCO MINUTOS (CON UN TIEMPO DE GENERACION BACTERIANA DE TREINTA ) (64, 65). LA CANTIDAD DE RIBOSOMAS QUE SE SINTETIZAN AL MISMO TIEMPO HACE QUE SOLO 1-5 % DE LOS RIBOSOMAS FUNCIONANTES SEAN REALMENTE NUEVOS. ESTO, UNIDO A LA DEMOSTRADA INTEGRIDAD DE LAS SUBUNIDADES DURANTE VARIAS GENERACIONES (65) PERMITE CONSIDERAR QUE LOS RIBOSOMAS PARTICIPAN EN MAS DE UNA VUELTA DE SINTESIS PROTEICA. ESTE HECHO OBLIGA A ADMITIR LA EXISTENCIA DE UN CICLO DE RIBOSOMAS QUE DETERMINA LA REUTILIZACION DE LOS MISMOS SOBRE CUALQUIER M-RNA DISPONIBLE LUEGO DE LA TERMINACION DE CADA CADENA PEPTIDICA.

EL DESCUBRIMIENTO DE LOS POLIRRIBOSOMAS (66,67) UBICO EL PROBLEMA EN SU VERDADERA MAGNITUD, COMO PARTE DE LA ECONOMIA CELULAR.

EN ESTE SENTIDO EL RIBOSOMA CUMPLE UN CICLO; UNA DE SUS PARTES SE HALLA RELACIONADA CON EL M-RNA, Y EN ELLA ESTA INICIANDO, ELONGANDO O TERMINANDO UNA CADENA PEPTIDICA. LA OTRA PARTE COMIENZA A PARTIR DE LA TERMINACION DE LA CADENA, CUANDO EL RIBOSOMA PIERDE SU RELACION FISICA CON EL M-RNA, Y SE CIERRA CON LA INICIACION DE UNA NUEVA CADENA. ESTA SEGUNDA PARTE DEL CICLO RIBOSOMAL ES LA QUE NOS INTERESA EN ESTE TRABAJO.

EL MODELO DE LA INICIACION DE LA SINTESIS PROTEICA PROPUESTO POR NOMURA Y LOWRY (21,68), CONCEPTUALIZADO POSTERIORMENTE POR WATSON EN RELACION CON EL CICLO RIBOSOMAL (69), EXIGE EL ESTADO DISOCIADO DE LOS RIBOSOMAS COMO CONDICION NECESARIA PARA LA INICIACION DE LA TRADUCCION DE UN MENSAJERO NATURAL, EN PRESENCIA DE FACTORES DE INICIACION Y BAJA CONCENTRACION DE IONES MAGNESIO. ESTE HECHO VIENE A SER EL PRIMER REQUISITO QUE DEBE CONTEMPLAR CUALQUIER MODELO QUE INTENTE DESCRIBIR O EXPLICAR LO QUE OCURRE CON EL RIBOSOMA EN LA SEGUNDA MITAD DEL CICLO.

LOS PRIMEROS INTENTOS SE REALIZARON BUSCANDO METODOS DE LISIS SUAVE DE LAS BACTERIAS, QUE PERMITIERAN VER RAPIDAMENTE EL PERFIL DE RIBOSOMAS, CONSERVANDO EN LO POSIBLE LA INTEGRIDAD DE LOS POLIRRIBOSOMAS (60,61,62). MANGIAROTTI Y SCHLESSINGER HALLARON QUE LOS RIBOSOMAS ESTABAN DISTRIBUIDOS EN CANTIDADES IGUALES ENTRE POLIRRIBOSOMAS Y SUBUNIDADES, FALTANDO LLAMATIVAMENTE LAS PARTICULAS 70 S. EN SUS EXPERIMENTOS LAS SUBUNIDADES NO ESTAN UNIDAS A M-RNA, NI TIENDEN A REASOCIARSE AL AUMENTAR LA CONCENTRACION DEL CATION MAGNESIO A 10 MILIMOLAR, POR LO QUE LAS LLAMARON SUBUNIDADES "NATIVAS" A DIFERENCIA DE LAS SUBUNIDADES "DERIVADAS" OBTENIDAS POR EL DESCENSO DE LA CONCENTRACION DE MAGNESIO, QUE SI TIENDEN A REASOCIARSE SI SE LES REPONE DICHO CATION DIVALENTE. PROPUSIERON DE ESTE MODO EL PRIMER MODELO DE CICLO RIBOSOMAL (63,64), EN EL QUE EL RIBOSOMA SE DISOCIA AL TERMINAR LA SINTESIS PROTEICA, PASANDO ASI LAS SUBUNIDADES COMO TALES A DISPONIBILIDAD HASTA QUE SON NUEVAMENTE USADAS. CONSECUENTEMENTE INTERPRETARON QUE LAS UNIDADES 70 S PROVENIAN DE LA DEGRADACION DE LOS POLIRRIBOSOMAS POR RUPTURAS NO FISIOLOGICAS EN LA

MOLECULA DE M-RNA.

SIN EMBARGO OTROS GRUPOS DE INVESTIGACION NO COMPARTIERON ESTE PUNTO DE VISTA, AL NO PODER CONFIRMAR LA AUSENCIA DE LAS PARTICULAS 70 S. ESTAS APARECIAN CONSTANTEMENTE EN LOS LISADOS DE MUCHAS ESPECIES BACTERIANAS, CON METODOS TAN SUAVES QUE LOGRABAN UNA DISTRIBUCION DE LOS RIBOSOMAS CON UN 75 % EN FORMA DE POLIRRIBOSOMAS, 15-20 % COMO UNIDADES 70 S Y 5-10 % COMO SUBUNIDADES (63,75,76,77).

A PARTIR DE ESTE HECHO SE PLANTEO UNA LARGA Y A VECES COMPLICADA POLEMICA ACERCA DEL PAPEL DE LA PARTICULA 70 S, QUE PUEDE RESUMIRSE AHORA EN LOS SIGUIENTES TERMINOS:

POR LO MENOS PARTE DE LAS PARTICULAS 70 S OBSERVADAS EN LOS LISADOS, NO PROVIENEN DE LA DEGRADACION DE LOS POLIRRIBOSOMAS (MONOSOMAS), PUES SON MAS SENSIBLES QUE ELLOS AL DESCENSO DE LA CONCENTRACION DE MAGNESIO, (SE DISOCIAN A 1 MILIMOLAR, EN CAMBIO LOS MONOSOMAS SE DISOCIAN POR DEBAJO DE DICHA CONCENTRACION), (64,78); ADEMAS POCOS DE LOS RIBOSOMAS CONTIENEN PEPTIDIL-T-RNA DETECTABLE LUEGO DE UN PULSO CON AMINOACIDOS RADIOACTIVOS (75); TAMPOCO ESTAN UNIDOS A M-RNA (75,80).

UNA CARACTERISTICA DE TODOS LOS METODOS DE LISIS QUE MOSTRABAN LA EXISTENCIA DE PARTICULAS 70 S ERA QUE LA CONCENTRACION SALINA ERA MUY CERCA A LA FISIOLÓGICA: POTASIO :50-100 MILIMOLAR, MAGNESIO 3-8 MILIMOLAR; LO CUAL SUGIRIO QUE EL HALLAZGO DE SCHLESSINGER Y COL. PODRIA SER UN RESULTADO ARTIFICIAL, DEBIDO A LA ALTA CONCENTRACION SALINA DE SUS PREPARACIONES, Y ESPECIALMENTE A LA PRESENCIA DE SODIO. ESTO FUE CONFIRMADO POR VARIOS AUTORES (78,80,81,82). EN ESTE SENTIDO QUEDABA CLARA LA EXISTENCIA DE LA ENTIDAD RIBOSOMAL DE COEFICIENTE DE SEDIMENTACION 70 S. ALGUNAS, INDUDABLEMENTE, SON MONOSOMAS PROVENIENTES DE LA DEGRADACION DE POLIRRIBOSOMAS, O COMPLEJOS DE INICIACION 70 S, CON PEPTIDIL-T-RNA, O F-MET-T-RNA, (COMPLEJOS DE INICIACION II Y III), OTROS, EN CAMBIO SON RIBOSOMAS LIBRES, DISOCIABLES POR BAJA CONCENTRACION DE ION MAGNESIO, POR SODIO, POR TRATAMIENTO MUY SUAVE CON RNASA (83), O POR LA INCUBACION CON UN FACTOR PROTEICO PROCEDENTE DEL LAVADO RIBOSOMAL CON SOLUCIONES CONCENTRADAS DE CLORURO DE AMONIO. POR ESTA RAZON, ESTE NUEVO FACTOR SE DENOMINO FACTOR DISOCIANTE (FD) (75,84,85).

ESTE TIPO DE PARTICULAS 70 S SON LAS QUE AUMENTAN EN LOS LISADOS DE BACTERIAS QUE HAN SIDO SOMETIDAS A LA ACTINOMICINA D (ANTIBIOTICO QUE INHIBE LA SINTESIS DE RNA, Y PRODUCE LA DESAPARICION DE MENSAJEROS)(76), O A LA PUROMICINA, QUE LIBERA EL PEPTIDO DEL RIBOSOMA(78), O AL AYUNO DE CIERTOS NUTRIENTES DE REQUERIMIENTO ABSOLUTO (84,85,86).

DADOS LOS ARGUMENTOS QUE FAVORECEN LA EXISTENCIA REAL DE LAS PARTICULAS 70 S, EN DISCORDANCIA CON LOS RESULTADOS DE SCHLESSINGER Y COL. Y EXPLICADAS ESTAS DIVERGENCIAS, TANTO ALGRANATI Y COLABORADORES, COMO DAVIS Y COLABORADORES FAVORECIERON LA HIPOTESIS DE QUE REALMENTE EL PRODUCTO QUE SE DESPRENDE DEL M-RNA LUEGO DE LA TERMINACION, ES LA PARTICULA 70 S (78,85). A ESTO SE AGREGA EL DESCUBRIMIENTO DEL FACTOR DISOCIANTE CUYA ACCION FISIOLÓGICA SERIA DISOCIAR EL RIBOSOMA, DEJANDOLO ASI EN

## CONDICIONES DE REINICIAR.

LOS TRABAJOS DISCUTIDOS HASTA AHORA PROVIENEN DEL ESTUDIO DE LOS PERFILES RIBOSOMALES, DISTRIBUCION DE POLIRRIBOSOMAS, UNIDADES Y SUBUNIDADES "IN VIVO", Y DEL MARCADO CON PULSOS CON AMINOACIDOS, FOSFORO Y URACILO RADIOACTIVOS.

OTRA DE LAS METODOLOGIAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DEL CICLO RIBOSOMAL ES EL DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES. SI UN CULTIVO QUE CRECE UN MEDIO CON ISOTOPOS PESADOS ES TRANSFERIDO A UN MEDIO CON ISOTOPOS LIVIANOS, SE NOTA QUE EN EL LISADO COEXISTEN UNIDADES RIBOSOMALES DE COEFICIENTES DE SEDIMENTACION CORRESPONDIENTES A LAS INTEGRADAS TOTALMENTE POR ISOTOPOS LIVIANOS Y PESADOS, PERO TAMBIEN SE ENCUENTRAN RIBOSOMAS HIBRIDOS (86), INTERPRETADOS DE ACUERDO AL MODELO DE CICLO DE SCHLESSINGER Y COL. COMO RIBOSOMAS QUE, PREVIA DISOCIACION AL TERMINAR LA SINTESIS SE REASOCIARON AL AZAR AL REINICIARLA. EL MISMO FENOMENO SE PUEDE OBSERVAR "IN VITRO" (87,88), INCUBANDO EN CONDICIONES ADECUADAS PARA LA SINTESIS PROTEICA POLIRRIBOSOMAS DE ISOTOPOS LIVIANOS JUNTO CON OTROS DE ISOTOPOS PESADOS, OBTENIENDOSE TAMBIEN RIBOSOMAS DE COEFICIENTE DE SEDIMENTACION HIBRIDO; ESTOS NO APARECEN EN PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS QUE INHIBEN LA SINTESIS PROTEICA.

EN ESTOS ESTUDIOS "IN VITRO" SE NOTO QUE ALGUNOS DE LOS RIBOSOMAS HIBRIDOS SE COMPORTAN COMO SI FUERAN RIBOSOMAS LIBRES, Y NO DE REINICIACION, PLANTEANDOSE LA POSIBILIDAD DE QUE EXISTA OTRO TIPO DE INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES QUE DEPENDA DE LA SINTESIS PROTEICA, PERO QUE SEA INDEPENDIENTE DE LA REINICIACION. EN OTRAS PALABRAS, EN SISTEMAS SUBOPTIMOS, EN QUE LA REINICIACION LIMITA LA CONTINUIDAD DE LA REACCION, EL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES SE PRODUCE COMO CONSECUENCIA DE LA DISOCIACION CONCOMITANTE CON LA TERMINACION, Y LA POSTERIOR REASOCIACION FORMANDO EL RIBOSOMA LIBRE. DE ESTE MODO, KAEMPFER INTERPRETO SUS RESULTADOS COMO UNA PRUEBA DE LA DISOCIACION CONCOMITANTE CON LA TERMINACION (MODELO DE SCHLESSINGER) CON LA VARIANTE DE ADMITIR LA ACUMULACION DE PARTICULAS 70 S CUANDO LA SINTESIS PROTEICA NO FUNCIONA A PLENA CAPACIDAD. SE OBTUVIERON RESULTADOS SIMILARES UTILIZANDO SUBUNIDADES 30 S RADIOACTIVAS Y ESTUDIANDO EL INTERCAMBIO EN FUNCION DE LA CANTIDAD DE RADIOACTIVIDAD QUE PASA DE LA ZONA DE LA SUBUNIDAD MENOR A LA ZONA DE LA PARTICULA 70 S EN EL GRADIENTE (89).

SIN EMBARGO LAS PARTICULAS 70 S LIBRES TAMBIEN INTERCAMBIAN SUS SUBUNIDADES CON OTRAS RADIOACTIVAS, SIN NECESIDAD DE SINTESIS PROTEICA NI DE TERMINACION EXPRESANDO EL EQUILIBRIO DINAMICO DE LA REACCION :



ESTO VUELVE A PONER EN DUDA EL DESPRENDIMIENTO DEL RIBOSOMA EN LA FORMA DISOCIADA, PUES DEJA ABIERTA LA POSIBILIDAD DE QUE LUEGO DE LA TERMINACION, EL RIBOSOMA SE DESPRENDA COMO PARTICULA 70 S, Y ESTA INTERCAMBIA SUS SUBUNIDADES .

POR OTRA PARTE, LA PUROMICINA, UN ANTIBIOTICO QUE INHIBE LA SINTESIS DE PROTEINAS TANTO "IN VIVO" COMO "IN VITRO" Y QUE QUIMICAMENTE ES UN ANALOGO DEL AA-T-RNA, PRODUCE LA TERMINACION ABRUPTA Y NO FISIOLÓGICA DE LA SINTESIS DE LA CADENA PEPTIDICA, LA QUE SE LIBERA COMO PEPTIDIL-PUROMICINA (46,95,96,97). EL AGREGADO DE PUROMICINA A LOS CULTIVOS BACTERIA- NOS PRODUCE LA DEGRADACION DE LOS POLIRRIBOSOMAS Y SU REEMPLAZO CUANTI- TATIVO POR PARTICULAS 70 S QUE SE COMPORTAN COMO PARTICULAS LIBRES TANTO FRENTE A LAS BAJAS CONCENTRACIONES DE MAGNESIO COMO EN OTRAS CONDICIONES ESTUDIADAS, (76,98,99). SCHLESSINGER (72) ENCONTRO QUE LA PUROMICINA DISOCIA EL RIBOSOMA EN SUBUNIDADES, AUNQUE ESTE RESULTADO NO HA SIDO CONFIRMADO POR OTROS AUTORES, SINO QUE MAS BIEN SE LO CUESTIONA POR SER EL SUYO UN SISTEMA MUY POCO FISIOLÓGICO. EN 1969 KAEMPFER Y MESELSON (87) ENCONTRARON QUE LA PUROMICINA AUMENTA EL INTERCAMBIO DE LAS SUB- UNIDADES EN UN SISTEMA DE POLIRRIBOSOMAS QUE ESTA SINTETIZANDO PROTEINAS Y SE LO ATRIBUYERON A LA MAYOR DISPONIBILIDAD DE LAS SUBUNIDADES PARA REINICIAR O POR LO MENOS PARA ACOPLARSE DE NUEVO A UN MENSAJERO.

ES OBVIO QUE LA INDEFINICION Y APARENTE CONTRADICCION DE LOS RESULTADOS Y MODELOS, SE BASAN EN QUE NO HA PODIDO DEMOSTRARSE SIN LUGAR A DUDAS LA FORMA EN QUE EL RIBOSOMA SE DESPRENDE DEL MENSAJERO (DESACOPLAMIENTO), LUEGO DE LA TERMINACION DE LA CADENA PEPTIDICA. SIN NEGAR SU IMPORTANCIA CREO QUE NO ES SUFICIENTE APORTAR ARGUMENTOS A FAVOR O EN CONTRA DE UN MODELO U OTRO.

EN LAS PAGINAS QUE SIGUEN NOS PROPONEMOS DESCRIBIR LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS Y LAS INTERPRETACIONES DESARROLLADAS QUE NOS PERMITEN RESOL- VER ESE PROBLEMA.

## II. MATERIALES Y TECNICAS

### II. 1: BACTERIAS Y CULTIVOS.

A. EN TODOS LOS EXPERIMENTOS PRESENTADOS AQUI SE HA USADO LA BACTERIA ESCHERICHIA COLI. SE ELIGIO LA CEPA D 10, OBTENIDA POR GESTELAND (100), Y CARACTERIZADA POR SER MET -, Y RNASA I -. ESTE ULTIMO DETALLE ES EL QUE DECIDIO LA ELECCION, PUES LA AUSENCIA DE LA RNASA I AUMENTA LAS POSIBILIDADES DE OBTENER POLIRRIBOSOMAS, ( ESPECIALMENTE A PARTIR DE GRANDES CULTIVOS), Y SOBRENADANTE BACTERIANO (S 150) CON POCA ACTIVIDAD NUCLEOLITICA. AMBAS FRACCIONES CELULARES SON NECESARIAS PARA LA SINTESIS PROTEICA IN VITRO.

B. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO: SE UTILIZARON DOS MEDIOS DE CULTIVO.  
 1. MEDIO A. ESTE MEDIO SE USO CUANDO SE CULTIVABAN BACTERIAS PARA OBTENER RIBOSOMAS. CADA LITRO DEL MEDIO CONTIENE CLORURO DE AMONIO 1,1 GR.; CLORURO DE SODIO 0,5 GR.; CLORURO DE POTASIO 8 GR.; TRIS (TRIS HIDROXIMETIL-AMINO METANO) 12,1 GR.; FOSFATO DIPOTASICO 46 MG.; SULFATO DISODICO 22,5 MG.; CLORURO DE CALCIO 1,25 MILIMOLES; CLORURO DE MAGNESIO 1,25 MILIMOLES; GLUCOSA 2 GR. EL PH SE AJUSTA A 7,4 CON ACIDO CLORHIDRICO CONCENTRADO. CUANDO ESTE MEDIO NO SE USA PARA OBTENER COMPONENTES CELULARES MARCADOS CON AMINOACIDOS RADIOACTIVOS, SE LO SUPLEMENTA CON 1,5 GR DE UNA MEZCLA DE AMINOACIDOS OBTENIDOS DE LA DIGESTION DE CASEINA (CASAMINO ACIDOS DIFCO).

2. MEDIO 9. EMPLEADO CUANDO LAS BACTERIAS CULTIVADAS SERVIAN PARA OBTENER SOBRENADANTE DEL LISADO (S 150). CONTIENE POR LITRO: FOSFATO DISODICO 6 GR.; FOSFATO MONOPOTASICO 3 GR.; CLORURO DE SODIO 0,5 GR.; SULFATO DE MAGNESIO (.7 H<sub>2</sub>O) 0,2 GR.; CLORURO DE AMONIO 1 GR.; GLUCOSA 2 GR.; CASAMINOACIDOS DIFCO 2 GR. EL PH SE AJUSTA A 7,1 CON ACIDO CLORHIDRICO CONCENTRADO.

LOS CULTIVOS SE DESARROLLARON A PARTIR DE INOCULOS CULTIVADOS DESDE LA NOCHE ANTERIOR. LA INCUBACION SE REALIZO A 37 GRADOS C EN UN BAÑO ROTATORIO DE ALREDEDOR DE 200 CICLOS POR MINUTOS. CUANDO SE REALIZABAN CULTIVOS DE GRAN VOLUMEN SE LOS COLOCABA EN UN BAÑO A 37 GRADOS C, Y SE LES INYECTABA AIRE A PRESION (3,5 KG/CM<sup>2</sup>). EL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS SE MONITOREA POR LA TURBIDEZ EN UN ESPECTROFOTOMETRO A 700 NM DE LONGITUD DE ONDA CON CELDAS DE 1 CM DE PASO DE LUZ. HABITUALMENTE DESPUES DE LA SIEMBRA DEL INOCULO LA LECTURA ERA DE 0,035 A 0,050 UNIDADES DE A. EL TIEMPO MEDIO DE GENERACION DE ESTA CEPA EN MEDIO A ES DE 33 MINUTOS, Y DE 30 MINUTOS EN EL MEDIO 9. LA FASE DE CRECIMIENTO LOGARITMICO CONTINUA HASTA UNA TURBIDEZ DE ALREDEDOR DE 0,850 UNIDADES DE A, (FIGURA 1), LO QUE EQUIVALE A  $1,2 \times 10^9$  BACTERIAS POR CC. LUEGO COMIENZA PAULATINAMENTE LA FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO.

### II. 2: DETENCION DEL CRECIMIENTO Y COSECHA.

EN EL ESTUDIO DE LA SINTESIS PROTEICA EN BACTERIAS, LAS REACCIONES Y FENOMENOS ESTUDIADOS DEPENDEN EN GRAN MEDIDA DE LA VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO DE LAS CELULAS EN CRECIMIENTO.

EN LA FASE LOGARITMICA, TODO EL METABOLISMO CELULAR SE HALLA FUNCIONANDO

-----  
A GRAN VELOCIDAD. ESO VALE TAMBIEN PARA LA FUNCION RIBOSOMAL. ES POR ESO QUE UN ENFRIAMIENTO LENTO DEL CULTIVO VA DISMINUYENDO GRADUALMENTE LA VELOCIDAD DEL MOVIMIENTO RIBOSOMAL. ESTO ACUMULA RIBOSOMAS LIBRES, (LLAMADOS EN LA LITERATURA INGLESA "RUN OFF RIBOSOMES", Y QUE EN ESTA TESIS, A PESAR DE LA EVIDENTE SIMPLIFICACION, LLAMAREMOS RIBOSOMAS DE TERMINACION). LA BAJA TEMPERATURA AFECTA MAS RAPIDAMENTE LA INICIACION DE LA SINTESIS PEPTIDICA QUE SU ELONGACION Y TERMINACION. ES POR ESO QUE CUANDO SE NECESITAN PREPARACIONES RICAS EN POLIRRIBOSOMAS, ES INDISPENSABLE UNA DE LAS DOS METODOLOGIAS HABITUALMENTE USADAS: ENFRIAMIENTO INSTANTANEO A MENOS DE 8 GRADOS C, O EL AGREGADO DE INHIBIDORES DE LA ELONGACION COMO SER EL ANTIBIOTICO CLORANFENICOL. EN NUESTRO CASO, PARA IMPEDIR LA INTERFERENCIA QUE LOS ANTIBIOTICOS PODRIAN EJERCER EN NUESTRAS EXPERIENCIAS, HEMOS EMPLEADO LA PRIMERA DE LAS TECNICAS MENCIONADAS.

A. ENFRIAMIENTO RAPIDO: AL LLEGAR LA DENSIDAD OPTICA DEL CULTIVO A ALREDEDOR DE 0,420 - 0,450 UNIDADES DE A (DENSIDAD A LA QUE HABITUALMENTE COSECHAMOS NUESTRAS BACTERIAS, Y QUE EQUIVALEN A ALREDEDOR DE  $6 \times 10^8$  BACTERIAS POR CC ), SE VUELCA EL CULTIVO SOBRE UN VOLUMEN IGUAL DE HIELO GRANIZADO Y SOBREENFRIADO A -4 GRADOS C, AGITANDO RAPIDAMENTE. ESTA TECNICA PERMITE QUE EN MENOS DE 8 SEGUNDOS, LA MASA LIQUIDA ALCANCE TEMPERATURAS ENTRE 0 Y 2 GRADOS C, SIN CONGELARSE.

B. ENFRIAMIENTO LENTO: CUANDO NO ES IMPORTANTE EL MANTENIMIENTO DE LA RIQUEZA POLIRRIBOSOMAL, O CUANDO LO QUE SE BUSCA ES EL AUMENTO DE LA PROPORCION DE RIBOSOMAS DE TERMINACION O LIBRES, SE PROCEDE A ENFRIAR LENTAMENTE EL CULTIVO. PARA ESO SE LO COLOCA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 15 MINUTOS, MANTENIENDO LA AGITACION O LA INYECCION DE AIRE. LUEGO SE SIGUE ENFRIANDO DURANTE 30 MINUTOS MAS EN HIELO, LLEGANDO ASI A LOS 2 GRADOS C, Y SE DEJA ASI DURANTE 30 MINUTOS MAS PARA COMPLETAR EL CICLO DE TERMINACION DE LA SINTESIS PROTEICA. HAY QUE HACER NOTAR QUE E. COLI NO SE DIVIDE MAS POR DEBAJO DE 8 GRADOS C, BASICAMENTE POR DETENCION DE LA INICIACION DE LA SINTESIS PROTEICA. DURANTE EL ENFRIAMIENTO LENTO, EL CULTIVO AUMENTA EN UNOS 25 A 35 % SU DENSIDAD OPTICA, Y POR LO TANTO EL RENDIMIENTO EN BACTERIAS.

