

Tesis de Posgrado

Control de la síntesis proteica durante la estimulación de linfocitos humanos : Función de las poliaminas

Ferrer, Marcela María

1984

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

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

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

Cita tipo APA:

Ferrer, Marcela María. (1984). Control de la síntesis proteica durante la estimulación de linfocitos humanos : Función de las poliaminas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1868_Ferrer.pdf

Cita tipo Chicago:

Ferrer, Marcela María. "Control de la síntesis proteica durante la estimulación de linfocitos humanos : Función de las poliaminas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1868_Ferrer.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CONTROL DE LA SINTESIS PROTEICA DURANTE LA ESTIMULACION
DE LINFOCITOS HUMANOS. FUNCION DE LAS POLIAMINAS

AUTOR: Bioq. Marcela Marfa Ferrer

DIRECTOR: Dr. Israel D. Algranati

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

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1984

- 1868 -
ej. 2

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Israel D. Algranati, cuyas enseñanzas, constante estímulo e intensa dedicación en la dirección de este trabajo fueron fundamentales para su concreción.

Al Dr. Carlos E. Cardini, Consejero de Estudios, por haber contribuído con singular interés a mi formación.

Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

A los Dres. Nélide S. González y Manuel García Patrone, quienes me alentaron diariamente con sus consejos y amistad.

A los Dres. Estela E. Medrano y Oscar R. Burrone por sus sugerencias, discusiones y críticas.

A los profesores, colegas y amigos del I.I.B. por su apoyo y por los gratos momentos compartidos durante estos años.

A Eduardo Cafferata por su eficiente y responsable colaboración técnica.

Al Dr. Luis Garnek, Director del Banco de Sangre "Luis Agote" - CORDIC - por el suministro de muestras de sangre; a

Sandra Santisi y Gerardo Lukawecki por su desinteresada colaboración.

A Soledad Gimenez, Margarita Mazzardi, Hilda Gasparoli y Francisco Irusta por su dedicación.

A Norberto Malarini por su constante predisposición y excelente realización de los dibujos.

A la Sra María Dolores Turró, quien con paciencia y dedicación transcribió esta tesis.

ABREVIATURAS

aa:	aminoácido.
aa-tRNA:	ácido ribonucleico aminoacilado.
ADP:	adenosina difosfato.
ATA:	ác. aurintricarboxílico.
ATP:	adenosina trifosfato.
CAP:	estructura del tipo m^7GpppN^m del extremo 5' de los mRNAs.
CBP:	proteínas que se unen al CAP.
ConA:	concanavalina A.
DNA:	ác. desoxirribonucleico.
D.O.:	densidad óptica.
eEF:	factor de elongación de eucariotes.
eIF:	factor de iniciación de eucariotes.
ES ₁ :	espermidina sintasa.
ES ₂ :	espermina sintasa.
FHA:	fitohemoaglutinina.
GDP:	guanosina difosfato.
GTP:	guanosina trifosfato.
Hy:	hypusina.
IL:	interleuquina.
IT:	inhibidor de traducción.
kDa:	kilodaltons.
MGBG:	metilglioxal-bis-guanilhidrazona.

mRNA:	ác. ribonucleico mensajero.
mRNA-CAP(+):	ác. ribonucleico mensajero con CAP.
mRNA-CAP(-):	ác. ribonucleico mensajero sin CAP.
ODC:	ornitina decarboxilasa.
PABP:	proteínas que se unen al poli(A).
PMSF:	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
PO:	poliamino oxidasas.
Poli(A):	ác. poliadenílico.
Poli(G):	ác. poliguanílico.
Poli(U):	ác. poliuridílico.
RF:	factor de liberación ("releasing factor").
rRNA:	ác. ribonucleico ribosomal.
SAMDC:	S-adenosilmetionina decarboxilasa.
TCA:	ác. tricloroacético.
tRNA:	ác. ribonucleico de transferencia.
tRNA _f :	ác. ribonucleico de transferencia específico para el codón de iniciación.
U:	unidades.
40S:	subunidad ribosomal.
60S:	subunidad ribosomal.
80S:	ribosoma (monómero).

INDICE

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
1. <u>SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES</u>	9
1.1. Mecanismo	11
1.1.1. Iniciación	11
1.1.1.1. Formación de un complejo ternario	15
[eIF-2 • GTP • Met-tRNA_i]	15
1.1.1.2. Transferencia del complejo ternario a la subunidad 40S: complejo de 43S	18
1.1.1.3. Unión ("binding") del mRNA y formación del complejo de 48S	21
A) Estructura del mRNA	22
B) Requerimientos de factores proteicos	31
C) Hidrólisis del ATP.	36
1.1.1.4. Unión de la subunidad 60 S para formar el complejo de iniciación 80S	41
1.1.2. Elongación	42

1.1.3. Terminación	45
1.2. Regulación de la síntesis de proteínas	46
1.2.1. Control de la iniciación por quinasa del tipo eIF-2	47
1.2.2. Degradación de mRNAs que opera a través de endorribonucleasas	49
A) Endorribonucleasa activada por RNAdc	49
B) Otros tipos de ribonucleasas	50
1.2.3. Selección de mensajeros	50
1.2.4. Modulación por ácidos ribonucleicos	52
1.2.5. Interferón	53
2. <u>POLIAMINAS</u>	57
2.1. Biosíntesis de poliaminas en eucariotes	58
2.2. Inhibidores de la biosíntesis de poliami- nas	61
3. <u>LINFOCITOS</u>	63
3.1. Heterogeneidad de la población de lin- focitos periféricos	63
3.2. Activación de linfocitos	65
3.2.1. Agentes mitogénicos: Su interacción con la membrana	65
3.2.2. Eventos bioquímicos relacionados	

con la estimulación de linfocitos	68
A) Alteraciones de la permeabilidad de la membrana	68
B) Alcalinización intracelular	69
C) Biosíntesis de poliaminas	70
D) Síntesis de proteínas	71
E) Síntesis de RNA	75
F) Síntesis de DNA y ciclo celular	77
4. <u>OBJETIVOS DEL TRABAJO</u>	78
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	80
1. Reactivos	80
2. Purificación y cultivo de linfocitos	81
3. Medios de cultivo	82
4. Incorporación "in vivo" de timidina-(³ H) en DNA	83
5. Incorporación "in vivo" de aminoácidos radioac- tivos en proteínas	84
6. Preparación de fracciones subcelulares de lin- focitos y de I.T.	85
7. Preparación de extracto de germen de trigo (S23)	86
8. Síntesis "in vitro" de polifenilalanina	90

9. Preparación de polisomas de hígado de rata o cobayo	90
9.1. Preparación de la fracción de alta velocidad (S ₁₅₀) de hígado de rata	91
9.2. Purificación parcial de la fracción S ₁₅₀	91
9.3. Preparación de polisomas (libres y unidos a membrana) a partir de hígado de rata o cobayo	92
10. Síntesis "in vitro" dirigida por mensajeros endógenos de hígado de rata	95
11. Obtención de RNA ribosomal (rRNA) de germen de trigo	96
12. Análisis mediante gradientes de sacarosa	98
12.1. Sedimentación y análisis de polirribosomas	98
12.2. Sedimentación y análisis de RNA ribosomal	99
III. <u>RESULTADOS</u>	100
1. Caracterización del sistema de linfocitos: condiciones de estimulación	100
1.1. Concentración del mitógeno	101
1.2. Requerimientos del suero	101

1.3. Velocidad de síntesis de DNA	104
2. Inhibidor de traducción (IT) obtenido de linfocitos en reposo	105
2.1. Caracterización	105
2.1.1. Efecto del lavado ribosomal sobre la traducción en sistemas heterólogos	105
2.1.2. Efecto de la fracción post ribosomal sobre la traducción	107
2.2. Propiedades	107
2.2.1. Estudios sobre la naturaleza del factor	107
A) Sensibilidad a la temperatura	107
B) Acción de proteasas	110
C) Acción de nucleasas	113
D) Tratamiento con sulfato de amonio	114
E) Tratamiento con ácido tricloroacético	116
F) Tratamiento alcalino	117
G) Fenolización de la fracción S150	118
H) Efecto del agregado de sulfato de protamina	121

2.2.2. Comportamiento del inhibidor de traducción en sistemas de fraccionamiento convencionales	122
A) DEAE-celulosa y "Sephadex" G-75	122
B) DEAE-celulosa y fosfocelulosa	125
C) Hidroxiapatita	129
D) rRNA-celulosa	130
2.2.3. Mecanismo de acción del inhibidor de traducción	132
A) Efectos sobre la cinética de traducción "in vitro" de Poli(U)	132
B) Efectos sobre la traducción de polisomas de hígado de rata	136
C) Actividad nucleolítica del inhibidor de traducción	136
3. Inhibición de la biosíntesis de poliaminas: su efecto sobre la proliferación de linfocitos	144
3.1. Efecto del agregado de distintas concentraciones de DFMO y MGBG sobre la síntesis de macromoléculas	146
3.2. Efecto del agregado de DFMO a distintos tiempos durante la estimulación de linfocitos	148
A) Sobre la síntesis de DNA	148

B) Sobre la síntesis de proteínas	150
3.3. Efecto del agregado de DFMO a diferentes tiempos antes de iniciar la estimulación con FHA	152
A) Efecto sobre la síntesis de DNA	152
B) Sobre la síntesis de proteínas	152
3.4. Efecto del agregado de MGBG a diferentes tiempos durante la estimulación de lin- focitos	155
A) Sobre la síntesis de DNA	155
B) Efecto sobre la síntesis de proteínas	155
3.5. Efecto del agregado de putrescina a distintos tiempos durante la estimulación de linfocitos en presencia de DFMO	158
A) Síntesis de DNA	158
B) Síntesis de proteínas	158
3.6. Efecto sobre la síntesis de DNA del agre- gado de putrescina a diferentes tiempos durante la estimulación de linfocitos cultivados en presencia de MGBG	162
IV. <u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	164

REFERENCIAS

I. INTRODUCCION

Los eventos que conducen a la expresión de la información genética y sus mecanismos de control son mucho menos conocidos en eucariotes que en procariotes. No es sencillo determinar a qué nivel o niveles se regula la síntesis de una proteína específica; ello requiere conocer en forma precisa la velocidad de síntesis de la proteína y la cantidad de mRNA que la codifica.

En células de eucariotes el núcleo y el citoplasma son estructuras ordenadas y complejas y la producción de un mRNA en dichas células no es simplemente el resultado de la transcripción de un gen. Por otra parte, en células de eucariotes diferenciadas en estado de reposo o de crecimiento lento, los requerimientos fundamentales para cumplir con el programa genético son totalmente diferentes a los de células bacterianas rápidamente adaptables. Estos hechos llevaron a sugerir que el control de la expresión de la información genética en eucariotes debe ser diferente al de procariotes (1). Se ha demostrado que este control en eucariotes no sólo es diferente sino incluso más complejo, existiendo una mayor variedad de mecanismos de regulación (2) que incluyen las siguientes posibilidades:

a) Transcripción: a diferencia de lo que ocurre en

procariotes donde la transcripción es el principal sitio de regulación de la expresión genética, en eucariotes constituye sólo el primer sitio de control. Existen varios mecanismos de regulación que incluyen la elección de la RNA polimerasa ya que, en eucariotes, existen tres: I (para rRNA) (3), II (para mRNA) (3,4,5) y III (para tRNA) (3). El principal punto de control transcripcional es la iniciación de la transcripción, y está mediada por la unión sitio-específica de proteínas que cambian la estructura de la cromatina o directamente facilitan o impiden la adhesión de la RNA polimerasa a sitios específicos del DNA (6). Este tipo de control existe en células de vertebrados (7,8,9,10), células infectadas por virus (11,12,13) y en eucariotes inferiores como las levaduras (14,15). En estos organismos la vida media de los mRNA es muy corta y por lo tanto es muy probable que la regulación de la velocidad de síntesis de proteínas se deba fundamentalmente al control de la velocidad de transcripción.