C. COSECHA: LAS BACTERIAS SE COSECHAN POR CENTRIFUGACION. EN EL CASO DE VOLUMENES MENORES DE 6 LITROS USAMOS UNA CENTRIFUGA SORVAL RC-2B CON CABEZAL DE TRES LITROS. CUANDO SON VOLUMENES MAYORES, DE HASTA 20 LITROS, USAMOS UNA CENTRIFUGA ALFA LAVAL.

LAS CELULAS SE RESUSPENDEN EN AMBOS CASOS EN UNA SOLUCION DE TAMPON 2 Y SE VUELVEN A CENTRIFUGAR A 5000 X G DURANTE 5 MINUTOS. EL PELLET DE BACTERIAS SE ENCUENTRA EN CONDICIONES PARA SU POSTERIOR UTILIZACION.

## II. 3: LISIS DE LAS BACTERIAS.

PARA UTILIZAR LOS COMPONENTES DE LAS BACTERIAS, ES NECESARIO ROMPERLAS. ESA RUPTURA PUEDE SER HECHA DE MUCHAS MANERAS, DEPENDIENDO DE LA LABILIDAD DE LOS COMPONENTES A ESTUDIAR. EN NUESTRO CASO LOS POLIRRIBOSOMAS SON DE UNA GRAN FRAGILIDAD MECANICA. YA SEA LA SIMPLE MOLIENDA, O UN TRATAMIENTO OSMOTICO VIOLENTO, TIENDE A DESINTEGRARLOS POR LA FRICCION O LA TURBULENCIA. ES POR ESO QUE PARA OBTENER POLIRRIBOSOMAS, SE UTILIZO UN METODO DE LISIS ENZIMATICA DE LAS BACTERIAS. ESTE PROCEDIMIENTO SE

EMPLADO TAMBIEN PARA DISMINUIR EL RIESGO DE CONTAMINACION Y AUMENTAR LA RECUPERACION EN LA OBTENCION DE RIBOSOMAS RADIOACTIVOS. EN CAMBIO PARA LA OBTENCION DE OTROS COMPONENTES SE UTILIZO UNA RUPTURA MECANICA.

A. RUPTURA MECANICA DE LAS BACTERIAS: CONSISTE BASICAMENTE EN UNA MOLIENDA DE LAS BACTERIAS EN PRESENCIA DE UN AGENTE ABRASIVO, EL OXIDO DE ALUMINIO. A UNA CANTIDAD DE BACTERIAS SE LE AGREGA DOS VECES SU PESO DE ALUMINA, MANTENIENDO LA MEZCLA ENTRE 0 Y 4 GRADOS C, SE MUELE EN MORTERO DURANTE PERIODOS DE UN MINUTO, CON INTERVALOS DE UN MINUTO, REALIZANDO UNA MOLIENDA NETA DE 5-10 MINUTOS. LA PASTA ASI LOGRADA SE RESUSPENDE EN 4 VOLUMENES DE UNA SOLUCION DE TAMPON 5 POR GRAMO DE BACTERIAS. ESTA SOLUCION TAMBIEN CONTIENE CLORURO DE POTASIO 50 MILIMOLAR EN CASO DE UTILIZARSE LOS RIBOSOMAS DE ESAS BACTERIAS ( TAMPON 2 ). LA SUSPENSION SE CENTRIFUGA A 30.000 X G DURANTE 30 MINUTOS, Y EL SOBRENADANTE SE VUELVE A CENTRIFUGAR DE LA MISMA FORMA. ESTE SOBRENADANTE SE DENOMINA S 30, Y SE UTILIZA PARA ULTERIORES FRACCIONAMIENTOS Y PURIFICACIONES.

B. LISIS ENZIMATICA: SE BASA EN EL HECHO DE QUE LA PARED CELULAR DE E. COLI, COMO BACTERIA GRAM NEGATIVA, ES ATACADA POR LA LISOZIMA EN PRESENCIA DE UN AGENTE QUELANTE DEL MAGNESIO. LA LISOZIMA (MURAMIDASA:3.2.1.17) HIDROLIZA PARTES DE LA PARED, Y LA BACTERIA SE VUELVE FRAGIL. SI SE ENCUENTRA EN UN MEDIO HIPOTONICO, PUEDE ESTALLAR. SE HA UTILIZADO ESTE METODO CON LA VARIANTE DE MANTENER EL MEDIO HIPERTONICO CON SACAROSA, PARA EVITAR EL ESTALLIDO BACTERIANO, Y LA CONSECUENTE SALIDA DE LOS COMPONENTES CELULARES A GRAN VELOCIDAD, LO QUE PUEDE ORIGINAR UNA TURBULENCIA QUE LESIONA LOS POLIRRIBOSOMAS. LA TECNICA CONSISTE EN RESUSPENDER UN GRAMO DE BACTERIAS EN 0,8 CC DE UNA SOLUCION DE SACAROSA AL 25 % EN TAMPON 8. UNA VEZ OBTENIDA UNA SUSPENSION HOMOGENEA, SE LE AGREGAN 0,2 CC DE UNA MEZCLA DE PARTES IGUALES DE LAS SIGUIENTES SOLUCIONES: EDTA 8 MILIMOLAR, Y LISOZIMA 5 MG/CC EN TRIS CLORHIDRICO 0,25 MOLAR PH 7,8. SE AGITA SUAVEMENTE LA MEZCLA CON UNA VARILLA DE VIDRIO, Y SE DEJA ACTUAR LA ENZIMA DURANTE 45 SEGUNDOS A 0 GRADOS C. ESTE TIEMPO ES SUFICIENTEMENTE PEQUEÑO COMO PARA QUE EL EFECTO DEL EDTA NO ALTERE LOS NIVELES INTRACELULARES DE MAGNESIO. EL EFECTO DE LA LISOZIMA SE DETIENE AGREGANDO 20 MICROLITROS DE UNA SOLUCION MOLAR DE ACETATO DE MAGNESIO. EL MEDIO HIPERTONICO IMPIDE EL ESTALLIDO DEL PSEUDO PROTOPLASTO. LA RUPTURA SE LOGRA AGREGANDO UN DETERGENTE.

EN ESTA ETAPA SE PUEDEN UTILIZAR DOS DETERGENTES. EL PRIMERO ES EL DEOXICOLATO SODICO, (AGREGANDO A LA MEZCLA 100 MICROLITROS DE UNA SOLUCION DE 25 MG DEL DETERGENTE POR CC EN TRIS CLORHIDRICO PH 7,8, 10 MILIMOLAR RECIEN PREPARADA). TIENE LA VENTAJA DE SER MUY EFICIENTE, PRODUCIENDO UN AUMENTO DE LA VISCOSIDAD DE LA MEZCLA DESPUES DE UN MINUTO DE AGREGADO. ESTE CAMBIO SE HACE VISIBLE POR LA FILANCIA QUE SE FORMA ENTRE LA MASA LIQUIDA Y LA VARILLA DE VIDRIO, Y SE DEBE A LA SALIDA DEL DNA BACTERIANO DESNUDO TRAS LA RUPTURA CELULAR. PERO EL INCONVENIENTE DEL USO DE ESE DETERGENTE ES QUE INHIBE LAS ENZIMAS, Y LA MEZCLA OBTENIDA NO PUEDE SER UTILIZADA DIRECTAMENTE PARA SINTETIZAR PROTEINAS. ESTA MEZCLA ES MUY UTIL PARA PURIFICAR A PARTIR DE ELLA LOS POLIRRIBOSOMAS. EL SEGUNDO DETERGENTE ES EL BRIJ 58, SI BIEN NO ES TAN EFICIENTE COMO EL ANTERIOR, NO INHIBE LA SINTESIS PROTEICA, PRESTANDOSE POR LO TANTO A EXPERIMENTOS CON

SISTEMAS NO PURIFICADOS. SE UTILIZA AGREGANDO 50 MICROLITROS DE UNA SOLUCION AL 5 % EN EL MISMO TAMPON. UN DETALLE QUE SE DEBE TENER EN CUENTA ES QUE LA FILANCIA OBSERVADA SE REDUCE BASTANTE POR EFECTO DEL BRIJ 58 , A IGUALDAD DE CANTIDAD DE DNA LIBERADO.

EN AMBOS CASOS, LA RUPTURA POR CAUSA DE LOS DETERGENTES SE PUEDE HACER MAS EFICIENTE SI PREVIAMENTE SE SOMETE LA MEZCLA A CONGELAMIENTOS RAPIDOS (SUMERGIENDO EL TUBO EN AIRE LIQUIDO) Y POSTERIORES DESCONGELAMIENTOS, HASTA DOS O TRES VECES CONSECUTIVAS. ESTE TRATAMIENTO AUMENTA LA LESION DE LA PARED CELULAR SIN AFECTAR VISIBLEMENTE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LOS POLIRRIBOSOMAS.

UNA VEZ LISADA LA BACTERIA, SE LE AGREGA DNASA (CONCENTRACION FINAL DE 5 MICROGRAMOS POR CC.), SE MEZCLA BIEN, Y SE INCUBA A 0 GRADOS C DURANTE 5 MINUTOS. EL DNA SE DIGIERE, LO QUE SE NOTA POR LA INMEDIATA DESAPARICION DE LA FILANCIA. LA MEZCLA SE CENTRIFUGA A 5.000 X G DURANTE 10 MINUTOS. SEDIMENTAN ASI LAS PAREDES BACTERIANAS, Y BACTERIAS QUE NO SE HAN LISADO Y SE RECUPERA EL SOBRENADANTE QUE PUEDE UTILIZARSE PARA ESTUDIAR LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS MARCADOS A LAS PROTEINAS, O PARA ULTERIORES PURIFICACIONES DE POLIRRIBOSOMAS O RIBOSOMAS.

## II. 4: FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES CELULARES.

A. POLIRRIBOSOMAS: SE OBTIENEN SOMETIENDO EL SOBRENADANTE DE UNA LISIS ENZIMATICA DE BACTERIAS ( 1,5 CC ) A UNA CENTRIFUGACION A ALTA VELOCIDAD SOBRE DOS CAPAS DE SACAROSA DE 4 CC CADA UNA. LA INFERIOR ES DEL 60 % Y LA SUPERIOR DEL 15 %, AMBAS EN TAMPON 1. EL SOBRENADANTE QUE CONTIENE LOS POLIRRIBOSOMAS SE DILUYE PREVIAMENTE PARA QUE SU CONCENTRACION FINAL DE SACAROSA LE PERMITA FLOTAR SOBRE LA CAPA SUPERIOR. SE CENTRIFUGA A 105.000 X G DURANTE 90 MINUTOS EN UNA ULTRACENTRIFUGA Y SE DESCARTAN LAS FASES LIQUIDAS, QUEDANDO EN EL FONDO DEL TUBO LOS POLIRRIBOSOMAS COMO UN SEDIMENTO TRANSPARENTE, INCOLORO, Y ADHESIVO. LOS POLIRRIBOSOMAS SE ENJUAGAN RAPIDAMENTE EN 1 CC DEL TAMPON EMPLEADO SIN SACAROSA, Y SE RESUSPENDEN EN EL MISMO TAMPON, AJUSTANDOSE A UNA CONCENTRACION DE 250 UNIDADES DE A 260 POR CC. EN EL PROCESO DE PURIFICACION LOS POLIRRIBOSOMAS SE ENRIQUECEN EN LAS FRACCIONES MAS PESADAS. LA FIGURA 2 NOS MUESTRA EL PERFIL RIBOSOMAL DE UNA BACTERIA COSECHADA LUEGO DE UN ENFRIAMIENTO RAPIDO (A), Y LOS POLIRRIBOSOMAS PURIFICADOS (B), LIBRES DE SUBUNIDADES, Y CON BAJA PROPORCION DE PARTICULAS 70 S. ES DE NOTAR QUE LOS DETERGENTES QUEDAN EN LA PARTE SUPERIOR DEL TUBO, SIN ATRAVESAR LAS CAPAS DE SUPERPUESTAS DE SACAROSA.

B. RIBOSOMAS DE TERMINACION: PARA REALIZAR ALGUNOS CONTROLES, Y PARA OBTENER LAS SUBUNIDADES UTILIZADAS EN LA MAYORIA DE LOS EXPERIMENTOS, SE OBTUVIERON RIBOSOMAS ENFRIANDO LENTAMENTE LAS BACTERIAS, Y LISANDOLAS ENZIMATICAMENTE. EL SOBRENADANTE DE ESTA LISIS SE CENTRIFUGO A 105,000 X G DURANTE 150 MINUTOS. LOS RIBOSOMAS SE RECOGEN DEL SEDIMENTO PARDO, TRANSPARENTE Y ADHESIVO QUE QUEDA EN EL FONDO DEL TUBO, RESUSPENDIENDOLOS EN EL TAMPON 2. ESTOS RIBOSOMAS SON EN SU GRAN MAYORIA PARTICULAS 70 S CON UN 15-20 % DE SUBUNIDADES, Y UNA LIGERA CONTAMINACION DE DISOMAS (FIGURA 2 A).

C. OBTENCION DE SUBUNIDADES: HAY DOS TIPOS DE SUBUNIDADES. SUELE LLAMARSE NATIVAS (62) A LAS QUE LUEGO DE LA LISIS Y SIN NINGUN TIPO DE TRATAMIENTO SE ENCUENTRAN EN EL LISADO, (FIGURA 2 A). EN CAMBIO SI EN UNA SUSPENSION DE PARTICULAS RIBOSOMALES SE DISMINUYE LA CONCENTRACION DEL ION MAGNESIO POR DEBAJO DE 1 MILIMOLAR SE OBTIENEN LAS SUBUNIDADES DERIVADAS POR DISOCIACION DE LOS RIBOSOMAS, (FIGURA 3).

PARA LA OBTENCION DE LAS SUBUNIDADES NATIVAS SE SIEMBRA LA SUSPENSION DE RIBOSOMAS (SECCION II. 4 B) SOBRE UN GRADIENTE PREPARATIVO DE SACAROSA ENTRE 10 Y 30 % EN TAMPON 2, EN TUBOS DE 27 CC, Y SE LOS CENTRIFUGA EN EL ROTOR SW 25 EN LA ULTRACENTRIFUGA BECKMAN, DURANTE 14 HORAS A 21.000 RPM (75.000 X G), Y SE FRACCIONA EL GRADIENTE ASPIRANDO CON UNA BOMBA PERISTALTICA DESDE EL FONDO DEL TUBO. SE MIDE LA ABSORBANCIA A 260 NM DE CADA FRACCION. EN EL CASO DE OPERAR CON RIBOSOMAS RADIOACTIVOS, SE PUEDE MEDIR LA RADIOACTIVIDAD, SIENDO LOS GRAFICOS RESULTANTES SUPERPONIBLES. SE JUNTAN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A LOS PICOS DE CADA SUBPARTICULA (FIGURA 4) Y SE DIALIZAN CONTRA EL MISMO TAMPON 2 PARA ELIMINAR LA SACAROSA. LAS SUBPARTICULAS SE CONCENTRAN POR CENTRIFUGACION A 105.000 X G DURANTE 180 MINUTOS. SE RESUSPENDEN EN TAMPON 2 Y SE AJUSTA SU CONCENTRACION A 30 UNIDADES DE A 260 NM.

PARA PREPARAR LAS SUBPARTICULAS DERIVADAS A UNA CONCENTRACION A 1 MILIMOLAR DE MAGNESIO, ( D 1 ), SE PARTE DEL PICO DE 70 S DEL GRADIENTE PREPARATIVO ANTERIORMENTE MENCIONADO, SEDIMENTANDO LOS RIBOSOMAS POR CENTRIFUGACION A 105.000 X G DURANTE 150 MINUTOS. EL SEDIMENTO SE RESUSPENDE EN TAMPON 3 Y SE DIALIZA DURANTE 24 HORAS CONTRA EL MISMO TAMPON. EL FRACCIONAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES DERIVADAS SE EFECTUA EN GRADIENTES PREPARATIVOS DE SACAROSA DEL MISMO MODO EXPLICADO PARA LA OBTENCION DE LAS SUBPARTICULAS NATIVAS.

EN EL CASO DE LAS SUBUNIDADES DERIVADAS A CONCENTRACION DE MAGNESIO DE 0,3 MILIMOLAR SE PROCEDE DEL MISMO MODO QUE EN EL PARRAFO ANTERIOR, SALVO QUE LA DIALISIS SE EFECTUA CONTRA UNA SOLUCION DE TAMPON 4 QUE CONTIENE ESA CONCENTRACION DE MAGNESIO.

D. OBTENCION DE SOBRENADANTE BACTERIANO (S 150 ): EL S 30, OBTENIDO TRAS LA MOLIENDA DE LAS BACTERIAS (SECCION II. 3 A) SE CENTRIFUGA DURANTE 5 HORAS A 150.000 X G. EL SOBRENADANTE CONTIENE EL T-RNA, LAS ENZIMAS Y LOS FACTORES PROTEICOS NECESARIOS PARA LA SINTESIS PROTEICA, Y ESTA LIBRE DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES. ESTE DETALLE ES MUY IMPORTANTE EN LOS EXPERIMENTOS RELATADOS EN ESTA MEMORIA, Y ES LA CAUSA POR LA QUE NO SE UTILIZO EL HABITUAL S 100 (CENTRIFUGADO A 105.000 X G) UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS CLASICOS DE SINTESIS PROTEICA, PUES NO GARANTIZA LA FALTA DE CONTAMINACION CON SUBUNIDADES. EL S 150 SE DIALIZA DURANTE 24 HORAS CONTRA ABUNDANTE TAMPON 5 PARA LIBERARLO DE SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR. LA CONCENTRACION DE PROTEINAS DE SOBRENADANTE BACTERIANO SE AJUSTO A 2 MG/CC.

TODOS LOS COMPONENTES CELULARES PURIFICADOS SE GUARDARON A - 70 GRADOS C FRACCIONADOS EN ALICUOTAS DE 0,1 A 0,2 CC CADA UNA. ESTE METODO DE ALMACENAMIENTO MANTIENE INALTERABLES LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES ( A JUZGAR POR LOS ANALISIS EN GRADIENTES DE SACAROSA) POR PERIO-

DOS DE MAS DE 6 MESES.

## II. 5: MARCADO ISOTOPICO:

A. RIBOSOMAS MARCADOS EN RNA RIBOSOMAL: SE CULTIVARON LAS BACTERIAS EN MEDIO A, Y DURANTE LAS ULTIMAS 3 A 4 GENERACIONES SE AGREGO ACIDO ORTOFOSFORICO P 32, 1 MCI POR LITRO DE CULTIVO. LAS BACTERIAS SE COSECHARON LUEGO DE ENFRIAMIENTO LENTO Y SE LISARON COMO SE EXPLICO EN LA SECCION II. 3 B. LOS RIBOSOMAS Y LAS SUBPARTICULAS OBTENIDAS SE ALMACENARON COMO SE INDICO, Y SE USARON DENTRO DE LOS 45 DIAS.

B. POLIRRIBOSOMAS MARCADOS EN M-RNA: SE CULTIVARON LAS BACTERIAS COMO EN EL PARRAFO PRECEDENTE, PERO EL P 32 SE AGREGO 90 SEGUNDOS ANTES DE LA COSECHA, LO QUE CONSTITUYO UN PULSO RADIOACTIVO. LA COSECHA SE EFECTUO PREVIO ENFRIAMIENTO RAPIDO. LA LISIS BACTERIANA Y EL FRACCIONAMIENTO DE LOS POLIRRIBOSOMAS SE EFECTUO COMO SE INDICO EN LAS SECCIONES CORRESPONDIENTES.

C. POLIRRIBOSOMAS MARCADOS EN LAS CADENAS PEPTIDICAS NACIENTES: SE CULTIVARON LAS BACTERIAS EN MEDIO A, SUPLEMENTADO CON UNA MEZCLA DE 0,1 MILIMOLAR DE CADA UNO DE LOS 19 AMINOACIDOS EXCLUIDA LA LEUCINA. ANTES DE LA COSECHA, EFECTUADA EN LA MITAD DE LA FASE LOGARITMICA, SE SOMETE EL CULTIVO A UN PULSO DE LEUCINA C 14, 25 MICROCURIES/LITRO, DE 90 SEGUNDOS DE DURACION. SE COSECHA LUEGO DE ENFRIAMIENTO RAPIDO DEL CULTIVO Y EL RESTO DEL PROCEDIMIENTO SE EFECTUO COMO EN EL PARRAFO ANTERIOR.

II. 6: MEDIO DE INCUBACION: EL MEDIO DE INCUBACION PARA ESTUDIAR LA SINTESIS PROTEICA IN VITRO Y EL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES, LLAMADO EN ADELANTE SISTEMA COMPLETO, CONTIENE:

TAMPON HEPES-K, PH 7,4	50	MILIMOLAR
ACETATO DE MAGNESIO	8	MILIMOLAR
CLORURO DE POTASIO	64	MILIMOLAR
ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP)	1,4	MILIMOLAR
GUANOSINA TRIFOSFATO (GTP)	0,3	MILIMOLAR
FOSFOENOLPIRUVATO (PEP)	8,0	MILIMOLAR
2-MERCAPTOETANOL	16,0	MILIMOLAR
SOBRENADANTE BACTERIANO (S 150)	0,1-0,4	MG DE PROTEINA
MEZCLA DE 20 AMINOACIDOS, C/U	0,1	MILIMOLAR
POLIRRIBOSOMAS	0,5 A 3,0	UNIDADES DE A 260 NM
VOLUMEN FINAL	125	MICROLITROS

EL AGREGADO DE FOSFATO DE ESPERMIDINA PH 6,5, DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS Y DE SUBPARTICULAS MARCADAS SE INDICA EN CADA EXPERIMENTO.

## II. 7: TAMPONES MAS FRECUENTEMENTE USADOS:

TAMPON 1: TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
ACETATO DE MAGNESIO	10	MILIMOLAR
CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR

TAMPON 2:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
	ACETATO DE MAGNESIO	5	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR
TAMPON 3:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
	ACETATO DE MAGNESIO	1	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR
	2-MERCAPTOETANOL	2	MILIMOLAR
TAMPON 4:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
	ACETATO DE MAGNESIO	0,3	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR
	2-MERCAPTOETANOL	2	MILIMOLAR
TAMPON 5:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
	ACETATO DE MAGNESIO	5	MILIMOLAR
TAMPON 6:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	10	MILIMOLAR
	ACETATO DE MAGNESIO	5	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR
TAMPON 7:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	10	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	50	MILIMOLAR
TAMPON 8:	TRIS CLORHIDRICO PH 7,8	20	MILIMOLAR
	CLORURO DE POTASIO	70	MILIMOLAR

II. 8: OBTENCION DE OTROS TIPOS DE PARTICULAS 70 S.

A. RIBOSOMAS DE TERMINACION "IN VITRO": EN 2 CC DEL SISTEMA COMPLETO DE INCUBACION, SE INCUBAN 45 UNIDADES DE A 260 NM DE POLIRIBOSOMAS PURIFICADOS, DURANTE UNA HORA A 37 GRADOS C. SE ENFRIA LA MUESTRA Y SE DILUYE EN TAMPON 6 FRIO HASTA UN VOLUMEN DE 5 CC. SE CENTRIFUGA EN ULTRACENTRIFUGA A 105.000 X G DURANTE 120 MINUTOS. LAS PARTICULAS 70 S QUE SE PRODUCERON DURANTE LA INCUBACION SE RECOGEN DEL FONDO DEL TUBO, Y SE SUSPENDEN EN TAMPON 6.

B. MONOSOMAS (PARTICULAS 70 S UNIDAS A M-RNA Y PEPTIDIL-T-RNA): SE OBTIENEN POR DEGRADACION CONTROLADA DE M-RNA DEL POLIRIBOSOMA. SE INCUBAN 45 UNIDADES A 260 NM DE POLIRIBOSOMAS PURIFICADOS EN TAMPON 6 EN PRESENCIA DE RNASA (20 MICROGRAMOS/CC) A 0 GRADOS C DURANTE 15 MINUTOS. SE DILUYE LUEGO LA MUESTRA EN TAMPON 6 FRIO HASTA UN VOLUMEN DE 5 CC. SE CENTRIFUGA COMO SE INDICO EN EL PARRAFO ANTERIOR, Y SE RECOGE DEL MISMO MODO EL SEDIMENTO DE MONOSOMAS.

II. 9: DOSAJE DE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS EN LA CADENA PEPTIDICA.:

SE INCUBO EL SISTEMA COMPLETO, CON LA OMISION DE LA MEZCLA DE 20 AMINO-

ACIDOS, REEMPLAZANDOLA POR UNA MEZCLA DE 19 AMINOACIDOS, EXCLUIDA LA LEUCINA, DE LA MISMA MOLARIDAD. LA LEUCINA C 14 SE AGREGO ANTES QUE LOS POLIRRIBOSOMAS. LUEGO DE LA INCUBACION A 37 GRADOS C, A DISTINTOS TIEMPOS, SE DETUVO LA REACCION CON EL AGREGADO DE ACIDO TRICLOROACETICO AL 5 % (5 CC). LA MEZCLA RESULTANTE SE INCUBO A 90 GRADOS C DURANTE 20 MINUTOS Y SE FILTRO A TRAVES DE FILTROS DE NITRATO DE CELULOSA (MILLIPORE) CON POROS DE 0,45 MICRONES DE DIAMETRO. DESPUES DE SECAR LOS FILTROS, SE COLOCARON EN VIALES Y SE AGREGO SOLUCION CENTELLEADORA (OMNIFLUOR AL 4 POR MIL EN TOLUENO). LA RADIOACTIVIDAD SE DETERMINO EN ESPECTROFOTOMETRO PACKARD TRI-CARB.