Aunque existen evidencias de frecuentes terminaciones prematuras (5), hasta el momento se ha descrito un solo caso de terminación diferencial de la transcripción, en adenovirus (16,17,18), por lo cual no puede decirse que sea un mecanismo común de control.

Debe tenerse en cuenta que el control transcrip-

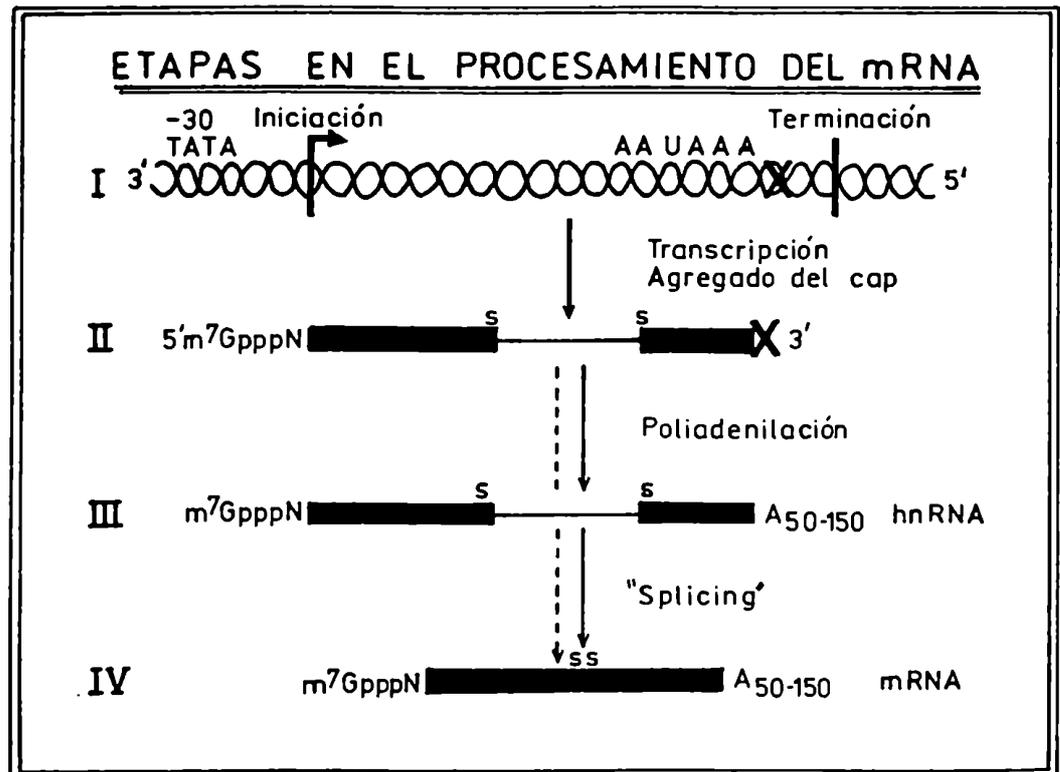
cional para un gen particular no excluye otros niveles de control.

b) Procesamiento del RNA: se denomina así a la secuencia de eventos que convierten al RNA transcripto primario en mRNA maduro y que se esquematiza en la Fig. 1. Las unidades transcriptas pueden dividirse en dos grupos: simples y complejas. En la Fig. 2, se ejemplifican ambos tipos y se indican además las modificaciones que pueden tener lugar en cada caso. En el caso de transcriptos complejos se han postulado dos tipos de regulación del procesamiento:

1) Procesamiento diferencial: durante el cual el transcripto puede ser procesado en más de una forma diferente porque contiene varios sitios de poliadenilación o varios sitios de "splicing". Se ha demostrado este tipo de regulación para adenovirus (17,19), para la síntesis de la cadena pesada μ , tanto en la síntesis de inmunoglobulinas como en la secuencia normal de eventos durante la diferenciación de linfocitos [(20,21) y para la fibronectina humana (22).

2) La decisión procesamiento versus descarte (recientemente postulada) (1): en este tipo de control, un transcripto primario podría no ser procesado o ser poco procesado en un determinado tipo celular o en una célula en condiciones fisiológicas particulares, pero procesado correctamente en

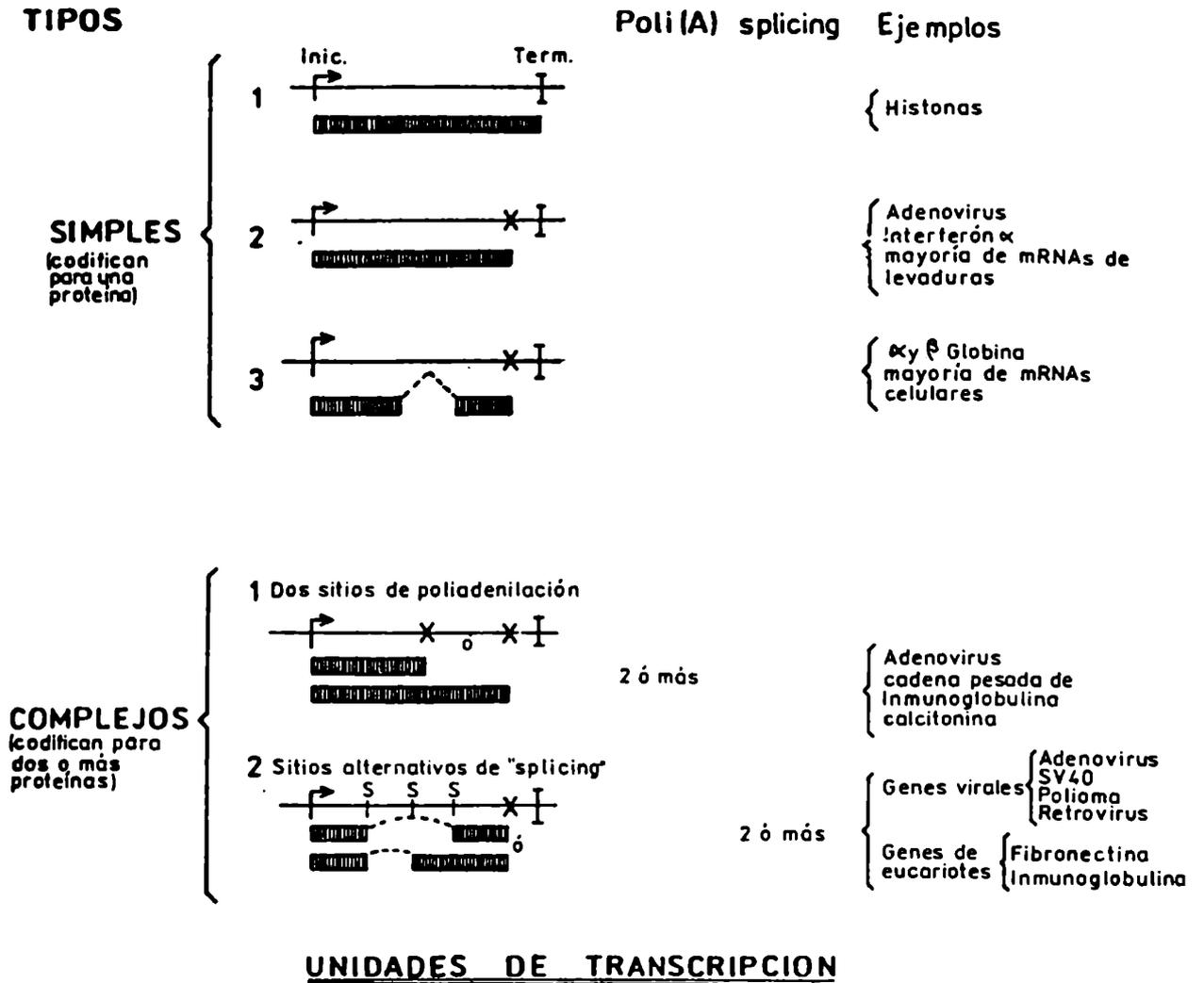
Figura 1:



X: Sitio de poliadenilación (requiere ruptura endonucleolítica).
 s: Sitio de "splicing" (puede ocurrir en ausencia de poliadenilación).

--->: Metilación: Ocurre entre los Pasos II-IV.

Figura 2:



UNIDADES DE TRANSCRIPCIÓN

: Iniciación.
 : Terminación.
 : Sitio de poliadenilación. : Sitio de "splicing".

otro tipo celular o bajo diferentes condiciones fisiológicas. Los candidatos posibles para este tipo de control serían las células en cultivo y los tejidos. Este mecanismo de regulación ha sido postulado en base al recambio de RNA nuclear (23) y a la mayor complejidad del RNA nuclear comparada con la del mRNA (24). Además, en células en cultivo aunque todos los transcriptos contienen CAP (25) y más del 90% de los mRNA-CAP(+) recién sintetizados que son activamente traducidos contienen en su extremo 3' un fragmento de ácido poliadenílico (poli(A)) (26), en el núcleo la poliadenilación tiene lugar solamente sobre el 25% del total de transcriptos primarios (26).

En el caso de transcriptos simples (codifican para una sola proteína) el procesamiento diferencial no tiene lugar pero sería posible el segundo tipo de control.

c) Transporte del mRNA del núcleo al citoplasma: se conoce muy poco acerca del transporte del mRNA del núcleo hacia el citoplasma como para sugerir la existencia de un transporte diferencial.

d) Estabilidad del mRNA: existen dos mecanismos de control posibles:

1) Diferencia en la vida media de diferentes mRNAs en un mismo tipo celular, lo que le permite a la célula acumular concentraciones diferenciales de dos mensajeros aunque la

velocidad de síntesis de ambos sea igual, como ocurre en adenovirus (16), durante la diferenciación eritroblástica en mamíferos (27), y durante el desarrollo de "Dictyostelium discoideum" (28).

2) Diferente vida media para un mismo mensajero en un mismo tipo celular bajo diferentes condiciones, como ocurre en el tejido mamario en presencia o no de hormonas (29).

e) Síntesis de proteínas: la síntesis proteica cuyo mecanismo es virtualmente idéntico en todos los organismos, es una de las etapas fundamentales de la expresión genética. Aunque la maquinaria celular responsable de la síntesis proteica ha sido altamente conservada y la mayoría de los trabajos realizados en esta área sugieren que los controles a nivel de la traducción estarían involucrados en el "ajuste fino" de la expresión genética, aún no se han aclarado aspectos claves de su regulación. Dado que el objetivo de esta tesis es el estudio de los mecanismos de control de la síntesis de proteínas, esta etapa será analizada en mayor detalle más adelante.

f) Procesamiento de las proteínas: el control post-traducciona l determina la concentración final de la proteína particular en una célula determinada, ya que puede determinar la vida media de las distintas proteínas. Estos procesamientos pueden incluir proteólisis, metilación,

hidroxilación, glicosilación o la adición diferencial de grupos prostéticos a un mismo polipéptido.

1. SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES

Aunque el mecanismo de síntesis de proteínas en eucariotes es básicamente el mismo que en procariotes, existen diferencias significativas entre ambos. Las principales características del sistema de eucariotes que lo diferencian del de procariotes son las siguientes:

La traducción es un evento separado en el tiempo y en el espacio de la transcripción.

La maquinaria central de la traducción, el RIBOSOMA, es considerablemente de mayor tamaño y más complejo en su estructura proteica (Tabla 1, 30).

El número de factores proteicos requeridos para la iniciación es mayor.

El mRNA es monocistrónico y su vida media más larga.

AUG es el codón exclusivo de iniciación.

La mayoría de los mensajeros de eucariotes presentan en su extremo 5' un residuo 7-metilguanosina (m^7G) unido por un puente 5'-5'trifosfato al primer nucleótido del mRNA,

Tabla 1: Tamaño y composición de ribosomas de eucariotes

FUENTE		CITOPLASMA DE EUCARIOTES	
		Levaduras (30,31,32)	Eucariotes superiores (30,31,32)
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	Su bu nidad menor	40S	40S
	Su bu nidad mayor	60S	60S
	Monómero	80S	80S
NUMERO DE PROTEINAS	Su bu nidad menor	30-32	31
	Su bu nidad mayor	41-44	49
RNA ribosomal (rRNA)	Su bu nidad menor	18S	18S
		25S-26S	28S
	Su bu nidad mayor	5S	5S
		5,8S	5,8S

1.1. Mecanismo

La traducción de un mRNA para dar una proteína se realiza por polimerización enzimática de los aminoácidos sobre la superficie del ribosoma de una manera ordenadamente secuencial, según la información contenida en el mRNA. El dador de aminoácidos es el aminoacil-tRNA (AA-tRNA), cuya síntesis tiene lugar por medio de una reacción enzimática extrarribosomal.