PARA MEDIR LA RADIOACTIVIDAD EN FRACCIONES LIQUIDAS (ACUOSAS), COMO POR EJEMPLO FRACCIONES DE GRADIENTES DE SACAROSA, SE TOMARON ALICUOTAS (DE 15 A 50 MICROLITROS) DE ESAS FRACCIONES Y SE LAS COLOCO EN VIALES, AGREGANDOSELES SOLUCION CENTELLEADORA DE BRAY.

#### SOLUCION CENTELLEADORA DE BRAY

NAFTALENO	.....60	GR
2,5-DIFENILOXAZOL	..... 4	GR
DIMETIL 1,4 BIS 2-(4-METIL		
5-FENILOXAZOLIL BENCENO	..... 0,2	GR
METANOL	.....100	CC
ETILEN GLICOL	..... 20	CC
DIOXANO C.S.P.	..... 1000	CC

#### II.10: ANALISIS DE GRADIENTES.

FUERON REALIZADOS EN GRADIENTES DE SACAROSA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES PARA CUYA CONFECCION SE UTILIZO LA SIGUIENTE ECUACION DESARROLLADA A PARTIR DE LA DE NOLL (108):

$$C = C_2 - (C_2 - C_1)(1 - A)$$

DONDE

C=CONCENTRACION MINIMA DEL GRADIENTE

C1=CONCENTRACION MAXIMA DEL GRADIENTE O

CONCENTRACION INICIAL DE LA CAMARA DE MEZCLA

C2=CONCENTRACION DE LA SOLUCION MAS DILUIDA DE SACAROSA, O CONCENTRACION DEL RESERVORIO.

$$A = \frac{V_1}{V_2}$$

V1=VOLUMEN TOTAL DE LA SUMA DE GRADIENTES

V2=VOLUMEN TOTAL DE LA SUMA DE GRADIENTES MAS EL LIQUIDO RETENIDO EN TUBOS DE CONECCION.

LAS CONECCIONES ESTAN HECHAS DE TAL MODO QUE EL VOLUMEN DEL LIQUIDO

DILUYENTE QUE INGRESA A LA CAMARA DE MEZCLA ES LA MITAD DEL QUE EGRESA.

EN LA SIGUIENTE TABLA ESTAN LOS DATOS NECESARIOS PARA CONSTRUIR LOS GRADIENTES QUE SE USARON EN ESTOS TRABAJOS:

GRADIENTE	NUMERO	VOLUMEN	CAMARA DE MEZCLA	DILUYENTE
5-20 %	4	4,6 CC	11,4 CC SAC.20%	TAMPON
15-40 %	4	4,6 CC	11,4 CC SAC.40%	SAC.6,6%
5-20 %	4	12,0 CC	29,7 CC SAC.20%	TAMPON
15-40 %	4	12,0 CC	29,7 CC SAC.20%	SAC.6,6%
15-30 %	2	27,0 CC	27,0 CC SAC.30%	SAC. 10%

#### II.11:EXPRESION DEL INTERCAMBIO:

EL INTERCAMBIO DE SUBPARTICULAS SE EFECTUA ANALIZANDO EL GRADIENTE EN EL CUAL SE SEMBRO UNA MEZCLA DE INCUBACION CONTENIENDO SUBPARTICULAS RADIOACTIVAS . SE CUENTA LA RADIOACTIVIDAD CONTENIDA EN CADA FRACCION DEL GRADIENTE, Y DIVIDIENDO LAS CUENTAS QUE SEDIMENTAN EN EL PICO 70 S POR EL TOTAL DE CUENTAS CONTENIDAS EN EL GRADIENTE.EL PORCENTAJE DE INTERCAMBIO SE OBTIENE MULTIPLICANDO ESE COCIENTE POR 100.

## III. RESULTADOS.

## III.1 : EL SISTEMA SINTETIZA PROTEINAS.

EL SISTEMA DE INCUBACION DESCRIPTO EN II.6 PERMITE LA SINTESIS DE PROTEINAS QUE SE MIDE COMO LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS A LA FRACCION PRECIPITABLE POR ACIDO TRICLOROACETICO (TCA) CALIENTE Y AL 5 % .

ESTA REACCION DEPENDE EN FORMA ABSOLUTA DE LA PRESENCIA DE POLIRRIBOSOMAS, SOBRENADANTE BACTERIANO (S 150) Y UN SISTEMA GENERADOR DE ENERGIA COMO SE VE EN LA TABLA I .

TABLA I	
REACTANTES	AMINOACIDOS INCORPORADOS (CPM)
SISTEMA COMPLETO	5.890
SIN POLIRRIBOSOMAS	450
SIN S 150	315
SIN ATP, GTP, PEP	310
BLANCO	209

LA FIGURA 5 MUESTRA LA CURVA DE INCORPORACION DE AMINOACIDOS EN FUNCION DEL TIEMPO . LA REACCION PROGRESA CASI LINEALMENTE HASTA LOS 5 MINUTOS, TENDIENDO A DESACELERARSE LUEGO. A PARTIR DE LOS 20 MINUTOS NO SE NOTA UN APRECIABLE AUMENTO DE LA SINTESIS PROTEICA. EL AGREGADO DE DISTINTOS COMPONENTES DEL SISTEMA LUEGO DE 10 MINUTOS DE INCUBACION NO REINICIA LA SINTESIS, CON LA SOLA EXCEPCION DE LOS POLIRRIBOSOMAS, CUYA ADICION AUMENTA CUANTITATIVAMENTE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS.

## III. 2 : EL SISTEMA PRODUCE UNA TERMINACION Y LIBERACION CUANTIFICABLE DE PEPTIDOS.

LA TERMINACION DE LA SINTESIS PROTEICA SE OBSERVA MIDIENDO LA CANTIDAD DE MATERIAL RADIOACTIVO PRECIPITABLE POR TCA CALIENTE AL 5 %, QUE SEDI-MENTA A VELOCIDADES INFERIORES A 30 S EN GRADIENTES DE SACAROSA.

PARA ESTO, SE INCUBA EL SISTEMA COMPLETO CON AMINOACIDOS RADIOACTIVOS DURANTE DISTINTOS TIEMPOS, A 37 GRADOS C. LA REACCION SE DETIENE POR ENFRIAMIENTO A 0 GRADOS C. EL MATERIAL INCUBADO SE SIEMBRA SOBRE GRADIENTES DE SACAROSA DE 5 % A 20 % , DE 12 ML DE CAPACIDAD. SE CENTRIFU-

GA EN EL ROTOR SW 40 A 35.000 DURANTE 75 MINUTOS. EL GRADIENTE SE ANALIZA MIDIENDO SU ABSORBANCIA A 260 NM Y LAS FRACCIONES RECOGIDAS SE PRECIPITAN CON TCA 5 % CALIENTE Y SE FILTRAN. LA RADIOACTIVIDAD RETENIDA EN LOS FILTROS Y LA ABSORBANCIA SE GRAFICAN EN FUNCION DE LAS DISTINTAS FRACCIONES.

LA FIGURA 6 MUESTRA LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS A DISTINTAS FRACCIONES DEL GRADIENTE, Y COMO A MEDIDA QUE PROGRESA LA INCUBACION, LOS PEPTIDOS RADIOACTIVOS MIGRAN HACIA REGIONES MAS LIVIANAS DEL GRADIENTE, HASTA LLEGAR A LA PORCION DEL SOBRENADANTE.

### III. 3 : EL SISTEMA NO REINICIA LA TRADUCCION.

SE COMPARO LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS UTILIZANDO UN SOBRENADANTE PROVENIENTE DE CULTIVOS NORMALES ( S 150 ) Y OTRO SOBRENADANTE DE CULTIVOS CUYO CRECIMIENTO FUE DETENIDO CON TRIMETOPRIM ( S 150 TMP). ESTE ANTIBIOTICO FRENA EL CRECIMIENTO BACTERIANO AL INHIBIR LA ENZIMA DIHIDROFOLICO REDUCTASA, PRODUCIENDOSE EL AGOTAMIENTO DE DADORES DE GRUPOS FORMILO. EL RESULTADO ES QUE DISMINUYE DRASTICAMENTE O DESAPARECE EL FORMIL-METIONIL-T-RNA, INICIADOR OBLIGADO DE LA SINTESIS PROTEICA EN BACTERIAS.

TABLA II	
REACTANTES	AMINOACIDOS INCORPORADOS (CPM)
SISTEMA COMPLETO ( S 150 NORMAL )	3.175
SISTEMA COMPLETO + TRIMETOPRIM	3.134
SISTEMA COMPLETO ( S 150 TMP )	3.301
BLANCO	194

SI HUBIERA REINICIACION EN NUESTRO SISTEMA COMPLETO ORIGINAL, DEBERIA NOTARSE UNA DISMINUCION EN LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS, CUANDO SE USA EL S 150 TMP QUE IMPIDE NUEVAS REINICIACIONES. ESTO NO SUCEDE, COMO SE OBSERVA EN LA TABLA II .

III. 4 : EFECTO DEL AGREGADO DE SUBUNIDADES 30 S Y DE SUSTANCIAS ESTABILIZADORAS DE LA PARTICULA 70 S , SOBRE LA SINTESIS PROTEICA.

A. SUBUNIDADES 30 S: AGREGANDO DISTINTAS CANTIDADES DE SUBUNIDADES 30 S PREPARADAS DE DIFERENTES FORMAS, SE MIDIO EL EFECTO PRODUCIDO SOBRE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS. LAS SUBUNIDADES UTILIZADAS FUERON LAS NATIVAS ( 30 S N ) , LAS DERIVADAS A CONCENTRACIONES DE MAGNESIO DE 1 MILIMOLAR ( 30 S D1 ), Y LAS DERIVADAS A CONCENTRACIONES DE MAGNESIO DE 0,3 MILIMOLAR ( 30 S D 0,3 ).

TABLA III

INCUBACION	AGREGADOS	AMINOACIDOS INCORPORADOS CPM
SISTEMA COMPLETO	NO	6.800
SISTEMA COMPLETO	NO	6.863
SISTEMA COMPLETO	30 S N 0,3 U	6.904
SISTEMA COMPLETO	30 S N 0,6 U	6.820
SISTEMA COMPLETO	30 S D1 0,3 U	6.770
SISTEMA COMPLETO	30 S D1 0,6 U	6.810
SISTEMA COMPLETO	30 S D0,3 0,3 U	6.713
SISTEMA COMPLETO	30 S D0,3 0,6 U	6.665
BLANCO	NO	219

EN LA TABLA PRECEDENTE SE MUESTRA QUE NO HAY DIFERENCIA EN LA SINTESIS PROTEICA CUANDO SE AGREGAN SUBUNIDADES . ESTO ES IMPORTANTE PORQUE LAS SUBUNIDADES RADIOACTIVAS SE USAN COMO MARCADOR DEL INTERCAMBIO QUE DESCRIBIREMOS MAS ADELANTE. EN LOS EXPERIMENTOS DESCRIPTOS EN ESTA SECCION SE UTILIZO INDISTINTAMENTE SUBUNIDADES MARCADAS CON P32 O SIN MARCAR. EL METODO DE CALENTAR A 90 GRADOS C EN TCA 5 % DESTRUYE EL RNA Y POR LO TANTO ELIMINA POR FILTRADO LA RADIOACTIVIDAD CONTENIDA EN EL MISMO, EVITANDO CUALQUIER CONTAMINACION DE LOS PEPTIDOS INSOLUBLES, (FIGURA 7).

B. ETANOL Y METANOL: EL ETANOL ES UN ESTABILIZADOR DE LAS PARTICULAS RIBOSOMALES, EN CONCENTRACIONES CERCANAS A LA MOLARIDAD (101).SE MIDIO SU EFECTO Y EL DEL METANOL SOBRE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS EN NUESTRO SISTEMA, (TABLA IV Y FIGURA 8).

TABLA IV				
TIEMPO(MIN)	SISTEMA COMPLETO			
	CONTROL	+ ETANOL M	+ METANOL M	
0	126	-	-	
10	3.260	2.403	954	
20	3.481	2.559	1.487	
30	4.026	2.824	2.204	

C. NEOMICINA B: ES UN ANTIBIOTICO AMINOGLUCOSIDICO, DE REACCION BASICA, QUE AL IGUAL QUE OTROS DEL MISMO GRUPO, (ESTREPTOMICINA, KANAMICINA,) INTERFIEREN LA SINTESIS PROTEICA, DEFORMANDO LA ESTRUCTURA DEL RIBOSOMA Y PRODUCIENDO ERRORES DE LECTURA DEL MENSAJERO. DE ALLI QUE SON ANTIBIOTICOS BACTERICIDAS, POR LA PRODUCCION EN GRAN ESCALA DE PROTEINAS NO FUNCIONALES. LA NEOMICINA ES ADEMAS UN FUERTE INHIBIDOR DE LA DISOCIACION DE LA PARTICULA 70 S, COMPORTANDOSE COMO UN POTENTE ESTABILIZADOR DEL RIBOSOMA. SE MIDIO SU EFECTO SOBRE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS EN NUESTRO SISTEMA EN CONCENTRACIONES UTILES COMO ESTABILIZADOR ( ENTRE 1 Y 10 MICROMOLAR), (TABLA V Y FIGURA 8).

TABLA V				
TIEMPO (MIN)	CONTROL	NEOMICINA		
		1 U.MOLAR	3 U.MOLAR	10 U.MOLAR
0	150	----	----	----
10	3.100	1.150	985	769
20	3.600	1.580	1.460	1.160
30	3.950	1.900	1.860	1.730

D. ESPERMIDINA: LAS POLIAMINAS ESTAN PRESENTES EN LA CELULA BACTERIANA EN ESTRECHA VINCULACION CON LOS ACIDOS NUCLEICOS, Y PARTICULARMENTE CON LOS RIBOSOMAS (102). ACTUAN EN FORMA SINERGICA CON LOS CATIONES DIVALENTES, ESPECIALMENTE EL MAGNESIO, TENDIENDO A MODIFICAR EL MECANISMO, Y AUMENTAR LA FORMACION DE AA-T-RNA, Y REDUCE LA CANTIDAD DE MAGNESIO NECESARIA PARA REASOCIAR LAS SUBUNIDADES. LA ESPERMIDINA ES UNA DE ESTAS POLIAMINAS, CUYO EFECTO ESTABILIZADOR SOBRE EL RIBOSOMA SE CONOCE(103). SE INVESTIGO SU EFECTO SOBRE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS EN NUESTRO SISTEMA, (TABLA VI Y FIGURA 9 ).

TABLA VI				
TIEMPO(MIN)	CONTROL	ESPERMIDINA (MILIMOLAR)		
		0,3	1	3
0	170	---	---	---
10	3.205	3.603	3.507	2.248
20	3.560	3.541	3.490	2.485
40	3.571	3.545	3.453	2.565

LOS ESTUDIOS DE LA SINTESIS PROTEICA CON EL AGREGADO DE ETANOL, METANOL, NEOMICINA B, Y ESPERMIDINA SE HICIERON CON EL PROPOSITO DE ENCONTRAR UNA SUSTANCIA QUE EN CONCENTRACIONES ESTABILIZADORAS DE LA PARTICULA 70 S NO INTERFIERA CON EL PROCESO DE SINTESIS PROTEICA. DE LO QUE ANTECEDE, SURGE QUE TANTO LOS ALCOHOLES PRIMARIOS ESTUDIADOS COMO LA NEOMICINA B NO CUMPLEN ESTOS REQUISITOS.

EN CAMBIO LA ESPERMIDINA EN CONCENTRACIONES DE 0,3 Y 1 MILIMOLAR NO INHIBE LA SINTESIS PROTEICA.

ES POR ESO QUE EN ADELANTE SE LA HA UTILIZADO EN LA CONCENTRACION SUPERIOR MENCIONADA. EN LA TABLA VII SE MUESTRA EL EFECTO DE LA ESPERMIDINA, SOLA Y EN PRESENCIA DE SUBUNIDADES 30 S SOBRE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS MARCADOS EN NUESTRO SISTEMA DE SINTESIS PROTEICA CON POLIRRIBOSOMAS.

TABLA VII			
TIEMPO(MIN)	CONTROL	ESPERMIDINA	ESPERMIDINA + 30 S
0	403	---	---
2	2.831	2.384	3.446
5	5.504	5.608	5.892
10	6.819	7.328	7.509
20	7.995	8.027	8.326
40	8.298	8.190	8.120

III.5 : EL SISTEMA INTERCAMBIA LAS SUBUNIDADES DE LOS POLIRRIBOSOMAS CON LAS SUBUNIDADES 30-S RADIOACTIVAS AGREGADAS.

A . INTERCAMBIO CON SUBUNIDADES AGREGADAS AL COMIENZO DE LA INCUBACION : SE UTILIZARON PARA ESTOS EXPERIMENTOS TRES TIPOS DE SUBUNIDADES 30 S : LAS NATIVAS ( 30 S N ) , Y LAS DERIVADAS ( 30 S D 1 Y 30 S D 0,3 ). SE INCUBO EL SISTEMA SIN EL AGREGADO DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS, Y EN PRESENCIA DE 0,3 UNIDADES DE A 260 NM DE SUBPARTICULAS 30 S-P32. LA REACCION SE DETUVO ENFRIANDO A 0 GRADOS C Y LA MEZCLA DE INCUBACION SE SEMBRO SOBRE UN GRADIENTE LINEAL DE SACAROSA DE 5-20 % DE 12 ML DE CAPACIDAD. SE CENTRIFUGO 75 MINUTOS A 35.000 RPM EN EL ROTOR SW 40 Y SE FRACCIONO, ANALIZANDO AL MISMO TIEMPO LA ABSORBANCIA A 260 NM . A LAS DISTINTAS FRACCIONES SE LES AGREGO SOLUCION CENTELLEADORA DE BRAY Y SE MIDIO LA RADIOACTIVIDAD (FIG 10) . EL INTERCAMBIO SE EXPRESO COMO LA FRACCION DE RADIOACTIVIDAD QUE SEDIMENTA EN LA POSICION CORRESPONDIENTE AL PICO DE 70 S.

EN LA TABLA VIII SE DA EL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES 30 S DE DISTINTOS TIPOS A LOS 30 MINUTOS DE INCUBACION.

TABLA VIII		
TIEMPO	SUBUNIDADES AGREGADAS	INTERCAMBIO
0	N	8,8
30	N	31,8
0	D 1	4,5
30	D 1	26,4
0	D 0,3	3,8
30	D 0,3	12,9

ES EVIDENTE QUE LAS SUBUNIDADES D 0,3 SON LAS MENOS EFECTIVAS, HECHO ATRIBUIDO A LOS CAMBIOS PRODUCIDOS POR LAS CONCENTRACIONES MUY BAJAS DE MAGNESIO.

EN CAMBIO TANTO LAS SUBUNIDADES 30 S N COMO LAS 30 S D 1 INTERCAMBIAN MUY EFICIENTEMENTE; LA PRIMERA EN MAYOR GRADO. SIN EMBARGO EL PERFIL DE DISTRIBUCION DE LAS SUBPARTICULAS NATIVAS NO SE LIMITA AL PICO 70 S SINO QUE PARTE DE LA RADIOACTIVIDAD APARECE TAMBIEN EN LA FRACCION DISOMAS Y OTROS POLISOMAS, (FIG 10). CREEMOS QUE PARTE DE ESTE "INTERCAMBIO" ES DEBIDO A QUE ESAS PARTICULAS SON CAPACES DE INICIAR LA SINTESIS PROTEICA EN LOS ENSAYOS. ESTA INICIACION NO SERIA DETECTADA POR LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS, (SECCION III.4 Y TABLA III ), POR LA ESCASA ELONGACION ADICIONAL QUE PRODUCE. EN TODO CASO ESTE ES UN METODO MAS SENSIBLE PARA DETECTAR LA INICIACION O POR LO MENOS LA LIGADURA DEL 30 S AL MENSAJERO. EL INTERCAMBIO ASI DETECTADO EN EL CASO DE LAS SUBUNIDADES

NATIVAS LO ENCUADRARIA EN EL ESQUEMA POSTULADO POR MESSELSON Y KAEMPFER (87).

PARA NUESTROS ULTERIORES ESTUDIOS, HEMOS UTILIZADO LAS SUBUNIDADES D 1 QUE TIENEN UNA BUENA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO Y NINGUNA CAPACIDAD INICIADORA DETECTABLE. POR LO QUE TODA REFERENCIA A SUBUNIDADES 30 S SE REFIERE EN ADELANTE A LAS DERIVADAS A MAGNESIO 1 MILIMOLAR. EN OTRO EXPERIMENTO DEL MISMO TIPO SE PUEDE VER LA CINETICA DEL INTERCAMBIO DE LA SUBUNIDAD 30 S-P32 EN FUNCION DEL TIEMPO ( FIG. 11 A ).

B. INTERCAMBIO CON SUBUNIDADES AGREGADAS DESPUES DE LA INCUBACION INICIAL.

SE INCUBO EL SISTEMA COMPLETO SIN EL AGREGADO DE AMINOACIDOS MARCADOS, DURANTE 40 MINUTOS. LUEGO SE AGREGO 0,3 UNIDADES DE A 240 DE SUBPARTICULAS 30 S-P32 INCUBANDO NUEVAMENTE DURANTE DISTINTOS TIEMPOS. A LOS EFECTOS DE EVITAR CONFUSIONES, EL INTERCAMBIO ASI MEDIDO LO LLAMAREMOS EN LO SUCESIVO "INTERCAMBIO POST TERMINACION". EL TRATAMIENTO POSTERIOR DE LAS MUESTRAS ES EL MISMO QUE EN EL PARRAFO ANTERIOR. EN LA FIGURA 11, (CURVA B), SE MUESTRA EL INTERCAMBIO DE LAS SUBUNIDADES DURANTE LA SEGUNDA INCUBACION; ESTE INTERCAMBIO POST TERMINACION ES COMPARATIVAMENTE IGUAL AL QUE SUCEDE DURANTE LA TRADUCCION.

III.6 : LA ESPERMIDINA INHIBE EL INTERCAMBIO POST TERMINACION, SIN AFECTAR EL INTERCAMBIO PRODUCIDO DURANTE LA TERMINACION.

LOS EXPERIMENTOS MENCIONADOS EN LA SECCION ANTERIOR Y MOSTRADOS EN LA FIGURA 10 , SE REPITIERON EN PRESENCIA DE ESPERMIDINA A CONCENTRACION 1 MILIMOLAR.

ESTA POLIAMINA NO AFECTA EL INTERCAMBIO, CUANDO LA SUBUNIDAD 30 S-P32 SE HALLA PRESENTE EN EL MOMENTO DE INICIARSE LA PRIMERA INCUBACION; EN CAMBIO SI LA SUBPARTICULA SE AGREGA EN UNA SEGUNDA INCUBACION, EL INTERCAMBIO POST TERMINACION SE REDUCE NOTABLEMENTE, COMO SE VE EN LA FIGURA 12 , CURVAS A Y B RESPECTIVAMENTE.

LOS MISMOS RESULTADOS SE OBTIENEN SI LA ESPERMIDINA SE AGREGA AL TERMINAR LA PRIMERA Y ANTES DE LA SEGUNDA INCUBACION CONTENIENDO SUBPARTICULAS RADIOACTIVAS.

III.7 : CARACTERIZACION DEL HIBRIDO.

SE HICIERON ALGUNOS EXPERIMENTOS PARA CARACTERIZAR LA PARTICULA 70 S QUE CONTIENE LA SUBUNIDAD 30 S RADIOACTIVA (HIBRIDO), Y PARA PROVEER ALGUNOS CONTROLES NECESARIOS PARA LA INTERPRETACION ADECUADA DE LOS RESULTADOS.

A. EL HIBRIDO NO ES PRODUCTO DE LA ASOCIACION DE 30 S P 32 CON SUBUNIDADES 50 S PRESENTES EN EL SOBRENADANTE S 150, COMO SE VE EN LA TABLA IX

QUE MUESTRA EL INTERCAMBIO PRODUCIDO EN 30 MINUTOS DE INCUBACION EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE POLIRRIBOSOMAS.

TABLA IX		
TIEMPO (MIN)	INTERCAMBIO CON POLIRRIBOSOMAS	INTERCAMBIO SIN POLIRRIBOSOMAS
0	4,5	4,6
30	26,4	4,2

B. EL HIBRIDO ES DISOCIABLE POR BAJAS CONCENTRACIONES DEL ION MAGNESIO: SE INCUBO EL SISTEMA COMPLETO CON SUBUNIDADES 30 S RADIOACTIVAS, Y A LOS 40 MINUTOS SE TOMO UNA ALICUOTA Y SE DILUYO 8 VECES EN TAMPON 7 ( SIN MAGNESIO ), HASTA LLEVAR SU CONCENTRACION DE MAGNESIO A 1 MILIMOLAR Y SE INCUBO DURANTE 5 MINUTOS A 37 GRADOS C, Y SE ANALIZO EN GRADIENTES DE SACAROSA DE 5-20 % , JUNTO CON ALICUOTAS SIN DILUIR. SE MIDIO LA ABSORBANCIA Y LA RADIOACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES. LA FIGURA 13 MUESTRA EL PERFIL RIBOSOMAL DE ESTOS EXPERIMENTOS Y LA SEDIMENTACION DE LAS SUBUNIDADES RADIOACTIVAS EN AMBOS CASOS.