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

1.1.1. Iniciación

La iniciación de la síntesis de proteínas se define como la secuencia de eventos que conducen a la formación de un complejo ternario $[80S \cdot \text{Met-tRNA}_i \cdot \text{mRNA}]$: el COMPLEJO DE INICIACION, cuya formación requiere energía y factores de iniciación (33).

Durante los últimos años se han purificado entre 8 y 10 factores de iniciación a partir de reticulocitos de conejo (33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44), hígado de rata (45,46), hígado bovino (35,47), células HeLa (49,50), células del tumor ascítico de Krebs II (39,51,52,53), "Artemia salina" (54) y germen de trigo (55,56,57,58). En la Tabla 2 se resumen los factores caracterizados hasta este momento, su P.M. y su función (en el caso de ser conocida).

Aunque aún existe desacuerdo sobre el número y las funciones de los factores de iniciación, se acepta que la reacción de iniciación procede a través de cuatro pasos intermedios:

1.1.1.1. Formación de un complejo ternario



1.1.1.2. Transferencia del complejo ternario a la subunidad 40S: complejo de 43S

1.1.1.3. Unión ("binding") del mRNA y formación del complejo de 48S

1.1.1.4. Unión de la subunidad 60 S ; ara formar el complejo de iniciación 80S

En la Fig. 3 se esquematiza el ensamblado del complejo de iniciación y el papel de los factores que participan de la reacción "in vitro". Este esquema supone la reutilización de los factores, pero hasta el momento solo se

Tabla 2: Factores de iniciación.

Factor	PM (kDa)	Función	Fuente	Ref.
eIF-1	12-15	Estimula la formación del complejo de 43S. Estabiliza al complejo de 43S y al de 48S (coordina la interacción codón-anticodón).	Reticulocitos de conejo	33,34,42
eIF-2	Nativo 144 Subunidades: α: 32 β: 52 γ: 54	Interviene en la formación del complejo ternario (eIF-2.GTP. Met-tRNA ⁱ) necesario para la formación del complejo de 43S.	Ret. de conejo Hígado bovino Hígado de rata Cél. Hela Cél. Ascíticas	33,34,37,41,43,35,46,49,50,51
eIF-3	Nativo 700*	Estabilización del complejo de 43S. Actividad antiasociante y/o disociante del ribosoma 80S (excepto para los sistemas de germen de trigo e hígado bovino).	Ret. de conejo Cél. Ascíticas Cél. Hela Hígado de rata Hígado bovino Germen de trigo	33-36,43,36,39,49,45,47,48,55,56,59
eIF-4	A:44-46 B:80-85 C:17,5-19 D:16-18 E:24 (CBPI) F:CBPII	Unión del mRNA a la subunidad 40S para formar el complejo de 48S.	Ret. de conejo Cél. Hela Hígado de conejo	33-35,40,42,44,57,49,40
eIF-5	125-160	Unión de la subunidad para dar el complejo de iniciación 80S. Hidrólisis de GTP. Liberación de los factores de iniciación asociados al complejo de 48S.	Ret. de conejo Cél. Hela Cél. Ascíticas	33-35,42,43,49,51
eIF-6	23-25	Mantiene la concentración de subunidades 40S/60S Antiasociante uniéndose a la subunidad 60S	Germen de trigo Hígado bovino	55,47

*No se ha determinado en forma concluyente el número y la estequiometría de sus componentes.

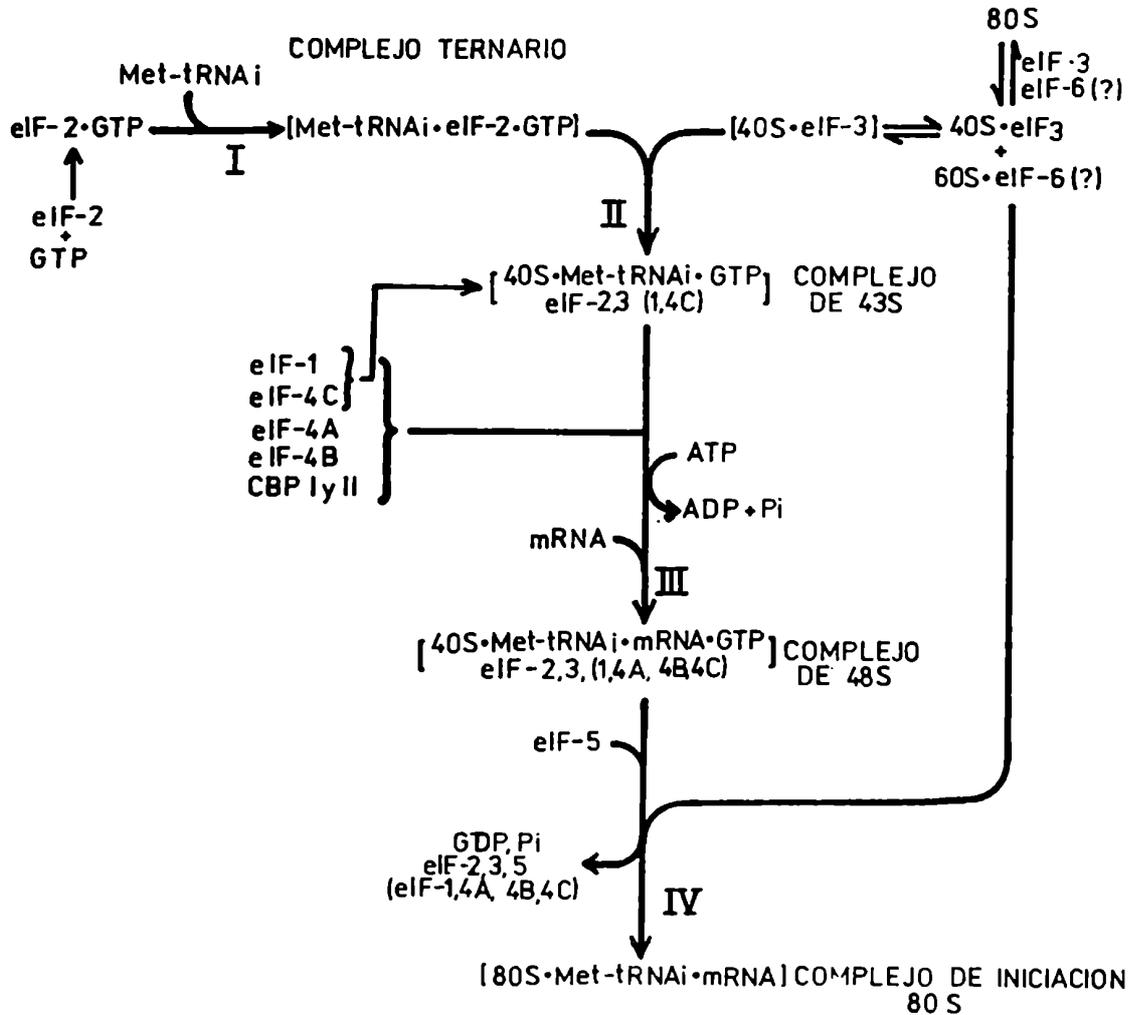


Fig. 3: Mecanismo de iniciación de síntesis de proteínas.

ha demostrado que eIF-2 y eIF-3 son reutilizados catalíticamente, lo cual sugiere que algún otro componente puede ser limitante o estar ausente.

1.1.1.1. Formación del complejo ternario:



La estructura, propiedades y función reguladora del factor eIF-2 ha sido uno de los aspectos más estudiados de la etapa de iniciación durante los últimos años (52,60,61, 62,63).

El eIF-2 se une específicamente a Met-tRNA_i en presencia de GTP para formar el complejo ternario en el cual todos sus componentes están en cantidades estequiométricas y donde el GTP puede ser reemplazado por análogos no hidrolizables (37), lo cual sugiere que este nucleótido trifosfato tendría un papel de regulador alostérico en la formación del complejo (64).

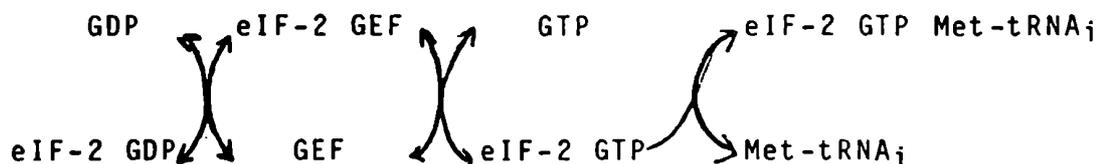
La controversia que existe entre distintos autores en cuanto a la composición y tamaño del eIF-2 se debe probablemente a las distintas técnicas usadas en su aislamiento. El factor está formado por tres subunidades α , β y γ de 32, 52 y 54 kDa respectivamente (33). La movilidad electroforética de las subunidades en geles de poliacrilamida en presencia de SDS varía según la concentración de

poliacrilamida usada: a 10% la subunidad β tiene mayor movilidad que la γ y a 15% ocurre lo contrario (37,65). Por proteólisis limitada puede perderse la subunidad β sin que el factor pierda actividad biológica, aunque aparentemente pierde estabilidad (60). La pérdida de la subunidad por proteólisis durante la purificación explicaría los resultados de algunos laboratorios que describen el factor con sólo dos subunidades (60,61). Se ha demostrado que la subunidad α une GDP y la subunidad γ es la responsable de la unión a Met-tRNA; y al mRNA.

El factor eIF-2 se libera en forma inactiva como [eIF-2•GDP] (62,66) durante el último paso de la etapa de iniciación (la unión de la subunidad ribosomal 60S), con hidrólisis simultánea de GTP. Para la reutilización del eIF-2 el GDP debe ser reemplazado por GTP, pero la afinidad del factor por GDP es mayor que por GTP (52). Se postuló (62) que el intercambio debía ser catalizado por otro factor de manera análoga al mecanismo enzimático que opera en la etapa de elongación en procariotes (EF-Tu/Ts) y en eucariotes (eEF-1 α /eEF-1 β) (67).

Estudiando la inhibición de esta etapa por fosforilación de la subunidad α del eIF-2 en reticulocitos de conejo, se encontró un nuevo factor de iniciación (68) actualmente denominado "GEF" (factor intercambiador de GDP

por GTP) (52,63). Ambos factores (eIF-2 y "GEF") funcionan catalíticamente. El mecanismo propuesto para el reciclado (63) es el siguiente:



Como la afinidad de eIF-2 por GDP es muy alta, la ausencia o inactivación de "GEF" impedirá el reciclaje del factor, se acumulará [eIF-2•GDP] inactivo, y se inhibirá la iniciación.

El mecanismo parece funcionar también en otras células de eucariotes como *Artemia salina* (54), células de tumor ascítico (52,53), hígado de rata (46) y germen de trigo (57).

Los estudios acerca de la función del factor eIF-2 han dado lugar a una cierta confusión, ya que se ha dicho que se necesitan factores auxiliares (cofactores) que lo ayuden en sus funciones. Se han descrito tres cofactores denominados Co-eIF-2A, Co-eIF-2B y Co-eIF-2C (52,62,63,66).

El factor Co-eIF-2A es el único que ha sido purificado: es una proteína de aproximadamente 200 kDa, que estimula moderadamente la formación del complejo ternario y lo estabiliza (69). El estudio de las funciones y peso mole-

cular del Co-eIF-2B permiten asegurar que se trata del complejo eIF-2 GEF . Por las propiedades se deduce que el factor activo en el extracto de Co-eIF-2C sería el eIF-2 GEF ó "GEF" o ambos (63).