PUEDE VERSE QUE A CONCENTRACIONES DE 8 MILIMOLAR DE MAGNESIO LOS RIBOSOMAS HAN INTERCAMBIADO EFECTIVAMENTE SUS SUBUNIDADES. EN CAMBIO AL LLEVAR LA MUESTRA A 1 MILIMOLAR DE MAGNESIO, LA MARCA RADIOACTIVA VUELVE TOTALMENTE A LA FRACCION 30 S. NOTESE QUE BUENA PARTE DEL PICO 70 S HA DESAPARECIDO, AUMENTANDO EL PICO DE 30 S Y APARECIENDO UN PICO DE 50 S , LO QUE SE DEBE A LA DISOCIACION DE LOS RIBOSOMAS LIBRES. ESTO INDICA QUE EL HIBRIDO FORMADO ES TOTALMENTE DOSOCIABLE A BAJAS CONCENTRACIONES DEL ION MAGNESIO.

C. EL HIBRIDO ES DISOCIABLE POR DIVERSOS FACTORES DISOCIANTES: SE INCUBARON VARIOS TUBOS DEL SISTEMA COMPLETO CON SUBUNIDADES 30 S RADIOACTIVAS , Y A ALGUNOS DE ELLOS SE AGREGO FACTOR DISOCIANTE ( 700 MICROGRAMOS DE PROTEINAS/ CC) DE E.COLI , O RNASA ( 15 MICROGRAMOS / CC), EN DISTINTOS MOMENTOS DE LA INCUBACION. ESTOS TUBOS SE INCUBARON 15 MINUTOS MAS A 37 GRADOS C. EL INTERCAMBIO DESCENDIO A VALORES MUY BAJOS EN LOS TUBOS MENCIONADOS.( FIGURA 14 ).

LA TABLA X MUESTRA EL EFECTO DISOCIANTE QUE LA RNASA Y OTROS AGENTES TIENEN SOBRE DISTINTOS TIPOS DE PARTICULAS 70 S.

TABLA X

AGENTES DISOCIANTES

	RNASA	F.D. D.COLI	F.D. B.STEAR.
MONOSOMAS	5,5 %	8,6 %	6,9 %
RIBOSOMAS DE TERMINACION "IN VIVO"	29,4 %	37,6 %	35,0 %
RIBOSOMAS DE TERMINACION "IN VITRO"	36,2 %	44,0 %	35,4 %

SE NOTA QUE TANTO LA RNASA COMO LOS FACTORES DISOCIANTES DE E.COLI , Y DE B. STEAROTHERMOFILUS SON MUY EFECTIVOS EN DISOCIAR LOS RIBOSOMAS DE TERMINACION O LIBRES, NO AFECTANDO A LOS MONOSOMAS.

EN LA TABLA XI SE PUEDE VER LA CAPACIDAD INTERCAMBIADORA DE LAS PARTICULAS 70 S OBTENIDAS POR DIFERENTES PROCEDIMIENTOS:

TABLA XI

INTERCAMBIO

	0 MINUTOS	40 MINUTOS
MONOSOMAS	5,9 %	5,0 %
RIBOSOMAS DE TERMINACION "IN VIVO"	7,6 %	27,8 %
RIBOSOMAS DE TERMINACION "IN VITRO"	7,2 %	25,2 %

ESTOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS EN TAMPON 2, EN AUSENCIA DE SOBRENADANTE BACTERIANO S 150, Y DE SISTEMA GENERADOR DE ENERGIA. ES DECIR QUE UNA VEZ FORMADOS LOS RIBOSOMAS DE TERMINACION (LIBRES) NO ES NECESARIO PARA EL INTERCAMBIO LA SINTESIS PROTEICA, NI LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS QUE SON REQUERIDAS PARA LA TRADUCCION. NOTESE LA CORRELACION DIRECTA ENTRE LA DISOCIABILIDAD DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PARTICULAS 70 S Y SU CAPACIDAD INTERCAMBIADORA DE SUBUNIDADES, ( TABLAS X Y XI ).

D. EL EXCESO DE SUBUNIDADES 30 S NO RADIOACTIVAS DESPLAZA A LAS SUBPARTICULAS RADIOACTIVAS DE LOS HIBRIDOS: SE INCUBARON VARIOS TUBOS CON EL SISTEMA COMPLETO, AGREGANDO SUBPARTICULAS 30 S-P32, Y A LOS 20 MINUTOS SE AGREGARON 0,9 UNIDADES DE A 260 NM DE SUBPARTICULAS 30 S NO MARCADAS A TRES DE LOS TUBOS, INCUBANDO UN TIEMPO ADICIONAL. SE MIDIO EL INTERCAMBIO EN TODOS LOS TUBOS A DIFERENTES TIEMPOS. LA FIGURA 15 MUESTRA QUE EN LOS TUBOS A LOS QUE SE AGREGO SUBUNIDADES "FRIAS" DESCENDIO LA RADIOACTIVIDAD DEL PICO 70 S.

E. EL INTERCAMBIO CON SUBUNIDADES RADIOACTIVAS AGREGADAS AL COMIENZO DE LA TRADUCCION NO SE PRODUCE EN AUSENCIA DE SISTEMA GENERADOR DE ENERGIA O DE FACTORES DEL SOBRENADANTE BACTERIANO: LA INCUBACION DEL SISTEMA COMPLETO SIN ATP, GTP, PEP, MUESTRA UNA VARIACION DEL PERFIL RIBOSOMAL CONSISTENTE EN EL AUMENTO DEL PICO 70 S Y DISMINUCION DE LOS PICOS POLIRRIBOSOMALES. ESTO SE DEBE A LA DEGRADACION PARCIAL DE ESTOS ULTIMOS, Y AUMENTO DE LOS MONOSOMAS. COMO YA HEMOS VISTO EN EL PARRAFO C ESTO NO ES SUFICIENTE PARA QUE EXISTA INTERCAMBIO, PUES ES NECESARIA LA SINTESIS Y TERMINACION DE LAS CADENAS PEPTIDICAS, CUANDO SE PARTE DE LOS POLIRRIBOSOMAS. ESTA AUSENCIA DEL INTERCAMBIO ES TAMBIEN INDICIO DE QUE NO SE DEBE A ASOCIACION DE LAS SUBUNIDADES RADIOACTIVAS CON SUBUNIDADES 50 S CONTAMINANTES DE LA PREPARACION DE POLIRRIBOSOMAS.

LA TABLA XII MUESTRA EL INTERCAMBIO CUANDO EL SISTEMA ESTA COMPLETO, O CUANDO FALTAN ATP, GTP, Y PEP, O EL S 150. LA PRESENCIA DE UNA PEQUENA CANTIDAD DE SUBPARTICULAS 50 S AGREGADAS A LA MEZCLA DE INCUBACION HACIENDO LAS VECES DE CONTAMINANTE, PRODUCE UN INTERCAMBIO APARENTE DEL 13 %.

TABLA XII

	INTERCAMBIO
SISTEMA COMPLETO	28,3 %
- ATP, GTP, PEP	4,6 %
- S 150	4,2 %
+ 50 S 0,1 UNIDADES A 260	13,3 %

F. PARA QUE EL INTERCAMBIO OCURRA, ES NECESARIO QUE EN EL SISTEMA COMPLETO TENGA LUGAR UNA EFECTIVA TERMINACION, Y LIBERACION DE PEPTIDOS, Y NO SOLO UNA SIMPLE ELONGACION. LA FIGURA 16 MUESTRA LA RELACION ENTRE ESTOS TRES FENOMENOS. EXISTE UNA CORRELACION DIRECTA ENTRE LA LIBERACION DE PEPTIDOS Y EL INTERCAMBIO, INDEPENDIENTEMENTE DE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS.

### III.8 : EFECTO DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS .

A. SE ESTUDIO EL EFECTO DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS QUE INHIBEN LA SINTESIS PROTEICA SOBRE LA REACCION DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES. LA TETRACICLINA, LA SPARSOMICINA, EL ACIDO FUSIDICO Y EL CLORANFENICOL INHIBEN LA SINTESIS PROTEICA Y EL INTERCAMBIO ( TABLA XIII ). EL INTERCAMBIO ES INHIBIDO MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA SINTESIS PROTEICA, EN ESTE CASO, DE LA ELONGACION DE LA CADENA PEPTIDICA, Y POR LO TANTO SU TERMINACION. NO ACTUAN SOBRE EL INTERCAMBIO EN SI, PUES NO LO INHIBEN SI SE AGREGAN A LAS MISMAS CONCENTRACIONES DESPUES DE UNA PRIMERA INCUBACION DEL SISTEMA COMPLETO ANTES DE AÑADIR LAS SUBUNIDADES MARCADAS EN UNA SEGUNDA INCUBACION.

EN CAMBIO LA PUROMICINA, QUE INHIBE LA ELONGACION, ESTIMULA EL INTERCAMBIO EN FORMA LLAMATIVA. MAS AUN, SE NOTA UNA CORRELACION ENTRE EL GRADO DE DEPRESION DE LA SINTESIS PROTEICA Y EL AUMENTO DEL INTERCAMBIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PUROMICINA, ( FIGURA 17 ).

ESTO SE DEBE AL CONOCIDO MECANISMO DE ACCION DE LA PUROMICINA, QUE REACCIONA CON EL PEPTIDIL-T-RNA EN EL RIBOSOMA, LIBERANDOSE PEPTIDIL-PUROMICINA. DEBIDO A ESTA LIBERACION PREMATURA DEL PEPTIDO, SE SUPONE QUE EL RIBOSOMA SE DESACOPLA DEL MENSAJERO.

HEMOS USADO LA ESPERMIDINA PARA ESTUDIAR EL DESACOPLAMIENTO DEL RIBOSOMA DE SU MENSAJERO "A POSTERIORI" DE LA ACCION DE LA PUROMICINA.

PARA ELLO SE EFECTUARON LOS MISMOS EXPERIMENTOS DESCRIPTOS EN LAS SECCIONES III.5 Y III.6 MIDIENDO EL INTERCAMBIO DURANTE LA PRIMERA Y SEGUNDA INCUBACIONES, AMBAS EN PRESENCIA DE PUROMICINA 1,2 MILIMOLAR, CON O SIN EL AGREGADO DE ESPERMIDINA.

LLAMA LA ATENCION QUE LA ESPERMIDINA INHIBE EL INTERCAMBIO EN TODOS LOS CASOS EN QUE ESTA PRESENTE, A DIFERENCIA DE LO QUE OCURRE EN LA TERMINACION FISIOLOGICA.

SE PODRIA ARGUMENTAR QUE EN EL CASO DE LA TERMINACION PREMATURA POR ACCION DE LA PUROMICINA, LA ESPERMIDINA ESTABILIZA ALGUN COMPLEJO RIBOSOMAL QUE CONTIENE EL M-RNA O LA CADENA PEPTIDICA, IMPIDIENDOSE ASI EL INTERCAMBIO PRODUCIDO A RAIZ DE ESA TERMINACION PREMATURA. DEBIDO A ESO, SE REALIZARON ALGUNOS EXPERIMENTOS DE CONTROL QUE MUESTRAN QUE EL AGREGADO DE ESPERMIDINA NO AFECTA LA LIBERACION DEL PEPTIDO Y DEL M-RNA POSTERIORES A LA ACCION DE LA PUROMICINA, ( FIGURA 19 Y TABLA XIII ).

TABLA XIII

	LIBERACION DE PEPTIDOS %	LIBERACION DE M-RNA %
SISTEMA COMPLETO	32	38
+ PUROMICINA	79	82
+ PUROMICINA + ESPERMIDINA	81	84



ERA IMPORTANTE, POR LO TANTO, CONSEGUIR UN REACTIVO QUE ACTUARA SOBRE ESE EQUILIBRIO Y LO DESPLAZARA SENSIBLEMENTE HACIA LA DERECHA, IMPIDIENDO LA DISOCIACION DEL RIBOSOMA LIBRE, EN CASO DE SER ESTE EL PRODUCTO DEL DESACOPLAMIENTO, Y PERMITIENDO SU REASOCIACION EN CASO DE QUE EL DESACOPLAMIENTO SE EFECTUARA EN LA FORMA DISOCIADA. ESTE REACTIVO RESULTO SER LA ESPERMIDINA, QUE ADEMAS TIENE LA VENTAJA DE SER UN COMPONENTE NORMAL Y FISIOLOGICO DEL RIBOSOMA Y DEL MEDIO INTRACELULAR BACTERIANO.

ESTA SUSTANCIA DESPLAZA FUERTEMENTE LA REACCION A LA DERECHA PROBABLEMENTE DISMINUYENDO  $V_2$ . SI EL DESACOPLAMIENTO SE PRODUJERA SEGUN EL ESQUEMA A DE LA FIGURA 20, LA ESPERMIDINA PERMITIRIA EL INTERCAMBIO AL NO AFECTAR  $V_1$ , ES DECIR LA VELOCIDAD DE ASOCIACION DE LAS SUBPARTICULAS. EN ESTE CASO SE FORMARIAN HIBRIDOS, PUES CADA SUBUNIDAD 30 S RADIOACTIVA TIENE IGUALES PROBABILIDADES DE ASOCIARSE CON LA SUBUNIDAD 50 S QUE CUALQUIER OTRA SUBUNIDAD 30 S. EN CAMBIO SI SE PRODUJERA EL DESACOPLAMIENTO SEGUN EL MODELO B, LA ESPERMIDINA HARIA EL INTERCAMBIO TAN LENTO, POR DISMINUCION DE  $V_2$  QUE NO SE DETECTARIA EN UN COMIENZO. ES CIERTO QUE DEJADO DURANTE UN TIEMPO SUFICIENTE, LOS HIBRIDOS TERMINARIAN POR DETECTARSE IGUAL QUE EN EL CASO ANTERIOR, PERO LA VELOCIDAD DE INTERCAMBIO SERIA SENSIBLEMENTE MENOR.

EN NUESTRO SISTEMA, LA ESPERMIDINA, EN LA CONCENTRACION UTILIZADA, NO AFECTA LA ELONGACION, MEDIDA COMO LA INCORPORACION EFECTIVA DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS A LAS MOLECULAS PROTEICAS; NO MODIFICA LA LIBERACION DEL PEPTIDO TERMINADO; Y NO ALTERA EL DESPRENDIMIENTO DEL RIBOSOMA DEL MENSAJERO AL TERMINAR LA SINTESIS PROTEICA.

EN LOS EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO SE PUEDE OBSERVAR CLARAMENTE QUE DURANTE LA TERMINACION, LA MAGNITUD DEL INTERCAMBIO NO ES DISMINUIDA EN LO MAS MINIMO POR EL AGREGADO DE ESPERMIDINA. ESTO ERA DE ESPERAR SI EL DESACOPLAMIENTO SE PRODUCIA DE ACUERDO AL MODELO A DEL ESQUEMA MENCIONADO, Y SOLO EN ESTE CASO.

LA FIGURA 12 B NOS MUESTRA EL EFECTO DE LA ESPERMIDINA SOBRE EL INTERCAMBIO UNA VEZ QUE SE HAN ASOCIADO LAS SUBUNIDADES LUEGO DE LA TERMINACION Y DESACOPLAMIENTO. ESTO RATIFICA LA CAPACIDAD DE LA ESPERMIDINA DE INHIBIR EL INTERCAMBIO SI EL MODELO CORRECTO HUBIESE SIDO EL B.

ADEMAS NUESTRO SISTEMA NO REINICIA LA SINTESIS PROTEICA, Y ESTO DESCARTA LA POSIBILIDAD DE QUE EL INTERCAMBIO ESTUDIADO SEA DEBIDO A LA FORMACION DE MONOSOMAS O COMPLEJOS DE INICIACION. SEGUN MUCHOS CRITERIOS, EL HIBRIDO SE COMPORTA IGUAL A UNA PARTICULA 70 S LIBRE (DE TERMINACION) Y NO COMO MONOSOMA: SE DISOCIA POR BAJAS CONCENTRACIONES DE MAGNESIO, PERO RELATIVAMENTE SUPERIORES A LAS REQUERIDAS POR EL MONOSOMA, Y POR ACCION DE LA RNASA Y DEL FACTOR DISOCIANTE, E INTERCAMBIA SUS SUBUNIDADES CON SUBUNIDADES 30 S AGREGADAS, (FIGURAS 13, 14, Y 15).

SIN EMBARGO EL SISTEMA ESTARIA EN CONDICIONES DE REINICIAR SI SE UTILI-

ZARAN LAS SUBUNIDADES ADECUADAS PARA ELLO. ESTO LO ILUSTRAN LOS EXPERI-  
MENTOS CON PARTICULAS 30 S NATIVAS, LAS QUE POR ESTA CAUSA NO FUERON  
UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS TOMADOS EN CUENTA.

SE DESCARTO ADEMAS LA POSIBILIDAD DE QUE EL HIBRIDO SEA PRODUCTO DE LA  
ASOCIACION DE LAS SUBUNIDADES RADIOACTIVAS CON SUBUNIDADES 50 S QUE  
ESTUVIESEN CONTAMINANDO EL SISTEMA.

UN ASPECTO IMPORTANTE ES LA CORRELACION QUE HAY ENTRE LA TERMINACION Y  
EL INTERCAMBIO, QUE INDICA LA DEPENDENCIA QUE HAY DEL SEGUNDO FENOMENO  
CON RESPECTO AL PRIMERO. LA FIGURA 16 ILUSTRAS QUE LA CORRELACION ENTRE  
ELLOS ES MUCHO MAYOR QUE ENTRE CUALQUIERA DE ELLOS Y LA ELONGACION. ES  
DECIR QUE NO ES SUFICIENTE QUE HAYA ELONGACION PARA QUE OCURRA EL INTER-  
CAMBIO, SINO QUE DEBE HABER EFECTIVAMENTE UNA TERMINACION.

EN LA FIGURA 21, EN SU PARTE SUPERIOR, SE ESQUEMATIZA LA TERMINACION  
FISIOLOGICA Y EL DESACOPLAMIENTO CONSECUENTE, TAL COMO CONSIDERAMOS QUE  
SUCEDE DE ACUERDO CON LOS RESULTADOS RELATADOS.

AL ESTUDIAR EL EFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS, SE NOTA QUE, CON LA EXCEPCION  
DE LA PUROMICINA, TODOS LOS ANTIBIOTICOS MENCIONADOS EN LA ULTIMA  
SECCION DE LOS RESULTADOS INHIBEN EL INTERCAMBIO SIMPLEMENTE PORQUE  
INHIBEN LA SINTESIS PROTEICA. EL INTERCAMBIO DISMINUYE AL NO  
HABER TERMINACION DE LA SINTESIS, Y DESACOPLAMIENTO DE RIBOSOMAS QUE  
PUEDAN INTERCAMBIAR. LOS MISMOS ANTIBIOTICOS NO INHIBEN EL INTERCAMBIO  
SI SE LOS AGREGA CUANDO LOS RIBOSOMAS DE TERMINACION YA SE ENCUENTRAN  
FORMADOS .

UNA EXCEPCION A ESTO ULTIMO ES LA NEOMICINA, (RESULTADOS NO MOSTRADOS).  
ELLA INHIBE EL INTERCAMBIO "POST TERMINACION" POR TENER UN EFECTO ESTA-  
BILIZANTE SOBRE LA PARTICULA 70 S . EL HECHO DE QUE ESTE ANTIBIOTICO  
INTERFIERE TAMBIEN EN EL MECANISMO DE SINTESIS PROTEICA NO NOS PERMITIO  
USARLO COMO REACTIVO, EN NUESTROS ESTUDIOS DEL INTERCAMBIO. POR ESTE  
MOTIVO RECURRIMOS A LA ESPERMIDINA.

EN CAMBIO , LA PUROMICINA PRODUCE TERMINACIONES PREMATURAS, SI BIEN NO  
FISIOLOGICAS, QUE DEJAN RIBOSOMAS LIBRES. COMO ERA PREDECIBLE, EN VEZ DE  
DISMINUIR , EL INTERCAMBIO FUE ESTIMULADO

EL USO DE LA ESPERMIDINA NOS PERMITIO INVESTIGAR LA MAYOR O MENOR SEME-  
JANZA DEL DESACOPLAMIENTO ENTRE LA TERMINACION FISIOLOGICA Y LA TERMINA-  
CION PREMATURA POR ACCION DE LA PUROMICINA.

LAS MAGNITUDES DEL INTERCAMBIO SON SUPERIORES EN EL CASO DE LAS TERMINA-  
CIONES PREMATURAS QUE EN LA FISIOLOGICA. ESTO SE DEBE A QUE PRACTICAMEN-  
TE TODOS LOS RIBOSOMAS PARTICIPAN EN EL INTERCAMBIO EN EL PRIMER CASO,  
MIENTRAS QUE SOLO LOS RIBOSOMAS QUE LLEGAN A UN CODON DE TERMINACION LO  
HACEN EN EL SEGUNDO CASO. ADEMAS LA DEGRADACION NUCLEOLITICA DEL M-RNA  
HACE QUE MUCHOS RIBOSOMAS PUEDAN ELONGAR EN MAYOR O MENOR GRADO SU PEP-

TIDO, PERO NO PUEDAN JAMAS LLEGAR A UNA SEÑAL DE TERMINACION .

LA VELOCIDAD DE INTERCAMBIO ES SUPERIOR EN EL CASO DE LA PUROMICINA, Y ESTO SE DEBE AL EFECTO INSTANTANEO DE LA MISMA, MIENTRAS QUE LA ELON-ACION ES UN FENOMENO COMPARATIVAMENTE MAS LENTO

EN CUANTO AL MODO DE DESACOPAMIENTO, LOS EXPERIMENTOS INDICAN SIN LUGAR A DUDAS QUE EN EL CASO DE LA TERMINACION PREMATURA POR EFECTO DE LA PUROMICINA , EL RIBOSOMA SE SEPARA DEL MENSAJERO SIN QUE LAS SUBUNIDADES PIERDAN EL CONTACTO FISICO ENTRE SI. LA CASI AUSENCIA DE INTERCAMBIO CON ESPERMIDINA DURANTE EL TRATAMIENTO CON PUROMICINA ( FIGURA 18 ), INDICA CLARAMENTE ESTE MODO DE ACCION.

EN OTRAS PALABRAS , EN ESTE CASO EL MODELO PERTINENTE ES EL B DE LA FIGURA 20 . LA PARTE INFERIOR DE LA FIGURA 21 ILUSTRAS ESQUEMATICAMENTE EL MODO DE DESACOPAMIENTO POR EFECTO DE LA PUROMICINA.

CABIA LA POSIBILIDAD DE QUE LA PUROMICINA EN PRESENCIA DE LA ESPERMIDINA, IMPIDIERA LA LIBERACION EFECTIVA DEL PEPTIDO, O LA SEPARACION DEL MENSAJERO , ACTUANDO ESTAS SUSTANCIAS COMO ESTABILIZANTES DE LA PARTICULA 70 S. LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA XIII Y DE LA FIGURA 19 DESCARTARON AMBAS POSIBILIDADES.

LA EXISTENCIA "IN VIVO" DE LA PARTICULA 70 S LIBRE NO PERMITE AFIRMAR NADA DEFINITIVO SOBRE SU IMPORTANCIA. ES MUY PROBABLE QUE A VELOCIDADES DE SINTESIS PROTEICA ALTAS, LAS PARTICULAS DISOCIADAS DURANTE EL DESACOPAMIENTO SEAN LAS QUE DIRECTAMENTE REINICIEN LA SINTESIS PROTEICA. EN ESTE CASO LA PARTICULA RIBOSOMAL LIBRE SERIA UNA FORMA DE RESERVA O DE "REPOSO" EN MOMENTOS EN QUE LA VELOCIDAD DE BIOSINTESIS PROTEICA DISMINUYE. ESTO SERIA ASI POR SER LA FORMA ASOCIADA LA MAS ESTABLE TERMODINAMICAMENTE.

LAS REACCIONES ESTUDIADAS "IN VITRO" NO TIENEN LA EFICIENCIA DEL FENOMENO QUE OCURRE "IN VIVO". EN ESTE SENTIDO ES PROBABLE QUE POR SER NUESTRO SISTEMA "IN VITRO" SUB-OPTIMO, SE ASEMEJE A SISTEMAS FISIOLOGICOS DE MENORES O ESCASAS NECESIDADES METABOLICAS.

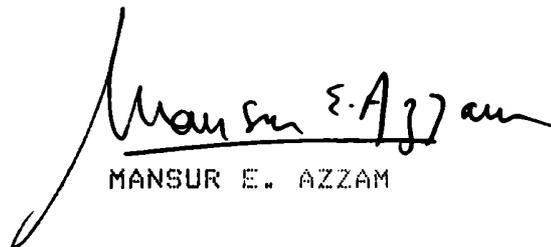
LA OTRA POSIBILIDAD ES QUE LA PARTICULA 70 S SEA UN PASO NO OPTATIVO, SINO NECESARIO EN EL CICLO RIBOSOMAL.SI BIEN NO HAY EVIDENCIAS ACERCA DE ELLO , NADA LO DESCARTA . EN ESTE SENTIDO SU CONSTANCIA EN LISADOS Y EN SISTEMAS "IN VITRO" PUEDE SER UN INDICIO QUE MEREZCA INVESTIGARSE. SIN EMBARGO NO ES EL PROPOSITO DE ESTA TESIS DISCUTIR MAYORMENTE ESTA POSIBILIDAD.

POR OTRA PARTE , LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CON PUROMICINA INDICAN QUE, POR LO MENOS EN UN CASO, NO ES NECESARIA LA DISOCIACION PARA QUE EL DESACOPAMIENTO OCURRA, PUDIENDO EL RIBOSOMA ABANDONAR EL MENSAJERO COMO PARTICULA 70 S LIBRE E INTEGRAS.

LOS RESULTADOS RELATADOS EN ESTA MEMORIA DEMUESTRAN POR PRIMERA VEZ, MEDIANTE EL USO DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES RIBOSOMICAS EN PRESENCIA DE ESPERMIDINA, EN LA FORMA RELATADA, QUE LOS RIBOSOMAS, AL DESACOPLARSE DEL MENSAJERO DURANTE LA TERMINACION DE LA SINTESIS PROTEICA LO HACEN CONCOMITANTEMENTE CON SU DISOCIACION. PRUEBAN ADEMAS CON LA MISMA METODOLOGIA, QUE EN LA TERMINACION PREMATURA PRODUCIDA POR LA PUROMICINA, EL RIBOSOMA SE DESPRENDE DEL MENSAJERO SIN NECESIDAD DE UNA DISOCIACION, MOSTRANDO ASI UNA NUEVA DIFERENCIA ENTRE LOS DOS FENOMENOS .



ISRAEL D. ALGRANATI



MANSUR E. AZZAM

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1.- HILL W.E., ROSSETTI G.P., VAN HOLDE K.E., J. MOL. BIOL 44: 89, 1969
- 2.- TISSIERES A. J. MOL. BIOL. 1:221, 1958
- 3.- STANLEY M.W, BOCK R.M., BIOCHEM 4:1302, 1965
- 4.- KURLAND C.G., J. MOL. BIOL. 2:83, 1960
- 5.- KALTSCHMIDT E., ANAL. BIOCHEM., 43:25, 1971
- 6.- KALTSCHMIDT E., WITTMAN H.G., BIOCHEMIE 54:167, 1972
- 7.- DZIONARA M., KALTSCHMIDT E., WITTMAN H.G., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 67:1909, 1970
- 8.- NOMURA M., MIZUSHIMA S., OZAKI M., TRAUB P., LOWRY C.V., COLD SPRING. H.SYMP. QUANT.BIOL. 34:49, 1969
- 9.- TRAUB P., NOMURA M., J. MOL. BIOL. 40:391, 1969
- 10.- NOMURA M., ERDMANN V.A., NATURE 228:744, 1970
- 11.- NASHIMOTO H., HELD W., KALTSCHMIDT E., NOMURA M., J.MOL. BIOL 62:22, 1971
- 12.- TISSIERES A., WATSON J.P., NATURE 182:778, 1958
- 13.- ZITOMER R.S., FLACKS J.G., J. MOL.BIOL. 71:263, 1972
- 14.- BELITSINA N.V., SPIRIN A.S., J.MOL.BIOL. 52:45, 1970
- 15.- SPIRIN A.S., FEBS LETTERS 14:349, 1971
- 16.- KAJI A., KAJI H., BIOCHEM.RES.COMMUN. 13:186, 1963
- 17.- NAKAMOTO T., SUWAY T.W., ALLENDE J.E., SPYRIDES G.J., LUPMAN F., COLD.SP.HARB.SYMP.QUANT.BIOL. 28:227, 1963
- 18.- NIRENBERG M.W., LEDER P., ACIENCE 145:1399, 1964
- 19.- PETSKA S., J.BIOL.CHEM. 242:4939, 1967
- 20.- GOTTESMAN M.C., J.BIOL.CHEM. 242:5564, 1967
- 21.- NOMURA M., LOWRY C.V., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 58:946, 1967
- 22.- ALLENDE J.E., WEISSBACH H., BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. 28:82,1967
- 23.- ANDERSON J.S., BRETSCHER M.S., CLARK B.F.C., MARCKER K.A., NATURE 215:490, 1967
- 24.- EISENSTAND J.M., BRAWERMAN G., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 56:1560,1967
- 25.- REVEL M., BRAWERMAN G., LELONG J.C., NATURE 219:1016, 1968
- 26.- CHAE Y.B., MAZUMDER R., OCHOA S., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 63:828, 1969
- 27.- MAZUMDER R., FED.PROC. 30:236, 1971
- 28.- SABOL S., SILLERO M.A., IWASAKI K., OCHOA S., NATURE N.BIOL. 228:269, 1971
- 29.- KOLAKOFSKY K., DEWEY K., THACH R.E., NATURE 223:694, 1969
- 30.- THACH S., THACH R.E., NATURE N.BIOL. 229:219, 1971
- 31.- RUDLAND P.S., WHYBROW W.A., CLARK B.F.C., NATURE N.BIOL. 231:76, 1971
- 32.- GOSH H.P., KHORANA H.G., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 58:2455, 1967
- 33.- KOLAKOFSKY D., OHTA T., THACH R.E., NATURE 220:244, 1968
- 34.- HERSHEY J.W.B., MONRO R.E., J.MOL.BIOL. 18:68, 1966
- 35.- KONDO M., EGGERTSSON G., EISENSTADT J., NATURE 220:368, 1968
- 36.- OHTA T., SARKAN S., THACH R.E., PROC.NAC.ACAD.SCI. USA 58:1638, 1967
- 37.- KOLAKOFSKY D., DEWEY K.F., HERSHEY J.W.B., THACH R.E., PROC.NAT. ACAD.SCI. USA 61:1066, 1968
- 38.- BRETSHER M., NATURE 218:675, 1968
- 39.- LUCAS LENARD J., HAENNI A.L., PRO.NAT.ACAD.SCI. USA 63:93, 1969

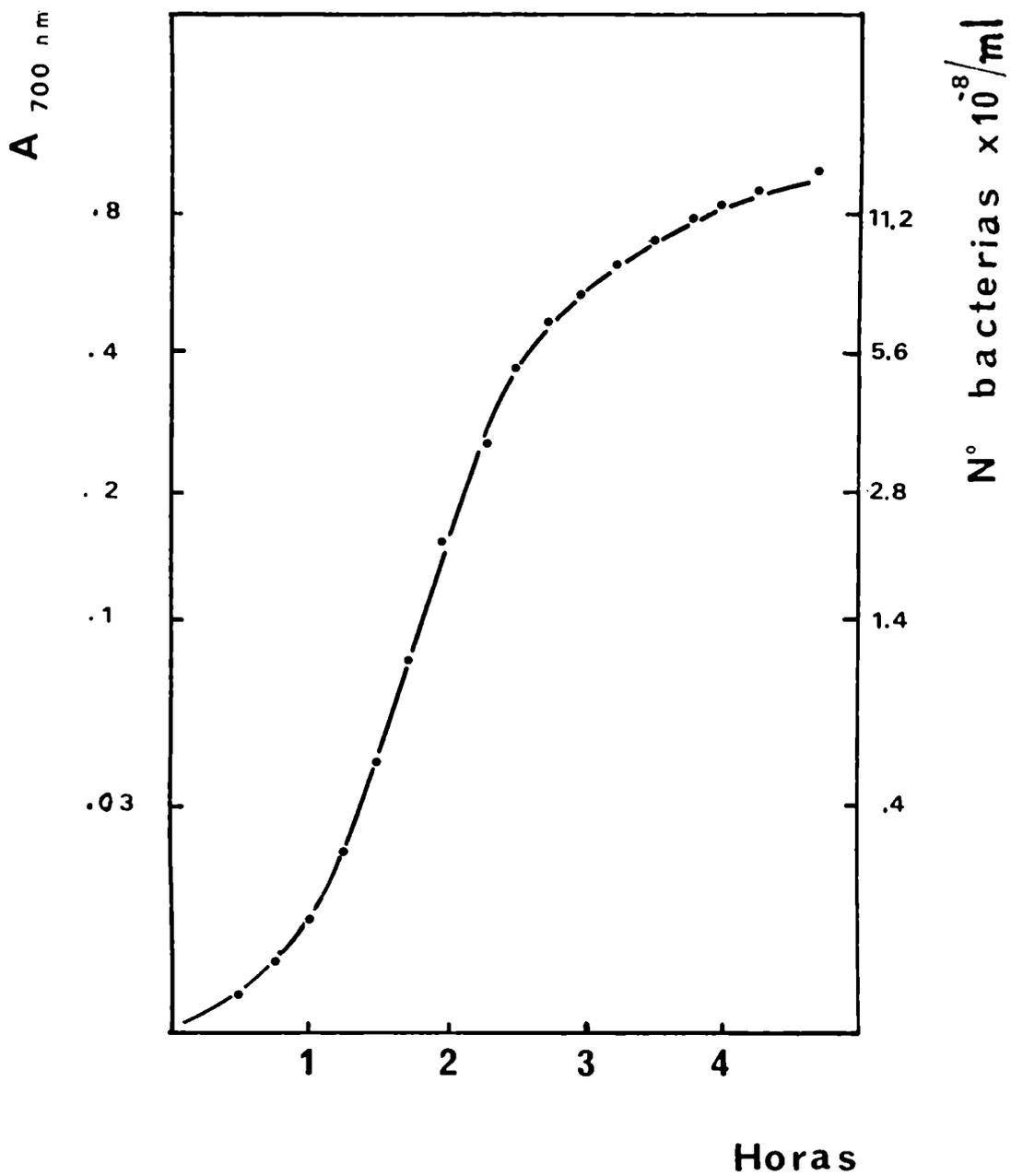
- 40.- MILLER D.L., WEISSBACH H., ARCH.BIOCH.BIOPHY. 141:26, 1970
- 41.- RAVEL J.M., SHOREY R.L., SHIVE W., BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. 29:68, 1967
- 42.- MILLER D.L., WEISSBACH H., BIOCH.BIOPHYS.RES.COMMUN. 38:1016, 1970
- 43.- ONO Y., SKOULTCH A., KLEIN A., LENGYEL O., NATURE 220:1304, 1968
- 44.- WATERSON J., BEAUD G., LENGYEL P., NATURE 217:34, 1970
- 45.- RAVEL J.M., SHOREY R.Z., SHIVE W., BIOCHEM. 9:5028, 1970
- 46.- YARMOLINSKY M.B., DE LA HABA G.L., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 45:1721, 1959
- 47.- MONRO R.E., J.MOL.BIOL. 26:147, 1967
- 48.- LIPMANN F., EN "ESSAYS IN BIOCHEMISTRY" 4:1, 1968.EDITADO POR P.N. CAMPBELL Y G.D. GREVILLE
- 49.- LEDER P., SKOGERSON L.E., NAV.M.M., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 62:451, 1969
- 50.- PARMEGGIANI A., BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. 30:613, 1968
- 51.- NISHIZUKA Y., LIPMANN F., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 55:212, 1966
- 52.- GANZA M.C., COLD.SPR.HARB.SYMP.QUANT.BIOL. 31:273, 1966
- 53.- CAPECCHI M.R., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 58:1144, 1967
- 54.- CASKEY C.T., TOMPKINS R., GOLDSTEIN J., MILMAN G., SCIENCE 162:135, 1968
- 55.- SCOLNIK E.M., TOMPKINS R., CASKEY T., NIRENBERG M., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 61:768, 1968
- 56.- SCOLNIK E.M., CASKEY C.T. PROC.NAT.ACAD.SCI. USA 64:235, 1969
- 57.- CAPECCHI M.R., KLEIN H.A., COLD SPRING HARB.SYMP.QUANT.BIOL.34: 469, 1969.
- 58.- MILMAN G., GOLDSTEIN J., SCOLNIK E., CASKEY T., PROC.NAT.ACAD.SCI. USA. 63: 183, 1969.
- 59.- GOLDSTEIN J.L., MILMAN G., SCOLNIK E., CASKEY C.T. PROC.NAT.ACAD.SCI.USA. 65:430, 1970.
- 60.- TOMPKINS R.K., SCOLNIK E.M., CASKEY C.T., PROC.NAT.ACAD.SCI.USA 65: 702, 1970.
- 61.- SCHAECHTER M., MAALOE D., KJELDGAARD N.O., J.GEN.MICR. 19:592, 1958.
- 62.- (EIDHARDT F.C., PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH,3:145, 1964.
- 63.- GODSON W.S., SINSHEIMER R.L., BIOCHEM.BIOPHYS.ACTA,149,489, 1968.
- 64.- KELLEY W.S., SCHAECHTER M., ADVANCES IN MICROBIAL PHYSIOLOGY II: 89, 1968.
- 65.- VAN KIJK-SALKINUJA M., PLANTA R.J., ARCH.BIOCH.BIOPHYS.141:477,1970.
- 66.- WARNER J.R., KNOPF T., NOLL H., NATURE 197:420,1963.
- 67.- WETTSTEIN F.O., STAHLIN P., RICH A., PROC.NAT.ACAD.SCI,USA.49: 122, 1963.
- 68.- NOMURA M., LOWRY C.V., GUTHRIE C., PROC.NAT.ACAD.SCI.UDS.58:1487, 1967
- 69.- WATSON J.D., BULL.COS.CHIM.BIOL. 46:1399, 1964.
- 70.- MANGIAROTTI G., SCHLESSINGER D., J.MOL.BIOL.20:456,1966.
- 71.- MANGIAROTTI G., SCHLESSINGER D., J.MOL.BIOL,29:395, 1967.
- 72.- SCHLESSINGER D., MANGIAROTTI G., APRIORION D., PROC.NAT.ACAD.SCI.USA 58: 1782, 1967.
- 73.- SCHLESSINGER D., APRIORION D., ANN.REV.MICROBIOL.23:387, 1969.
- 74.- SCHLESSINGER D., BACT.REV. 33:445, 1969.
- 75.- ALGRANATI I.D., GONZALEZ N.S., BADE E.G., PROC.NAT.ACAD.SCI.USA 62: 574, 1969.
- 76.- KOHLER R.E., RON E.Z., DAVIS B.D., J.MOL.BIOL.36:71, 1968.

- 77.- PHILLIPS L.A.,FRANKLIN R.M.,COLD SPRING HARB.SYMP.QUANT.BIOL 34:  
243, 1969.
- 78.- RON E.Z.,KOHLER R.E.,DAVIS B.D.,J.MOL.BIOL.36:83,1968.
- 79.- FLASSEL C.P.,RALPH P.,RICH A.,SCIENCE 158:658,1967.
- 80.- ALGRANATI I.D.,FEBS LETTERS 10:153,1970.
- 81.- PHILLIPS L.A.,HOTHAM-IGLEWSKA B.,FRANKLIN R.M., J.MOL.BIOL.40:  
279,1969.
- 82.- BELLER R.J.,DAVIS B.D. J.MOL.BIOL. 55:477,1971.
- 83.- UCHIDA T.,ABE M.,MATSUO K.,YONEDA M. B.B.ACTA 224:628, 1970.
- 84.- SUBRAMANIAN A.R.,RON E.Z.,DAVIS B.D.,PROC.NAT.ACAD.SCI.61:761,1968.
- 85.- BADE E.G.,GONZALEZ N.S.,ALGRANATI I.D.,PROC.NAT.ACAD.SCI.USA 64:  
654,1969.
- 86.- KAEMPFER R.,MESELSON M.,RASKAS H.J.,J.MOL.BIOL.31:277,1968.
- 87.- KAEMPFER R.,MESSELSON M., C.SPR.HARB.SYMP.QUANT.BIOL. 34:209,1969.
- 88.- KAEMPFER R.,PROC.NAT.ACAD.SCI.USA.61:106,1968.
- 89.- FALVEY A.K.,STAEHLIN T., J.MOL.BIOL.53:21,1970.
- 90.- HERSHEY J.W.B.,DEWEY K.F.,THACH R.E., NATURE 222:944,1969.
- 91.- CHAE Y.B.,MAZUMDER R.,OCHOA S., PROC.NAT.ACAD.SCI.USA.62:1181,1969.
- 92.- DAVIS B.D., NATURE N.B.231:153,1971.
- 93.- SUBRAMANIAN A.R.,DAVIS B.D.,PROC.NAT.ACAD.SCI.USA.68:2453,1971.
- 94.- ALGRANATI I.D.,GONZALEZ N.S.,GARCIA PATRONE M.,PERAZZOLO C.A.,  
AZZAM M.E., EN GENE EXPRESSION AND ITS REGULATION.(EDITOR KENNEY Y  
OTROS) PLENUM PRESS, 1973, NUEVA YORK.
- 95.- ALLEN D.W.,ZAMECNIK P.C.,BIOCHIM.BIOPHYS.ACTA.55:865,1962.
- 96.- RABINOVITZ M.,FISHER J.M., J.MOL.CHEM.237:477,1962.
- 97.- NATHANS D.,PROC.NAT.ACAD.SCI.USA. 51:585,1964.
- 98.- RON E.Z.,KOHLER R.E.,DAVIS B.D.,PROC.NAT.ACAD.SCI.USA.56:471,1966.
- 99.- VILLA TREVINO S.,FARBER E.,STAEHLIN T., WETSTEIN F.O., NOLL H.,  
J.BIOL.CHEM.239:3826,1968.
- 100- GESTELAND R.F. J.MOL.BIOL.18:356,1967.
- 101- SPIRIN A.S.,GAURILOVA L.P.,EN THE RIBOSOME PAG. 133,SPRINGER VERLAG  
1968, HEIDELBERG.
- 102- STEVENS L. PASCOE G., BIOCHEMICAL J.,128:279,1972.
- 103- HARDY S.J.S.,TURNOCK G., NATURE N.B. 229: 17,1979.
- 104- AZZAM M.E.,PERAZZOLO,C.A.,ALGRANATI I.D.,FEBS LETTERS 21:65,1972.
- 105- PERAZZOLO C.A.,AZZAM M.E.,ALGRANATI I.D.,EUROP.J.BIOCHEM.34:467,  
1973.
- 106- AZZAM M.E.,ALGRANATI I.D., PROC.NAT.ACAD.SCI USA.
- 107- GONZALEZ N.S.,GOLDEMBERG S.H.,ALGRANATI I.D.,BIOCHIMICA ET BIOPH.  
ACTA 166:760,1968.
- 108- NOLL H. TECHNIQUES IN PROTEIN SYNTHESIS VOL.II PAG.101. ACADEMIC  
PRESS, LONDON, 1969.

FIGURA 1: CURVA DE CRECIMIENTO DE E. COLI D 10.

LAS BACTERIAS FUERON CULTIVADAS EN 20 LITROS DE MEDIO  $\alpha$  A 37 GRADOS C $^{\circ}$  Y CON AIREACION FORZADA. EL CULTIVO FUE INICIADO A PARTIR DE UN INOCULO DE 500 CC CULTIVADO DURANTE LA NOCHE ANTERIOR. LAS ORDENADAS ESTAN EN ESCALA LOGARITMICA.

Fig. 1



CURVA DE CRECIMIENTO DE E. COLI D<sub>10</sub>

FIGURA 2 : ANALISIS DE GRADIENTE DE PREPARACIONES POLIRRIBOSOMALES.

A. POBLACION RIBOSOMAL DE BACTERIAS COSECHADAS EN FASE LOGARITMICA LUEGO DE ENFRIAMIENTO RAPIDO DEL CULTIVO. 2 UNIDADES DE A 260 NM DEL S 30 SE SIEMBRAN SOBRE UN GRADIENTE DE SACAROSA DE 15-40 % Y SE CENTRIFUGAN EN EL ROTOR SW 50 A 40.000 RPM DURANTE 75 MINUTOS. SE MUESTRA EL REGISTRO DEL ANALISIS CONTINUO DE LA ABSORBANCIA A 254 NM.

B. PERFIL DE LA FRACCIO POLIRRIBOSOMAL. UNA UNIDAD DE A 260 NM DE LA FRACCION ENRIQUECIDA Y PURIFICADA DE POLIRRIBOSOMAS (SECCION 11.4.2), SE SIEMBRA SOBRE UN GRADIENTE DE SACAROSA DE 15-40 %. EL TRATAMIENTO ULTERIOR ES COMO EN A.

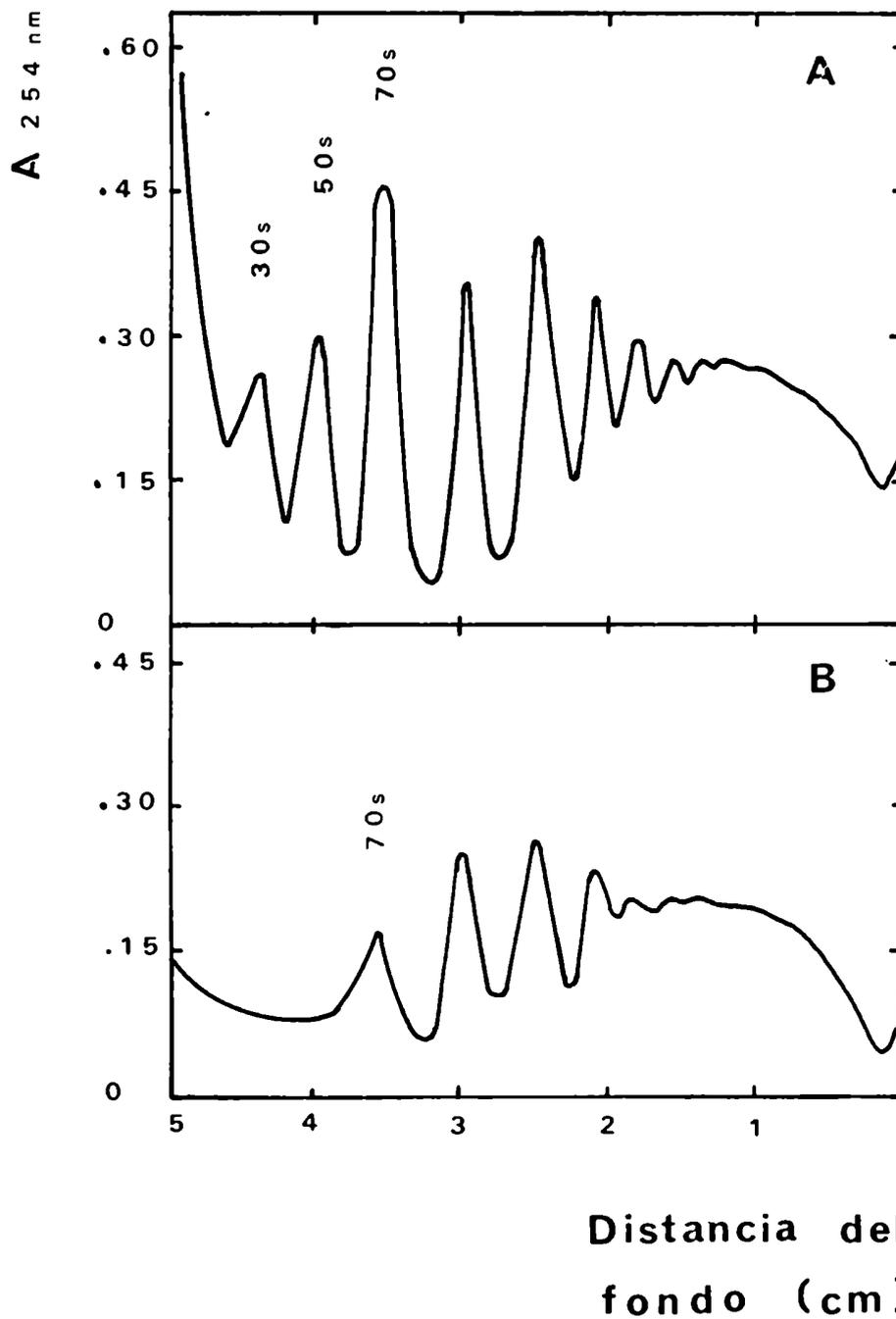


Fig. 2

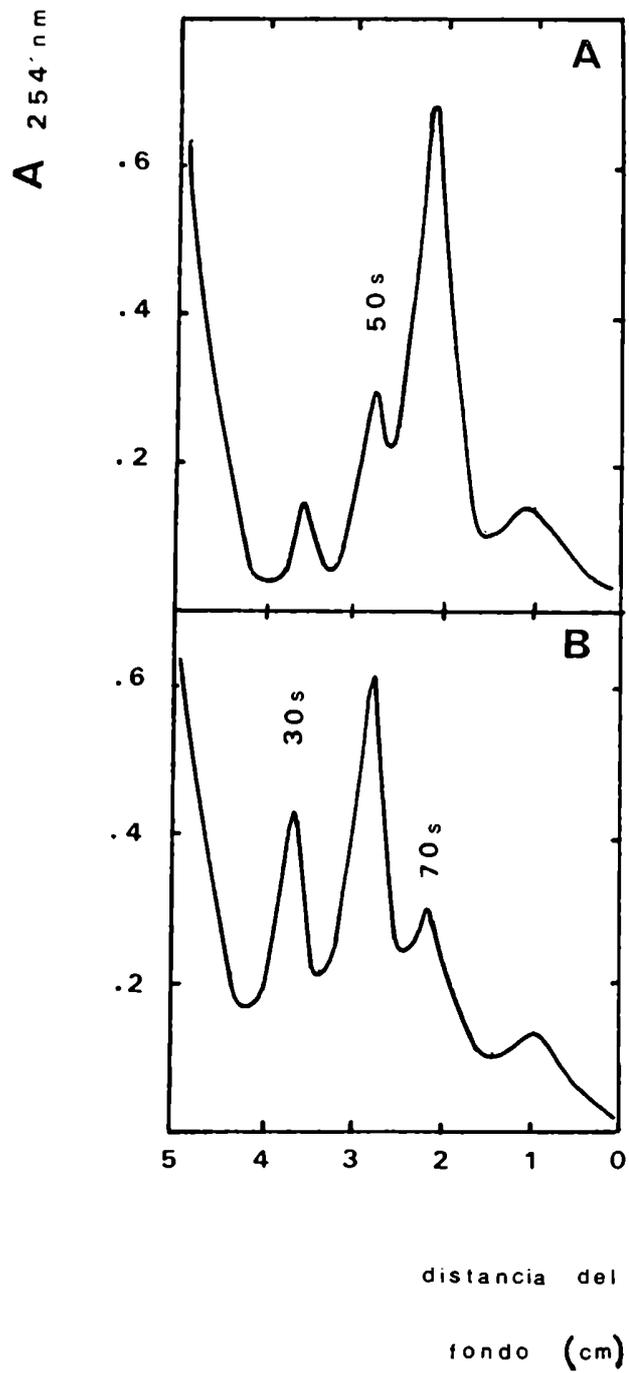
ANALISIS DE GRADIENTE DE PREPARACIONES  
POLIRRIBOSOMALES

FIGURA 3: ANALISIS DE GRADIENTE DE PREPARACIONES RIBOSOMALES.