1.1.1.2. Transferencia del complejo ternario a la subunidad ribosomal 40S: Complejo de 43S

La iniciación de la síntesis de proteínas tiene lugar solamente sobre subunidades ribosomales separadas. En eucariotes se ha demostrado que la unión del mRNA a la subunidad 40S requiere la unión previa del Met-tRNA_i a la subunidad 40S, formando un complejo de 43S: [eIF-2 • GTP • Met-tRNA_i • 40S-eIF-3] (35,44,70).

Teniendo en cuenta que:

- a) La concentración fisiológica de Mg⁺⁺ intracelular favorece la asociación de subunidades (47,48,71)
- b) La concentración de ribosomas 80S que no participan en la síntesis de proteínas es variable de acuerdo al estado metabólico de la célula (70)
- c) La velocidad de disociación del monómero es muy lenta comparada con la velocidad a la cual los ribosomas realizan el ciclo subunidades → polisomas → subunidades, aunque existen condiciones en las cuales la mayoría de los ribosomas debe entrar al "pool" de

monómeros (p.ej.: el stress) o salir rápidamente de éste (p.ej.: cuando se estimula el crecimiento) (70)

d) La concentración de subunidades nativas es prácticamente constante (6)

la célula debe tener un mecanismo para mantener la concentración de subunidades o para generar subunidades a partir de monómeros.

La generación de subunidades fue originalmente atribuida al factor eIF-3 aislado de reticulocitos de conejo (39), hígado de rata (45) y de células ascíticas (39). El eIF-3 está formado por 8 o 10 polipéptidos cuyos P.M. varían entre 28 y 120 kDa (43) y que hasta el momento solo ha sido separado en dos componentes, uno pesado (500-700 kDa) y otro liviano (51 kDa) (45). Este factor impediría la reasociación de subunidades uniéndose estequiométricamente a la subunidad 40S (34,39,41,50) e interactuando específicamente a través de una de sus subunidades (66 kDa) con el rRNA 18S (72); además sería capaz de disociar el monómero en subunidades (40,45). En contraste con estos resultados, el factor eIF-3 de germen de trigo (55,56) y de hígado bovino (47,48) carecen de actividad antiasociante y/o disociante (48,59). En estos dos sistemas, la actividad antiasociante se encuentra en la fracción post-ribosomal y está representada por un polipéptido de 23 kDa en germen de trigo (55) y de 25,5 kDa

en hígado bovino (48). Este péptido, que se ha designado eIF-6, (48,55,56) se une a la subunidad 60S, impide su reasociación con la subunidad 40S y no tiene actividad disociante (47,48,55,56). Se ha sugerido que la actividad anti-asociante presente en el complejo polipeptídico eIF-3 se debe a la unión del factor eIF-6 con dicho factor durante los primeros pasos de purificación. Dado que la interacción eIF-3-ribosoma y eIF-6-ribosoma procede a través de distintas subunidades y péptidos de diferente P.M. se deberán purificar todos los componentes del factor eIF-3 para establecer cuál es el papel de cada uno de ellos y determinar si la formación de subunidades tiene lugar a través de un mecanismo común o diferente en distintos organismos.

Se ha demostrado que todos los componentes del complejo ternario (73,74) como así también todas las subunidades de los factores eIF-2 y eIF-3 (37,39,73,74) están presentes en el complejo de 43S. Los factores eIF-1 y eIF-4C estabilizan al complejo (70). El factor eIF-4C está presente en cantidades estequiométricas en la subunidad 40S, pero está ausente en los dímeros 40S • 40S (40) que se forman durante la preparación de subunidades nativas (51). Además estimula marcadamente la formación del complejo de iniciación cuando se usan monómeros 80S como fuente de ribosomas y en menor medida cuando se usan subunidades separadas

(34,40,42,75). Es un factor accesorio del eIF-3 en la disociación del 80S; solo tiene un leve efecto por sí mismo y este efecto es aditivo al del eIF-3 (40). Además, disocia los dímeros de 40S dando subunidades activas. Se ha postulado entonces que se asocia a la subunidad 40S evitando su asociación prematura con la 60S y la dimerización, con lo cual aumenta la velocidad y el grado de formación del complejo de iniciación (40).

1.1.1.3. Unión ("binding") del mRNA y formación del complejo de 48S

La unión del mRNA al complejo de 43S es uno de los eventos más complejos y de mayor interés de la etapa de iniciación, ya que en este paso se hace la selección de un mRNA específico y el ribosoma debe encontrar el sitio de iniciación sobre el mensajero para comenzar a traducir una secuencia específica. La característica diferencial de la iniciación entre eucariotes y procariotes es que esta etapa de unión de mRNA requiere la hidrólisis de ATP.

Para poder analizar este paso, es necesario tener en cuenta varios aspectos:

- A) Estructura de mRNA:
 - a) Su carácter monocistrónico
 - b) Su estructura secundaria
 - c) Existencia de un único codón (AUG)

de iniciación

- d) Función del CAP
- e) Función del poli(A)
- f) Secuencia no traducible del extremo 5' del mRNA

B) Requerimientos de factores proteicos:

- a) Factores de iniciación
- b) Proteínas que se unen al CAP ("cap-binding proteins", CBP)
- c) Proteínas que se unen al poli(A) ("poly(A) binding proteins", PABP)

C) Hidrólisis del ATP.

A) Estructura del mRNA

a) El carácter monocistrónico de la expresión genética en eucariotes (excepto en el caso de algunos mensajeros virales) (76) significa no solamente que un único mRNA dirige la síntesis de una única proteína, sino también que la proteína que se expresa es aquella que está codificada más cerca del extremo 5' de la cadena polinucleotídica (76,77). Esta restricción está dada no tanto por la estructura del mensajero sino por las propiedades de los ribosomas de eucariotes que son incapaces de unirse directamente a un sitio interno de iniciación y de reiniciar la lectura de un

segundo cistrón luego de haber atravesado el primero (78,79). Esto significa que las células eucarióticas no son capaces de coordinar la síntesis de una serie de proteínas agrupando los genes detrás de un único promotor transcripcional. En procariotes, en cambio, los transcriptos policistrónicos son el principal recurso regulatorio; las células de eucariotes deberían tener un mecanismo compensatorio para coordinar la expresión genética. Uno de estos mecanismos podría ser la fusión de genes que daría lugar a la existencia de proteínas polifuncionales. Existen ejemplos de tales proteínas en S. cerevisiae (Triptofano sintasa) (80), Neurospora (enzimas de la biosíntesis de sustancias poliaromáticas) (81) y en mamíferos (sintetasa de ácidos grasos) (82).

b) Estructura secundaria: La alteración de la estructura del mensajero puede perturbar su interacción con el ribosoma. En la Tabla 3 se resumen algunas de las manipulaciones a que han sido sometidos algunos mensajeros.