A. POBLACION RIBOSOMAL DE BACTERIAS COSECHADAS EN LA FASE DE CRECIMIENTO LOGARITMICO LUEGO DEL ENFRIADO LENTO DEL CULTIVO. UNA UNIDAD DE A 260 NM DEL S 30 SE SIEMPRE SOBRE UN GRADIENTE DE SACAROSA DE 5-20 % , DE 5 ML DE CAPACIDAD. SE CENTRIFUGA EN EL ROTOR SW 50 A 40.000 RPM DURANTE 60 MINUTOS. SE MUESTRA EL REGISTRO CONTINUO DE LA ABSORBANCIA A 254 NM.

B. PERFIL DE LOS MISMOS RIBOSOMAS A UNA CONCENTRACION DE MAGNESIO DE 1 MILIMOLAR. UNA UNIDAD DE A 260 NM DEL S 30 DIALIZADO CONTRA TAMPON 3 DURANTE 12 HORAS SE SOMETE AL MISMO TIPO DE ANALISIS QUE EN A.

Fig. 3

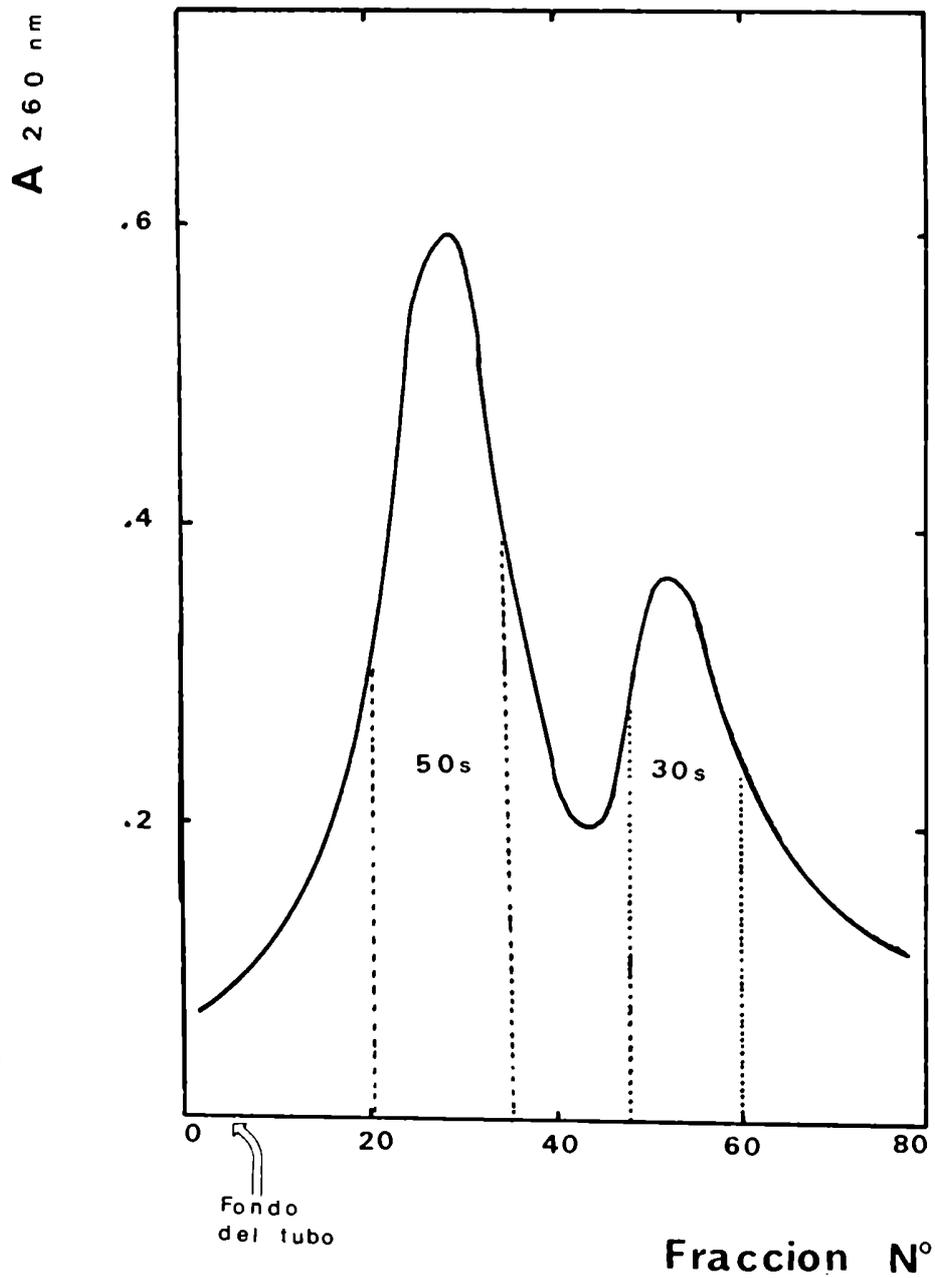


ANALISIS DE GRADIENTE DE PREPARACIONES  
RIBOSOMALES

## FIGURA 4: SEPARACION DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES.

60 UNIDADES DE A 260 NM DEL S 30 SE DIALIZAN CONTRA TAMPON 3 DURANTE 12 HORAS, Y SE SIEMBRAN SOBRE UN GRADIENTE DE SACAROSA DE 15-30 % , DE 27 ML DE CAPACIDAD, Y SE CENTRIFUGAN EN EL ROTOR SW 25 A 21.000 RPM DURANTE 14 HORAS.EL GRADIENTE SE FRACCIONA DESDE EL FONDO USANDO UNA BOMBA PERISTALTICA DE FLUJO CONSTANTE, Y SE MIDE LA ABSORBANCIA A 260 NM DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE 0,4 CC, ( O SU RADIOACTIVIDAD EN EL CASO DE SER PARTICULAS RADIOACTIVAS). SE UNEN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A CADA PICO. LAS FRACCIONES 50 A 59 CORRESPONDEN AL PICO 30 S. Y LAS FRACCIONES 21 A 36 AL PICO DE SUBPARTICULAS 50 S.

Fig. 4

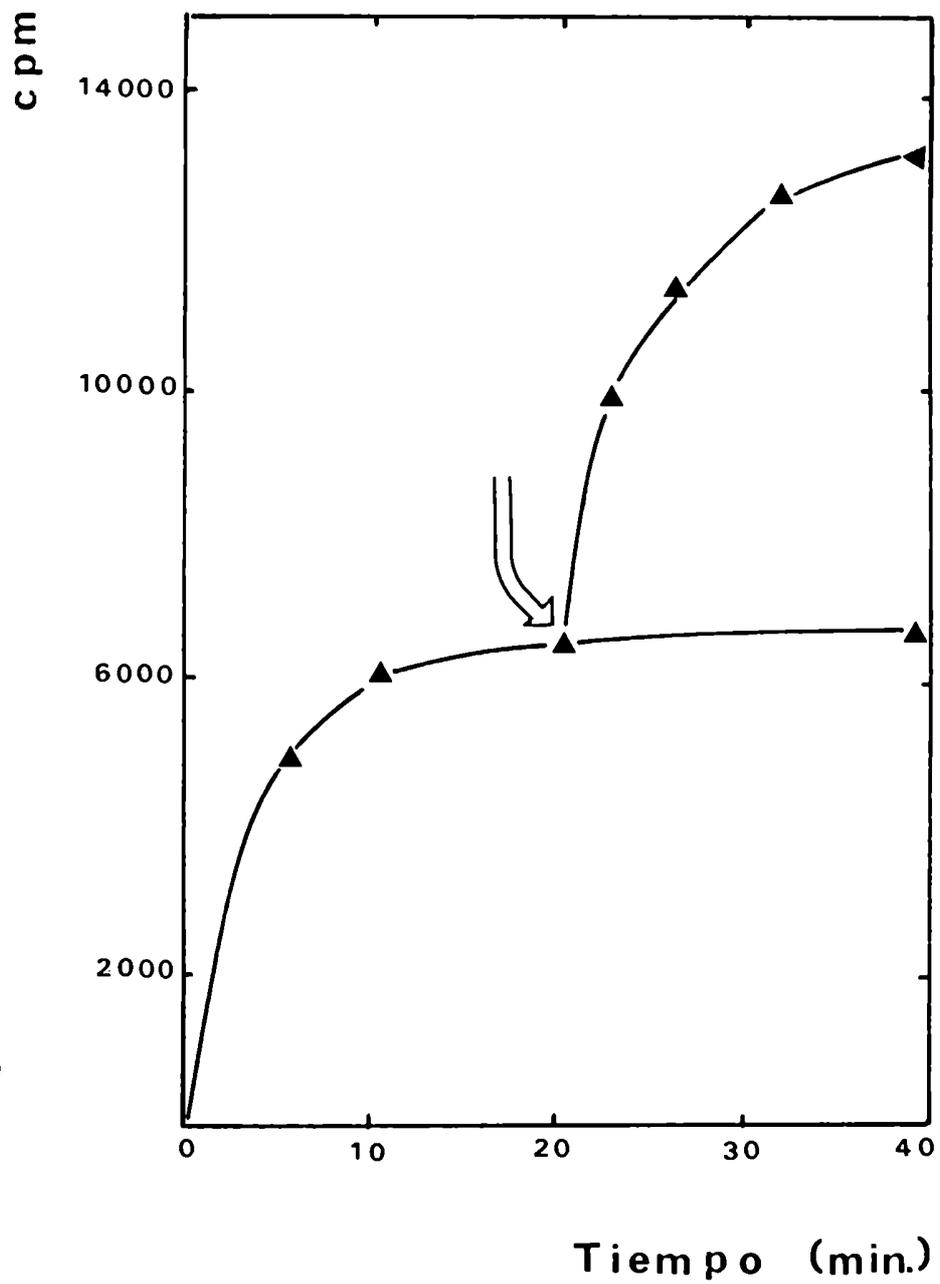


SEPARACIÓN DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES.

VELOCIDAD INCORPORACION DE AMINOACIDOS.

LA MEZCLA DE INCUBACION ES LA MENCIONADA EN EL TEXTO (SECCION II.6).  
CADA TUBO CONTIENE 2.5 UNIDADES DE A 260 NM DE POLIRIBOSOMAS , Y ESTA  
ADICIONADA CON AMINOACIDOS RADIOACTIVOS (  $2 \times 10^4$  CPM). LA FLECHA  
INDICA EL ASPECTO ULTERIOR , DE IGUAL CANTIDAD DE POLIRIBOSOMAS.

Fig. 5



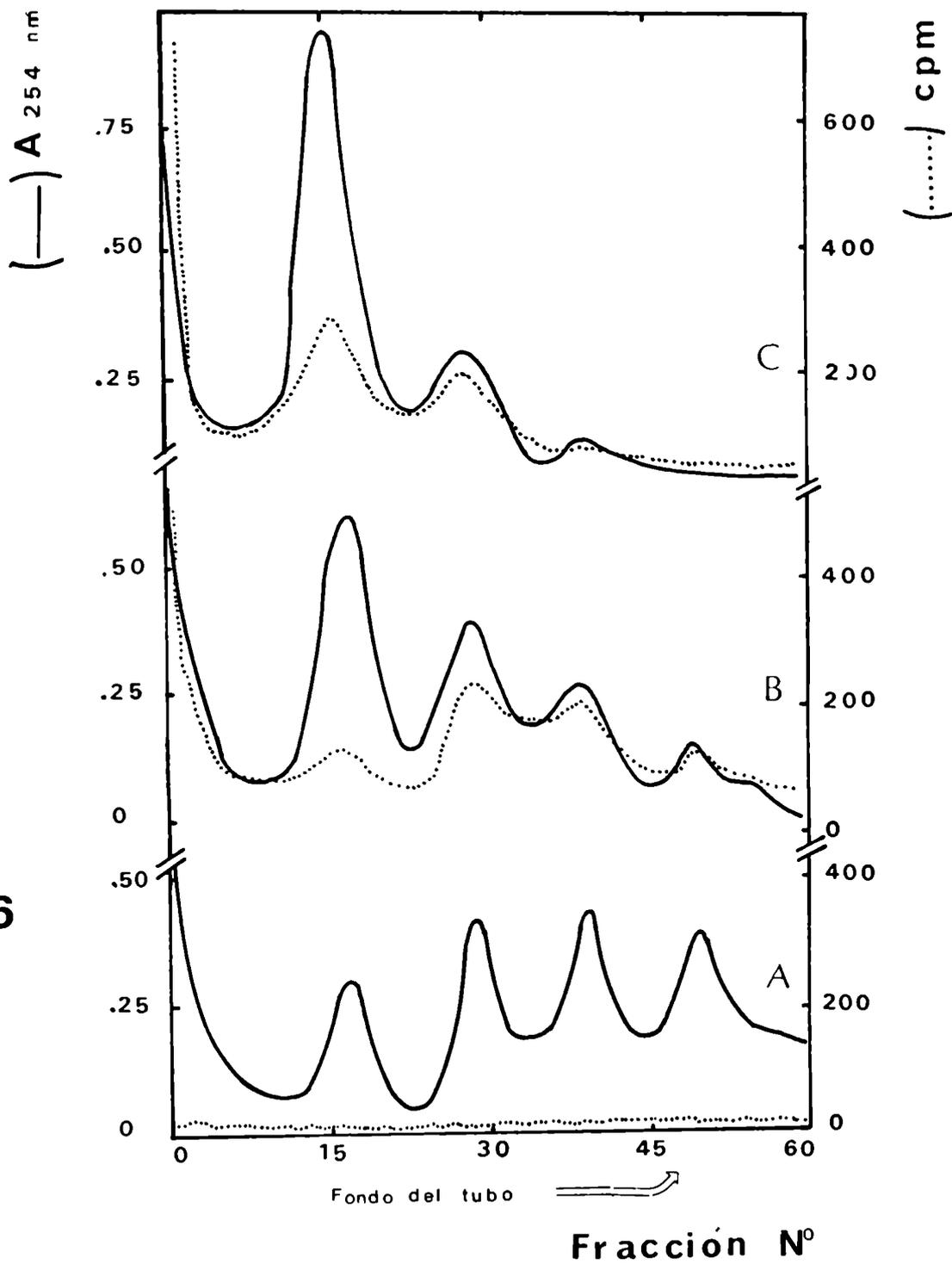
VELOCIDAD DE INCORPORACIÓN DE AMINOACIDOS

FIGURA 6 : TERMINACION DE LA SINTESIS PROTEICA.

LAS MEZCLAS DE INCUBACION EN PRESENCIA DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS, SE INCUBAN DURANTE DISTINTOS TIEMPOS Y SE SIEMBRAN LUEGO DE ENFRIAR, SOBRE GRADIENTES DE SACAROSA DE 5-20 % DE 12 ML DE CAPACIDAD, Y SE CENTRIFUGAN A 35.000 RPM EN EL ROTOR SW 40 DURANTE 75 MINUTOS. LOS GRADIENTES SE ANALIZAN Y SE MIDE LA RADIOACTIVIDAD PRECIPITABLE EN TCA CALIENTE EN CADA FRACCION . ( ——— ) A 254 NM ; ( ..... ) CPM.

- A: 0 MINUTOS DE INCUBACION.
- B: 5 MINUTOS DE INCUBACION.
- C: 30 MINUTOS DE INCUBACION.

Fig. 6

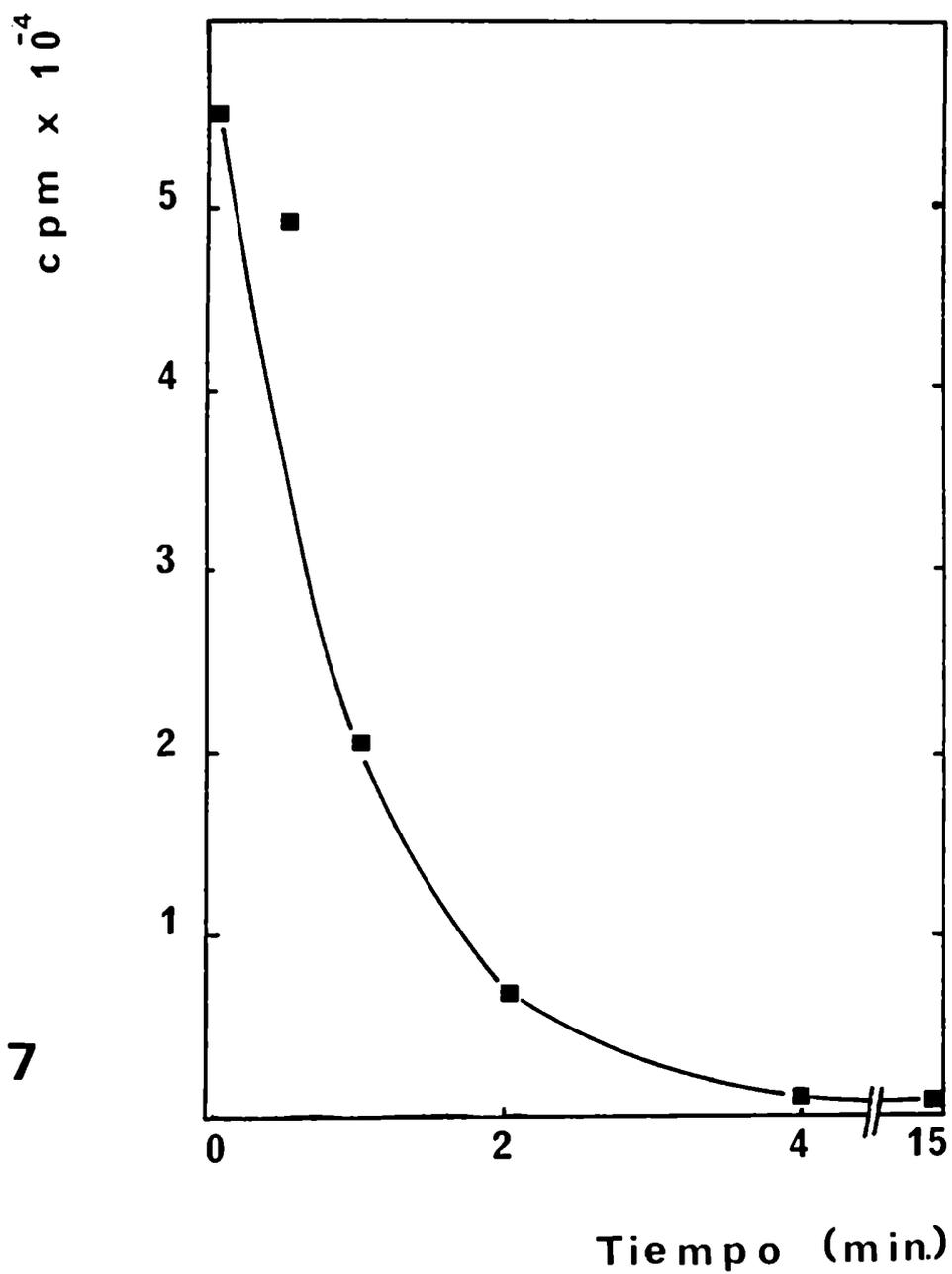


TERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA

FIGURA 7 # HIDROCLISIS DEL RNA EN TCA CALIENTE.

EN CADA TUBO SE COLOCAN SUBUNIDADES 30 S-P 32 (55.000 CPM), EN TAMPON 1, Y SE LES AGREGA TCA HASTA UNA CONCENTRACION FINAL DEL 5 %. TODOS LOS TUBOS SE CALIENTAN A 90 GRADOS C DURANTE DISTINTOS TIEMPOS. LOS TUBOS SE FILTRAN POR MILIPORE DE 0,45 MICRONES DE DIAMETRO DE PORO, Y SE MIDE LA RADIOACTIVIDAD RETENIDA. A LOS CUATRO MINUTOS DE CALENTAMIENTO EL VALOR DE LA RADIOACTIVIDAD RETENIDA ES COMPARABLE AL DE LOS BLANCOS.

Fig. 7



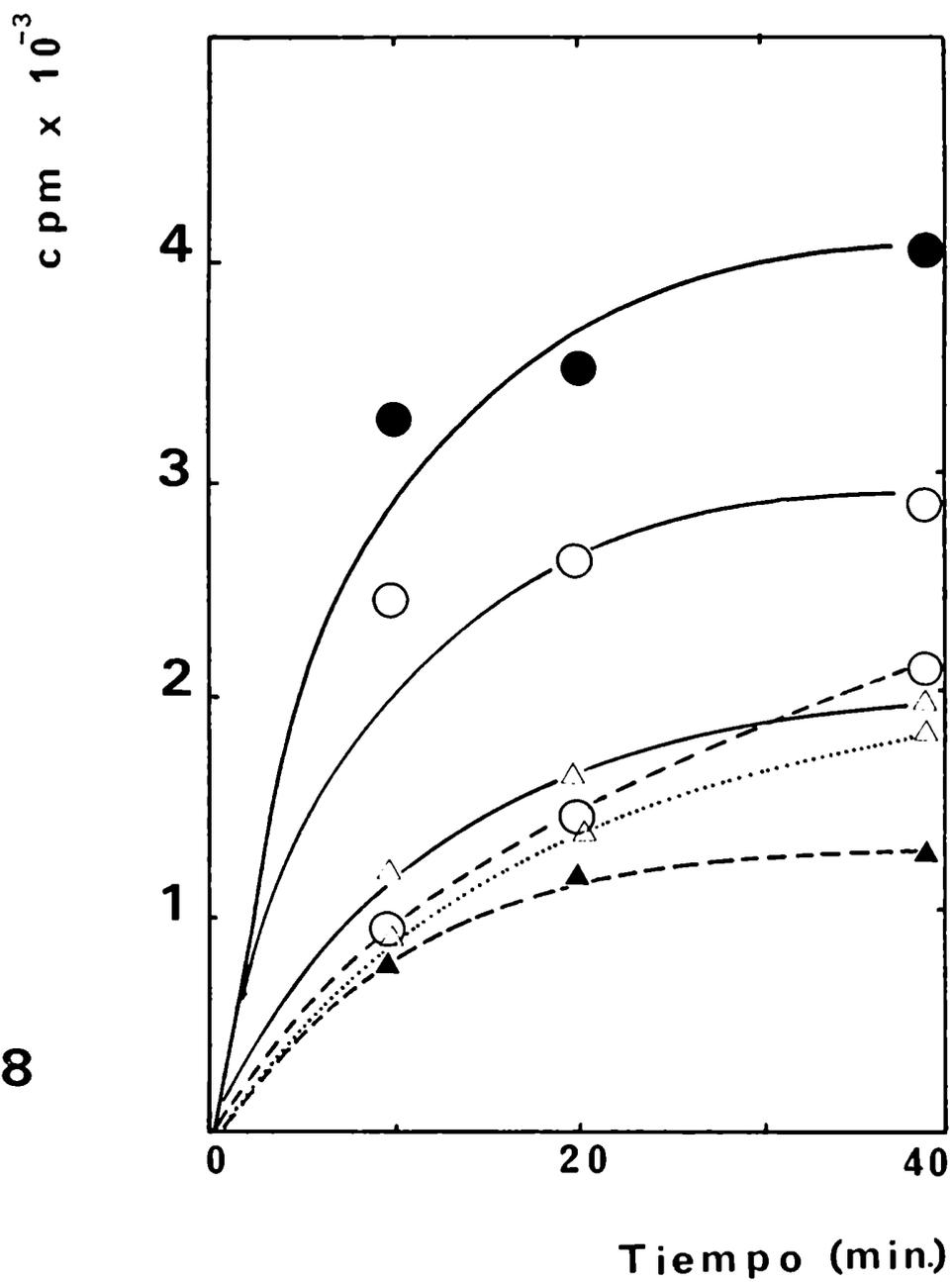
HIDRÓLISIS DEL RNA EN TCA CALIENTE

FIGURA 8 : EFECTO DE DIVERSAS SUSTANCIAS SOBRE LA CINETICA DE LA ELONGACION.

LA MEZCLA DE INCUBACION ES LA QUE SE DESCRIBE EN EL TEXTO. CADA TUBO CONTIENE AMINOACIDOS C 14 (200.000 CPM) ,EN AUSENCIA (●——●) Y EN PRESENCIA DE ETANOL M (○——○); METANOL M (○----○); NEOMICINA 1 MICROMOLAR (▲——▲); NEOMICINA 3 MICROMOLAR (▲...▲); Y NEOMICINA 10 MICROMOLAR (▲-----▲);

Fig.

8



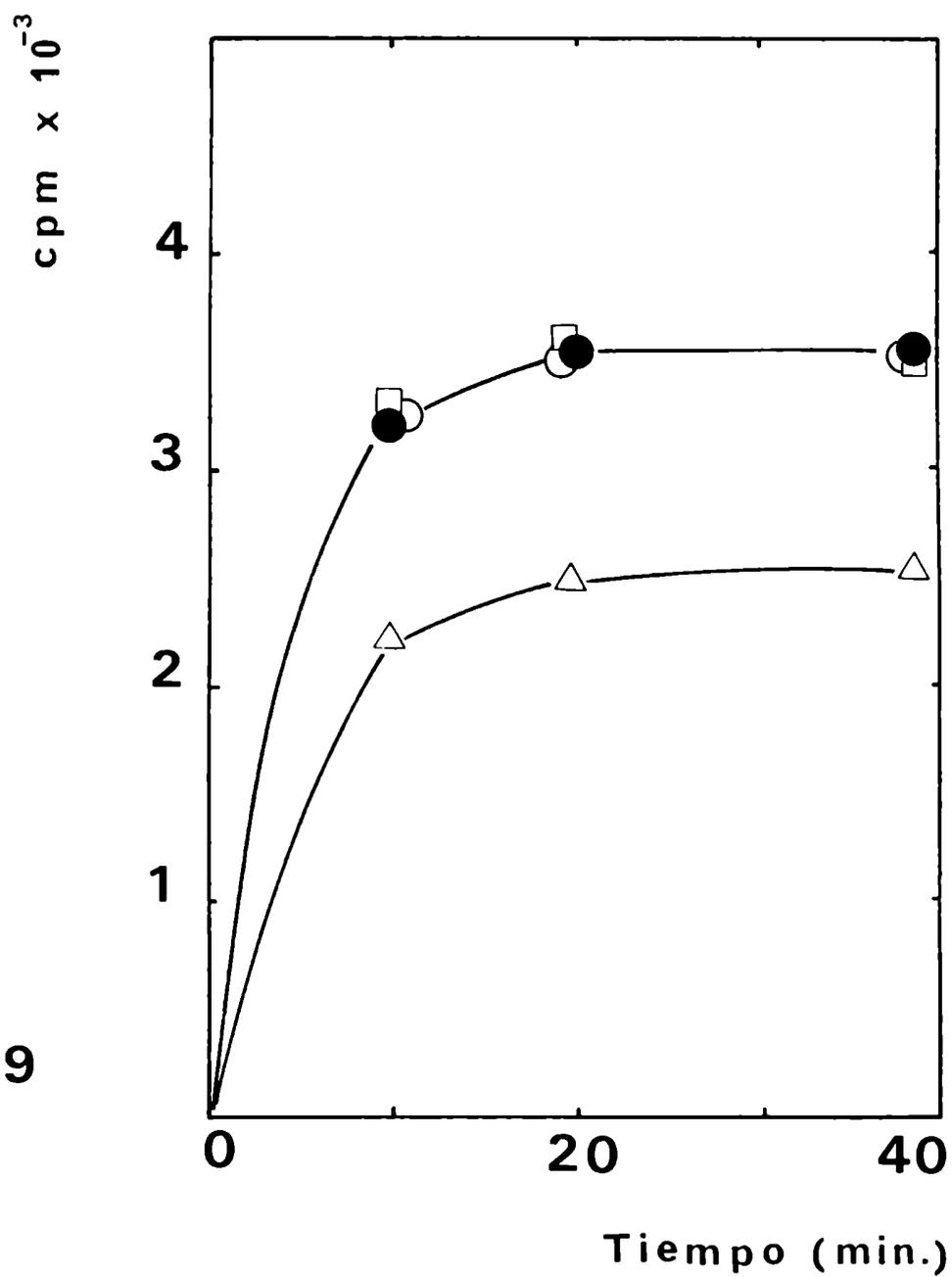
EFFECTO DE DIVERSAS SUSTANCIAS SOBRE  
LA CINÉTICA DE ELONGACIÓN

FIGURA 9 # EFECTO DE LA ESPERMIDINA SOBRE LA CINETICA DE LA ELONGACION.

LA MEZCLA DE INCUBACION ES LA YA MENCIONADA. CADA TUBO CONTIENE LOS AMINOCIDOS RADIOACTIVOS ( 200.000 CPM), EN AUSENCIA (●—●) Y EN PRESENCIA DE ESPERMIDINA 0,3 MILIMOLAR(●), 1 MILIMOLAR(◻), Y 3 MILIMOLAR (△).

Fig.

9



EFFECTO DE LA ESPERMIDINA SOBRE  
LA CINÉTICA DE ELONGACIÓN

FIGURA 10 : INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES 30 S.

EN TRES TUBOS CON MEZCLA DE INCUBACION CONTENIENDO 2,6 UNIDADES DE A 260 NM CADA UNO, DE POLIRRIBOSOMAS, SE AGREGAN: TUBOS A Y B 0,3 UNIDADES DE PARTICULAS 30 S-P 32 DERIVADAS ( D1 ), Y AL TUBO C 0,3 UNIDADES DE PARTICULAS 30 S-P 32 NATIVAS ( N ).  
LOS TUBOS B Y C SE INCUBAN DURANTE 30 MINUTOS A 37 GRADOS C , PERMANECIENDO EL TUBO A COMO CONTROL. SE SIEMBRAN LOS CONTENIDOS DE LOS TUBOS SOBRE GRADIENTES DE SACAROSA LINEALES DE 5-20 % DE 12 ML DE CAPACIDAD Y SE CENTRIFUGAN A 35.000 RPM EN EL ROTOR SW 40 DURANTE 75 MINUTOS. SE FRACCIONAN Y SE MIDE LA RADIOACTIVIDAD EN CADA FRACCION ( ... ), Y LA ABSORBANCIA EN FORMA CONTINUA.

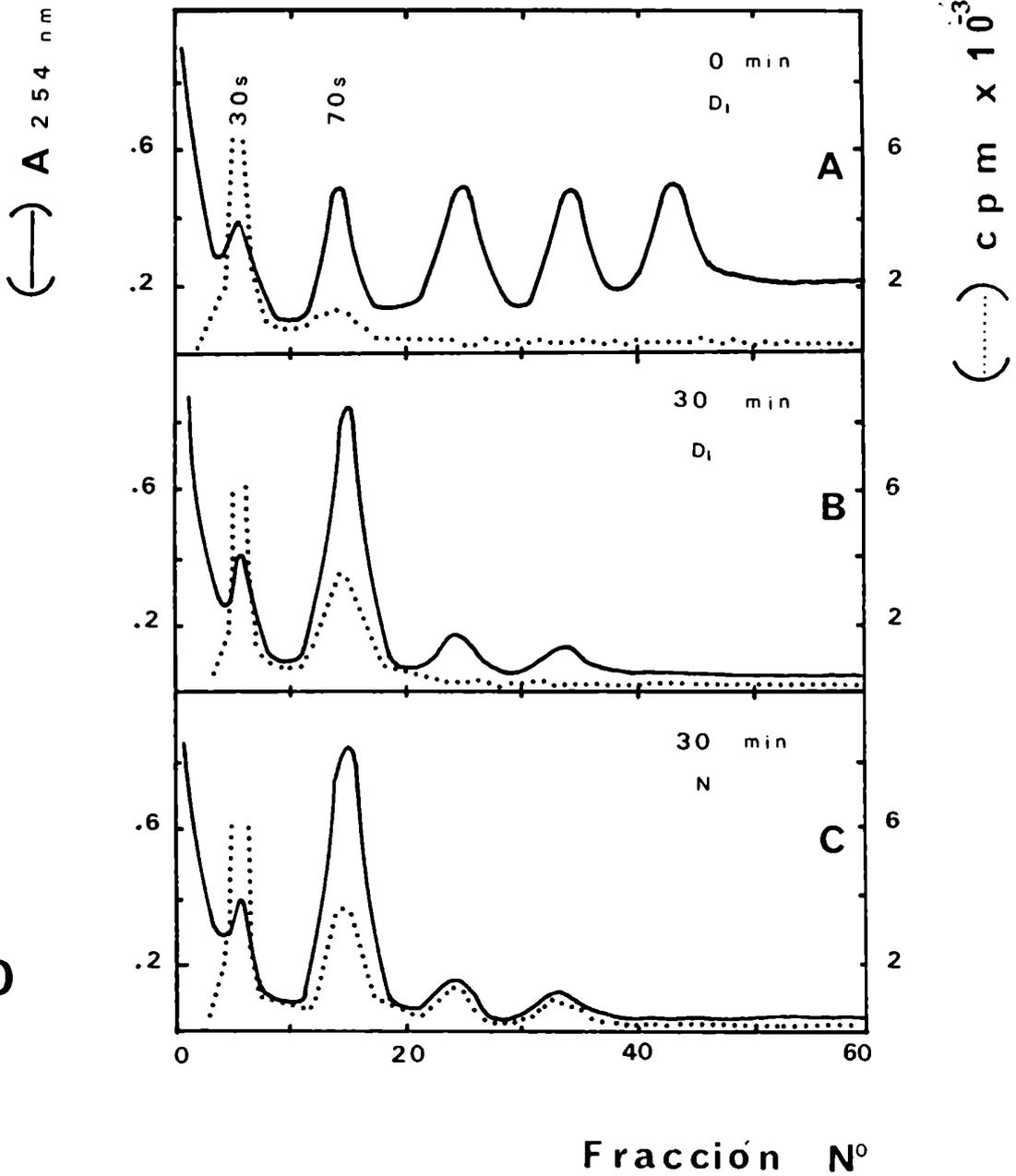


Fig. 10

INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES 30 s

FIGURA 11 \* CINETICA DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES DURANTE Y LUEGO DE LA TERMINACION DE LA SINTESIS PROTEICA.

LA MEZCLA DE INCUBACION ES LA MENCIONADA EN EL TEXTO, CON EL AGREGADO DE 2,7 UNIDADES A 260 NM DE POLIRRIBOSOMAS. LA INCUBACION SE EFECTUO A 37 GRADOS C DURANTE LOS TIEMPOS INDICADOS. EL ANALISIS EN GRADIENTES DE SACAROSA SE REALIZO COMO SE INDICA EN EL TEXTO Y EN FIGURA 10. EL INTERCAMBIO SE EXPRESA COMO EL PORCENTAJE DE RADIOACTIVIDAD QUE SEDIMENTA EN LA FRACCION DE COEFICIENTE DE SEDIMENTACION 70 S EN FUNCION DE LA RADIOACTIVIDAD TOTAL AGREGADA COMO SUBUNIDADES MARCADAS.

(A). LAS SUBUNIDADES 30 S-P 32 SE AGREGARON AL COMIENZO DE LA REACCION, DURANTE LOS TIEMPOS DE INCUBACION INDICADOS, MIDIENDOSE ASI EL INTERCAMBIO OCURRIDO SIMULTANEAMENTE CON LA TERMINACION.

(B). LAS SUBUNIDADES 30 S-P 32 SE AGREGARON 40 MINUTOS DESPUES DE UNA PRIMERA INCUBACION, Y SE CONTINUO INCUBANDO DURANTE LOS TIEMPOS INDICADOS, MIDIENDOSE ASI EL INTERCAMBIO OCURRIDO POSTERIORMENTE A LA TERMINACION.

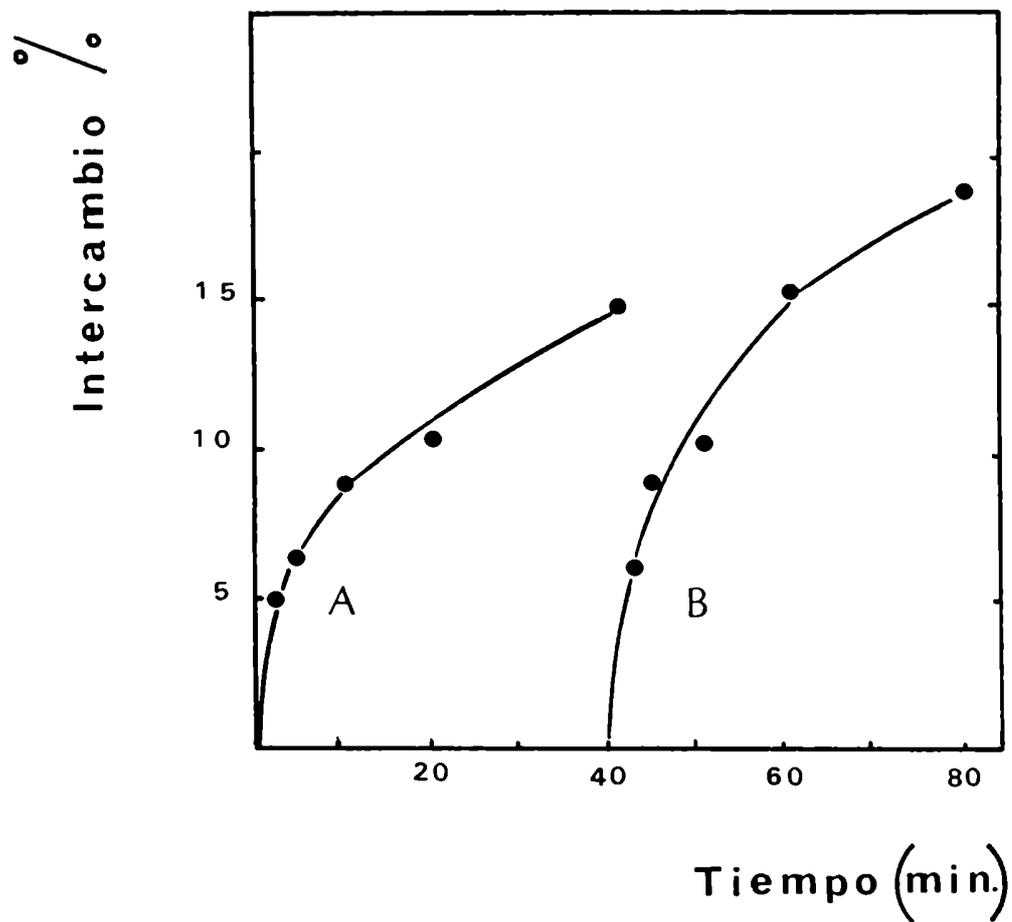


Fig- 11

CINÉTICA DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES DURANTE  
Y LUEGO DE LA TERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE  
PROTEINAS

FIGURA 12 : EFECTO DE LA ESPERMIDINA SOBRE LA CINETICA DE INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES.

LOS ENSAYOS SON IGUALES A LOS DE LA FIGURA 11, CON LA DIFERENCIA DEL AGREGADO DE ESPERMIDINA 1 MILIMOLAR A LA MEZCLA DE INCUBACION.

(A) INTERCAMBIO OCURRIDO SIMULTANEAMENTE CON LA TERMINACION.

(B) INTERCAMBIO OCURRIDO EN LA SEGUNDA INCUBACION, ES DECIR CON POSTERIORIDAD A LA TERMINACION.

EN LINEA DE PUNTOS LA CURVA DE LA FIGURA 11 A FIN DE PODER COMPARAR.

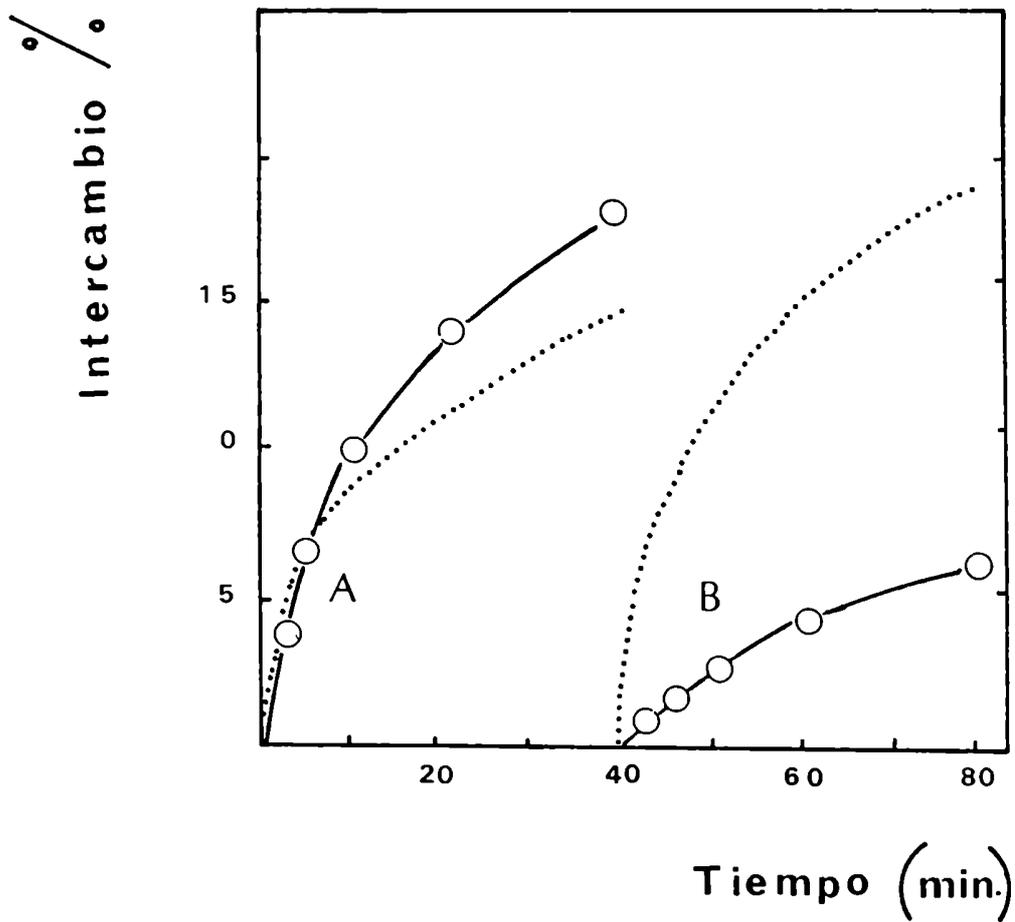


Fig. 12

EFFECTO DE LA ESPERMIDINA SOBRE LA CINÉTICA  
DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES

FIGURA 13 :DISOCIACION DEL HIBRIDO A BAJA CONCENTRACION DE MAGNESIO.

SE EFECTUO EL ENSAYO DE INTERCAMBIO COMO SE EXPLICO EN EL TEXTO, INCUBANDO DURANTE 30 MINUTOS . UNO DE LOS TUBOS (A) SE SEMBRO SIN MODIFICACIONES SOBRE UN GRADIENTE DE SACAROSA DE 5-20 % EN TAMPON 1.

EL OTRO TUBO (B) SE DILUYE ADECUADAMENTE LLEVANDO SU CONCENTRACION DE MAGNESIO A 1 MILIMOLAR SIN ALTERAR SU CONCENTRACION DE POTASIO. SE SIEMBRA EN GRADIENTES DE SACAROSA 5-20 % EN TAMPON 7.

AMBOS TUBOS SE CENTRIFUGAN EN EL ROTOR SW 40 A 35.000 RPM , DURANTE 75 MINUTOS. SE ANALIZAN LOS GRADIENTES Y SE GRAFICA LA ABSORBANCIA A 254 NM ( ——— ), Y LA RADIOACTIVIDAD CONTENIDA EN CADA FRACCION.

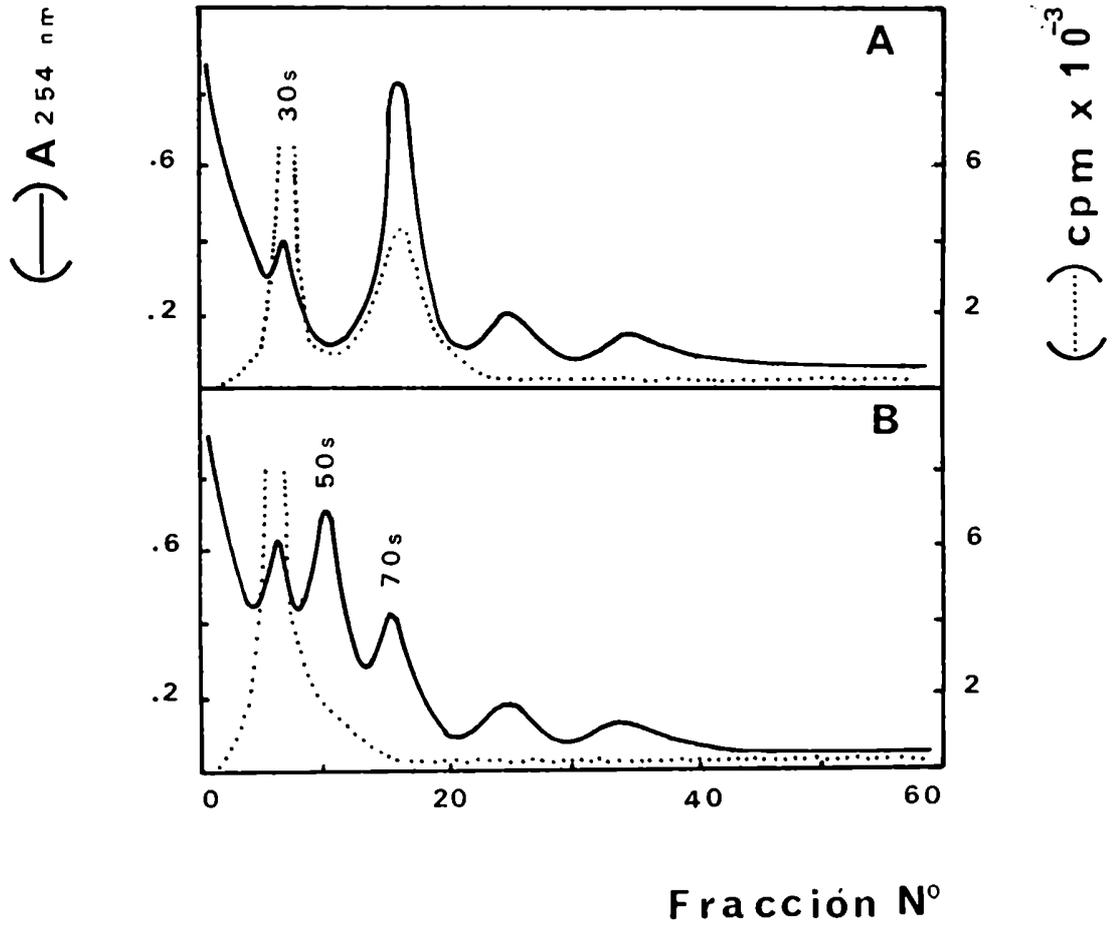


Fig. 13

DISOCIACIÓN DEL HÍBRIDO A BAJA CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO

FIGURA 14: DISOCIACION HIBRIDO POR DISTINTOS FACTORES DISOCIANTES.

SE EFECTUO EL ENSAYO DE INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES COMO SE EXPLICA EN EL TEXTO, EN TUBOS IDENTICOS. A LOS TIEMPOS DE INCUBACION INDICADOS SE AGREGO RNASA (15 UG/ML) O FACTOR DISOCIANTE DE E.COLI (700 UG/ML DE PROTEINA) A ALGUNOS DE LOS TUBOS, LOS QUE SE INCUBARON 15 MINUTOS MAS. (●—●) INTERCAMBIO SIN AGREGADOS. (—●) = RADIOACTIVIDAD REMANENTE EN EL PICO 70 S DEL GRADIENTE LUEGO DEL TRATAMIENTO CON RNASA. (—□) = LA RADIOACTIVIDAD REMANENTE EN LA MISMA REGION LUEGO DEL TRATAMIENTO CON FACTOR DISOCIANTE.

FIGURA 15 : INTERCAMBIO ENTRE PARTICULAS HIBRIDAS Y SUBUNIDADES 30 S NO RADIOACTIVAS.

EL ENSAYO DE INTERCAMBIO SE EFECTUO COMO SE INDICO EN EL TEXTO, CON 0,3 UNIDADES DE A 260 NM DE SUBPARTICULAS 30 S-P 32 ( D1 ). LUEGO DE 20 MINUTOS DE INCUBACION, SE AGREGO 0,9 UNIDADES DE SUBPARTICULAS 30 S NO RADIOACTIVAS A TRES DE LOS TUBOS. LA INCUBACION SE PROSIGUIO COMO SE INDICA, Y SE MIDIO EL INTERCAMBIO. (●—●) INTERCAMBIO SIN AGREGADOS. (■—■) RADIOACTIVIDAD QUE SEDIMENTA EN LA REGION 70 S DEL GRADIENTE LUEGO DEL AGREGADO DE LAS SUBUNIDADES NO MARCADAS.

DISOCIACIÓN DEL HÍBRIDO POR DISTINTOS  
FACTORES DISOCIANTES

Fig. 14

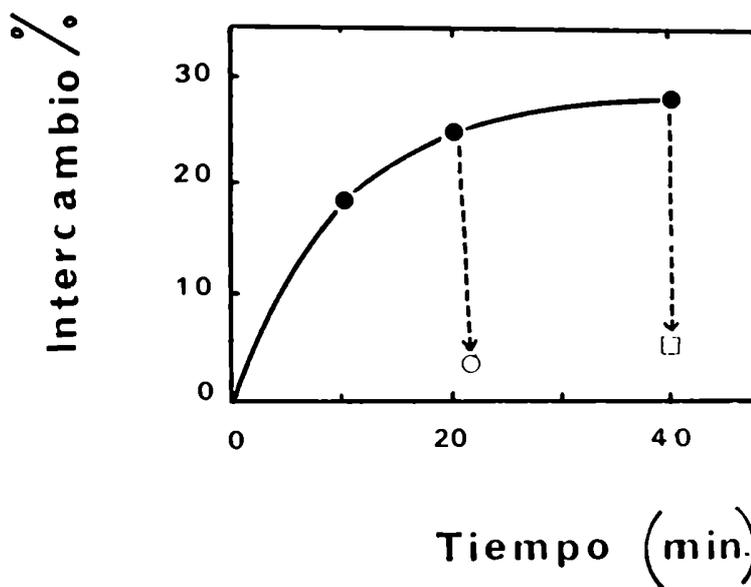
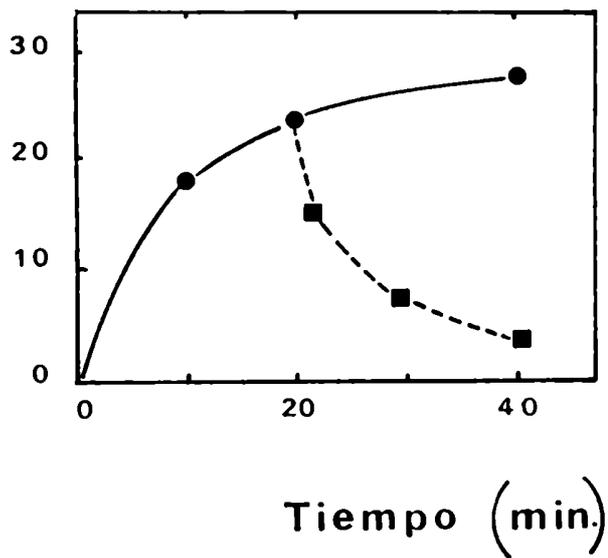


Fig. 15

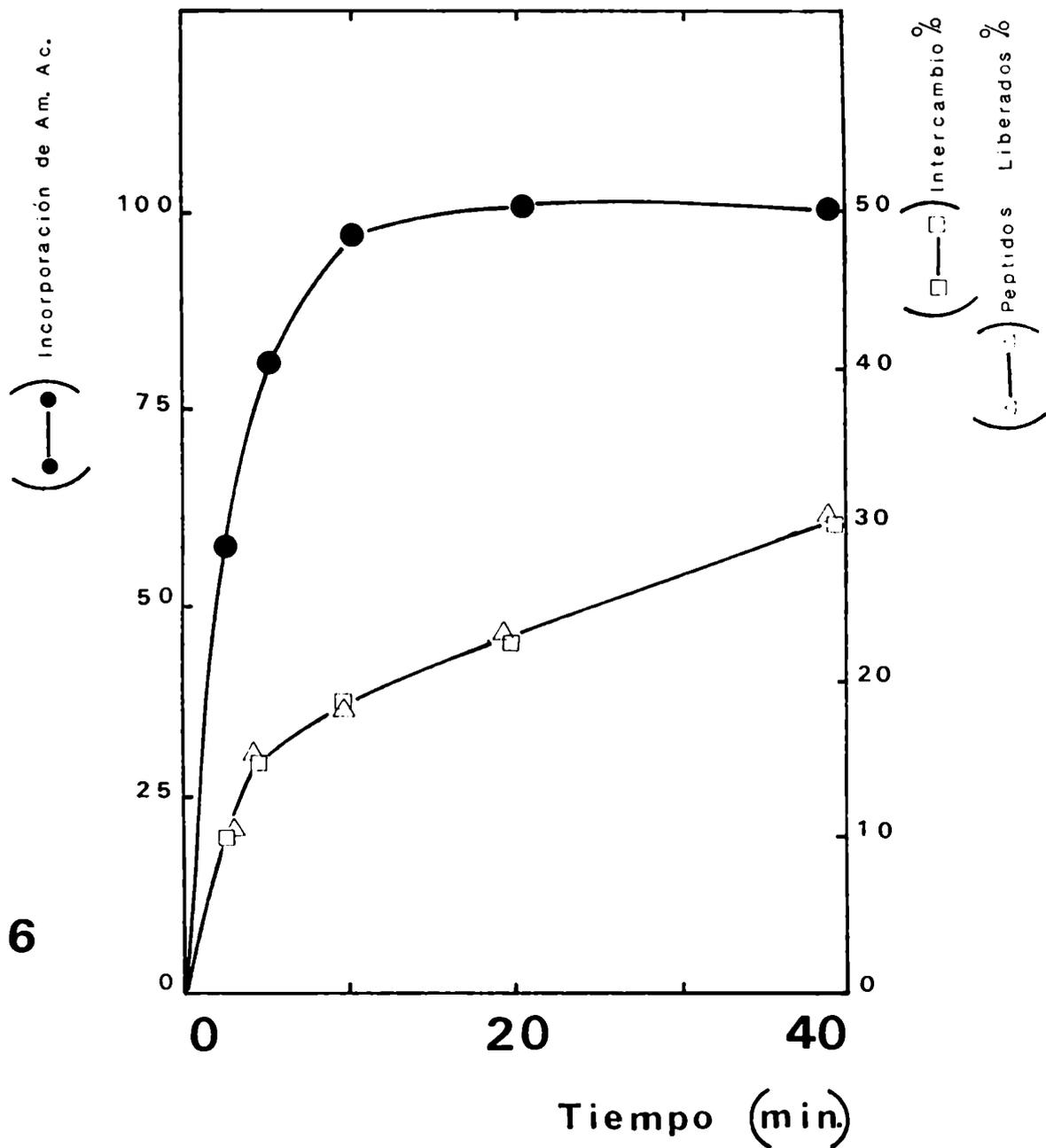


INTERCAMBIO ENTRE PARTÍCULAS 70 s  
HÍBRIDAS Y SUBUNIDADES 30 s NO  
RADIOACTIVAS

FIGURA 16 : VELOCIDADES DE ELONGACION TERMINACION DE POLIPEPTIDOS E INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES.

SE EFECTUAN LOS ENSAYOS RESPECTIVOS EN FORMA PARALELA Y COMO SE DETALLA EN EL TEXTO. LA ELONGACION Y LA TERMINACION SE EXPRESAN COMO PORCENTAJE DE LA MAXIMA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIOACTIVOS (● — ●) : ELONGACION. (▲ — ▲) : TERMINACION. (□ — □) : INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES.

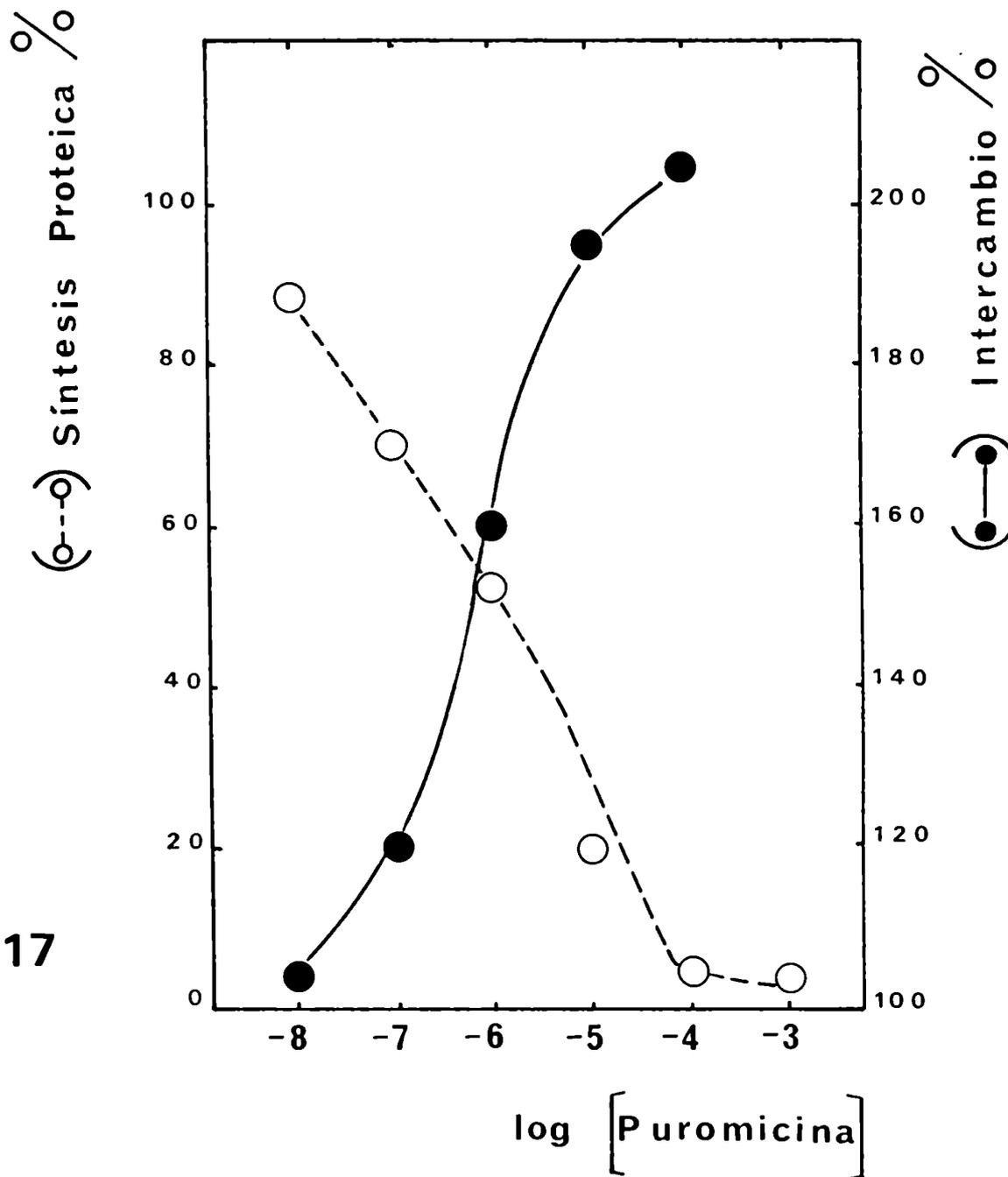
Fig. 16



VELOCIDADES DE ELONGACIÓN Y TERMINACIÓN  
DE POLIPÉPTIDOS E INTERCAMBIO DE SUB-  
UNIDADES



Fig. 17



EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PUROMICINA  
SOBRE EL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES Y LA  
SÍNTESIS PROTEICA

FIGURA 15 KINETICA DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES TERMINACION  
PREMATURA PRODUCIDA POR LA FUROMICINA.

LA MEZCLA DE INCUBACION ES LA MENCIONADA EN EL TEXTO, AGREGAR  
SE FUROMICINA EN UNA CONCENTRACION DE 1/2 MILIMOLAR.

(A). INTERCAMBIO MEDIDO DURANTE LA LIBERACION PREMATURA DE LOS PEPTIDOS  
POR ACCION DE LA FUROMICINA.

(B). INTERCAMBIO MEDIDO LUEGO DE UNA PRIMERA INCUBACION CON FUROMICINA,  
HAYENDOSE AGREGADOS SUBUNIDADES RADIOACTIVAS DIEZ MINUTOS DESPUES EN UNA  
SEGUNDA INCUBACION SE MIDIO ASI EL INTERCAMBIO POST LIBERACION DE  
PEPTIDOS.

● SIN ESPERMIDINA. ○ ) CON ESPERMIDINA 1 MILIMOLAR.

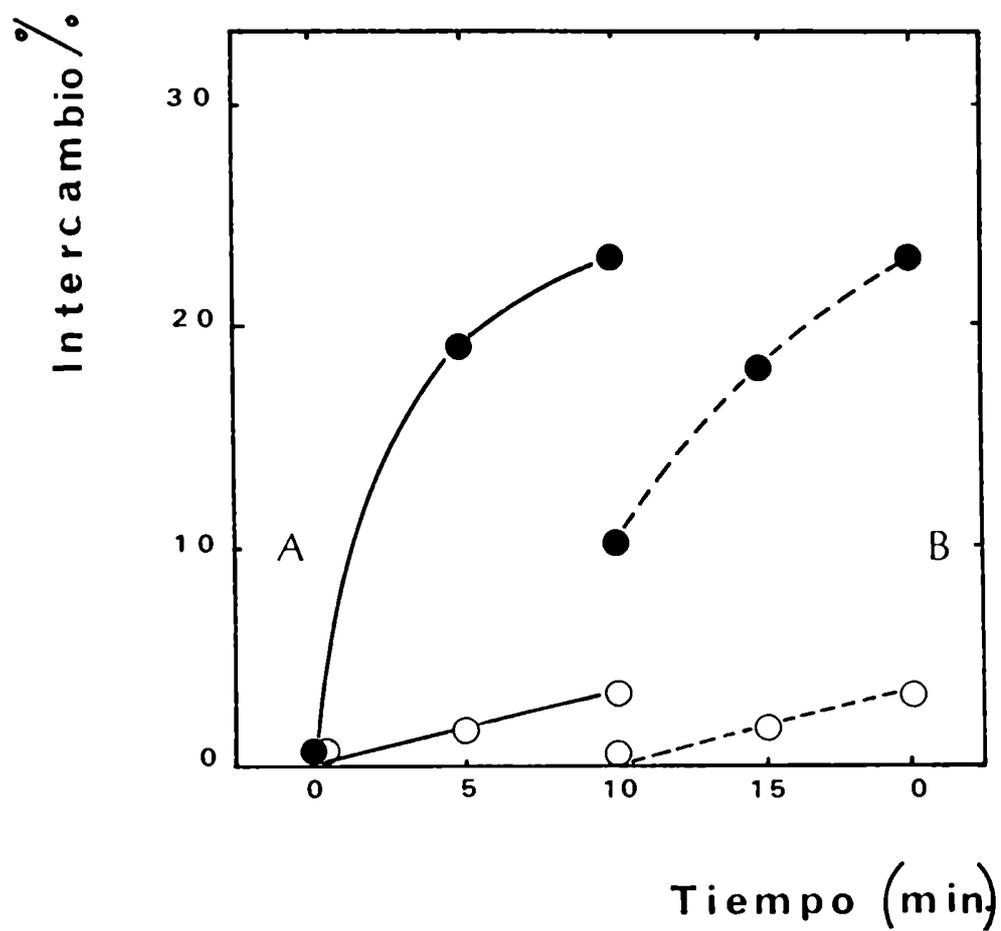


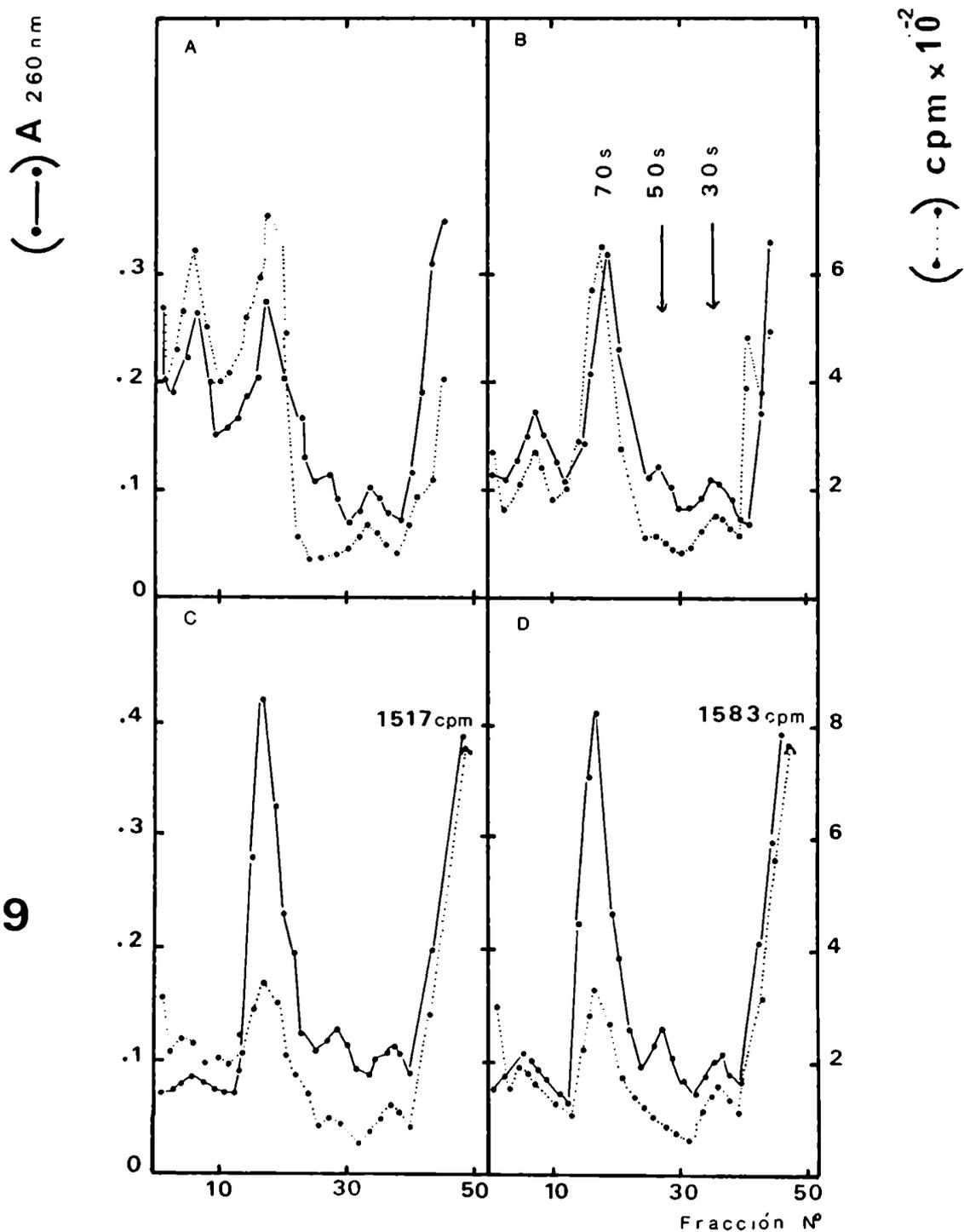
Fig. 18

CINÉTICA DEL INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES  
 EN LA TERMINACIÓN PREMATURA PRODUCIDA  
 POR LA PUROMICTINA

MEZCLA DE INCUBACION ES LA DESCRIPTA EN EL TEXTO EN LA CLAS. POLIRIBOSOMAS (1:7 UNIDADES A 260 NM) ESTAN MARCADAS CON P 32 EN EL RNA MENSAJERO. LAS MEZCLAS FUERON INCUBADAS COMO SE INDICA A CONTINUACION, ENFRIADAS, CENTRIFUGADAS SOBRE GRADIENTES LINEALES DE DENSIDAD DE 5-20% DE 4.4 AL 10% DE CAPACIDAD. SE CENTRIFUGARON DURANTE 70 MINUTOS A 50,000 RPM EN EL ROTOR SW 65 Y SE FRACCIONARON. SE MIDIO EN CADA FRACCION LA A 260 NM Y LA RADIOACTIVIDAD.

MEZCLA COMPLETA A 0 GRADOS C. B. INCUBACION A 37 GRADOS C. DURANTE 15 MINUTOS. C. IGUAL QUE EN B EN PRESENCIA DE PUROMICINA 1/2 MILIMO. D. IGUAL QUE EN B EN PRESENCIA DE 1/2 MILIMOLAR DE PUROMICINA, 1 MILIMOLAR DE ESPERMIDINA.

Fig. 19



DESACOPLAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS RIBOSOMALES DEL m-RNA DURANTE LA TERMINACIÓN FISIOLÓGICA Y A CONSECUENCIA DE LA LIBERACIÓN PREMATURE DE PÉPTIDOS



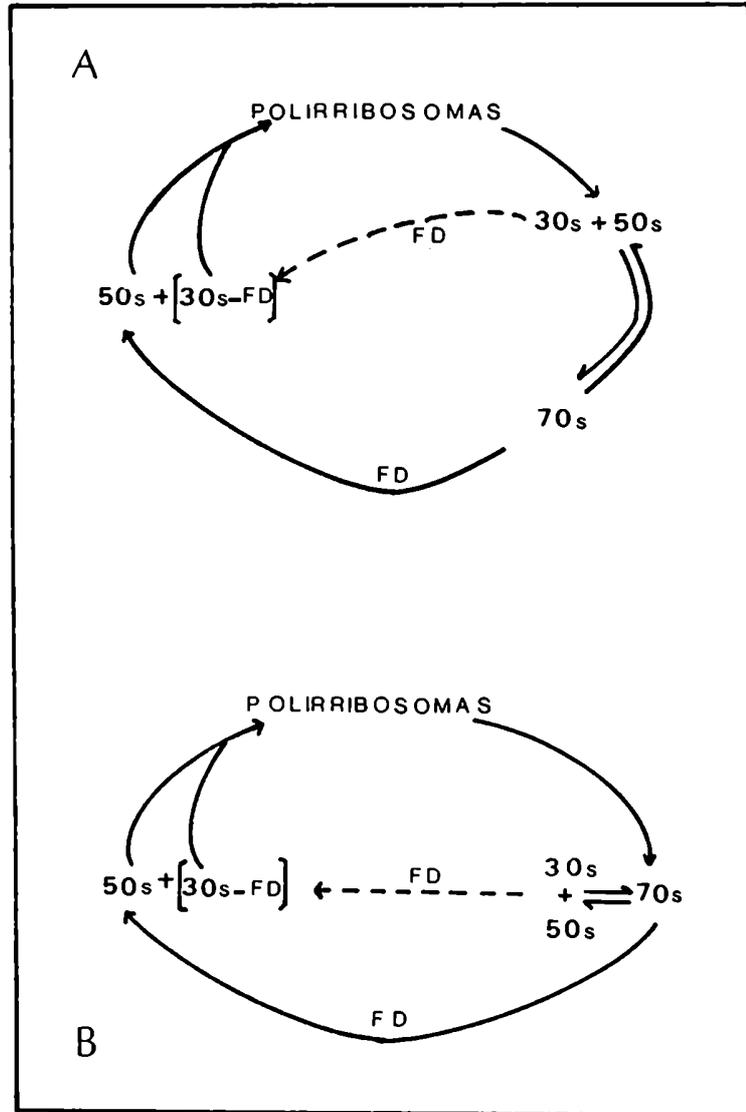


Fig. 20

DOS MODELOS POSIBLES PARA EL CICLO RIBOSOMAL



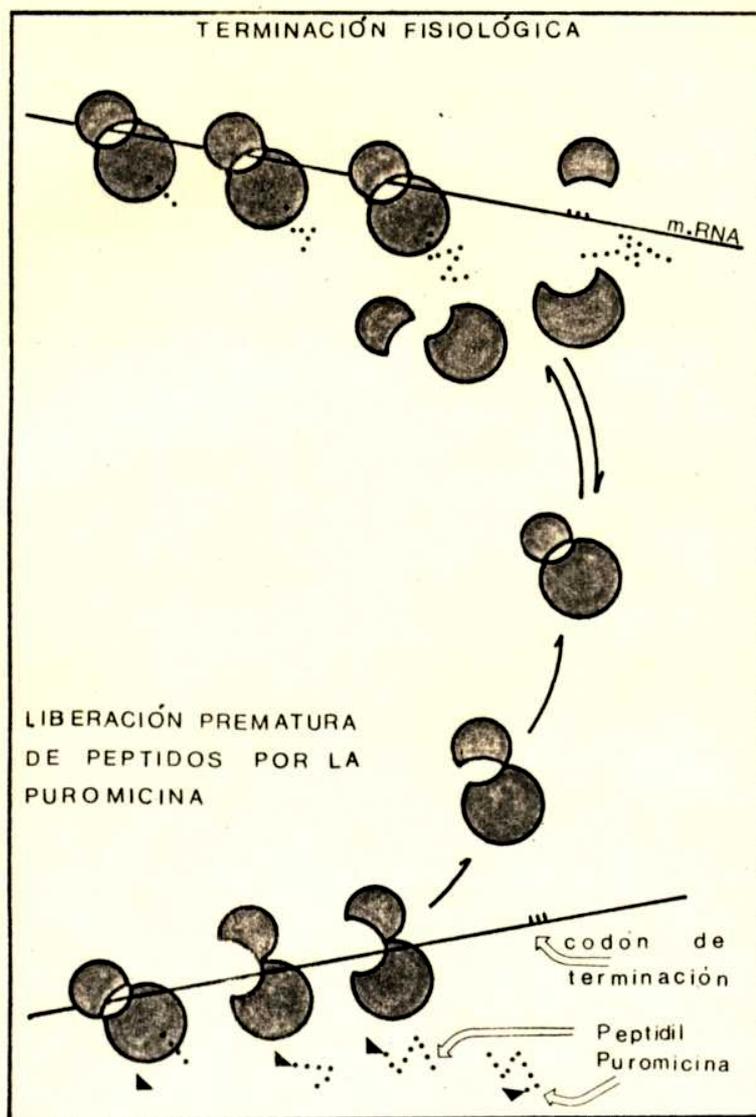


Fig. 21

DESACOPLAMIENTO RIBOSOMAL  
MODELO PROPUESTO