Tabla 3: Alteración de la estructura del mRNA y su efecto sobre el "binding" a ribosomas de eucariotes

Alteración	Efecto sobre el "binding"
Circularización	Anulación (79)
Desnaturalización o disminución de la estructura secundaria.	Mantiene la capacidad de "binding" en el extremo 5' (83,84). No hay "binding" directo a sitios internos (83). Se encuentran mRNAs con más de una subunidad 40S (85).
Aumento de la estructura secundaria.	La disminución del "binding" es paralela al aumento de estabilidad de la estructura secundaria (83).

Los efectos de estas perturbaciones se discutieron en parte en (A,a) y el resto se comentará cuando se discuta el mecanismo de iniciación; por ahora la principal conclusión de la tabla es que la estructura secundaria del mRNA juega un papel fundamental en el binding del ribosoma.

c) Codón iniciador: Se ha demostrado que en células eucariotes la síntesis de proteínas comienza exclusivamente en codones AUG (86) y en más del 90% de los mRNAs en el AUG

más cercano al extremo 5' de la cadena polinucleotídica ((A.a), (87)). En el citoplasma de células eucarióticas existen dos tRNA^{Met} (al igual que en procariotes); uno de ellos funciona exclusivamente en la iniciación (tRNA_i^{Met}) y otro en la elongación (88). A diferencia de lo que sucede en procariotes, el tRNA_i^{Met} no está formilado, pero puede formilarse artificialmente, lo cual reduce su afinidad por los factores de iniciación (89).

d) Función del CAP: Esta estructura cumple dos funciones: estimula el "binding" de la subunidad 40S al mRNA durante la iniciación (90), y estabiliza al mensajero protegiéndolo de la acción de exonucleasas y fosfatasas (35,91,92).

Aunque en eucariotes se han encontrado mRNAs sin CAP no funcionales, esta estructura no es un requerimiento obligatorio para la traducción ya que algunos mRNAs virales (90) carecen de ella y son eficientemente traducidos. Las consecuencias del agregado del CAP a mRNAs naturalmente CAP(-) son algo variables (93,94); en cambio, la eliminación del CAP de mensajeros CAP(+) produce siempre una disminución significativa en la eficiencia de traducción, pero el efecto depende del mensajero ensayado y del sistema libre de células utilizado (95). La funcionalidad del CAP en la síntesis de proteínas ha sido confirmada utilizando análogos estructurales tales como m⁷GMP, m⁷GDP y m⁷GpppN^m, los cuales

tienen un efecto inhibitorio sobre el binding del ribosoma a mRNAs-CAP(+) y en consecuencia sobre su traducción (96,97).

El efecto estimulador del CAP sobre la síntesis de proteínas "in vitro" se ve afectado por la fuerza iónica (98,99), la temperatura (99), la concentración (100), el tipo de mensajero (100) y el pH (101).

Se ha postulado que la estructura CAP en células superiores facilita el "binding" del ribosoma al mensajero y reemplaza la interacción mRNA - rRNA (tipo Shine-Dalgrano) que tiene lugar en procariotes (69).

e) Función del poli(A): A esta estructura se le han atribuido las siguientes funciones:

Estabilidad del mRNA: En diferentes mensajeros con distintos grados de poliadenilación, el aumento de la vida media es paralelo al aumento de la longitud del segmento de ácido adenílico (102,103,104). Sin embargo existen una serie de mensajeros donde no hay correlación entre la longitud del fragmento y su estabilidad (102,105,106).

Procesamiento y transporte del mRNA: Es poco probable que el poli(A) tenga algún papel en estas etapas. En primer lugar, el hecho de que cierto número de virus de mamíferos cuyos ciclos de vida se desarrollan enteramente en el citoplasma posean mensajeros poli(A)(+) (107) ha sugerido

que el fragmento poliadenílico cumple funciones citoplasmáticas. Además mensajeros que naturalmente son poli(A)(+) o que han sido de-adenilados tratando a las células con 3'-deoxiadenosina son eficientemente transportados al citoplasma (103,104) y correctamente procesados (104).

Síntesis de proteínas: Aunque algunos autores consideran que no hay elementos ciertos para involucrar a esta estructura con la síntesis de proteínas, existen unas cuantas evidencias que apoyan la hipótesis. Se ha demostrado que los mRNA poli(A)(+) no solo son más eficientemente traducidos que sus correspondientes mRNA poli(A)(-) (108), sino que la eficiencia de traducción es mayor cuanto mayor es el tamaño del fragmento poli(A) (105). Además "in vivo" existe una correlación directa entre el tamaño de los polisomas y el grado de poliadenilación de los mRNAs correspondientes (109).

Recientemente se ha comprobado que "in vitro" el poli(A) purificado inhibe competitivamente la traducción y que otros ribopolímeros producen solo un efecto parcial a concentraciones más altas (102). El efecto inhibitorio se observa fundamentalmente sobre mensajeros poliadenilados y puede ser revertido aumentando la concentración relativa de mRNA poli(A)(+), o utilizando como competidor poli(A) de menor longitud (102). La relación directa que existe entre

longitud del fragmento de poli(A) y el grado de inhibición indicaría que el efecto es específico. En base a los resultados obtenidos se ha propuesto que el fragmento poli(A) de los mensajeros está involucrado en la traducción y que el poli(A) agregado exógenamente secuestra algún componente que debería interactuar con el mRNA poli(A)(+). Se ha señalado que ese componente sería la PABP ya que las RNPs son más resistentes a la inhibición mediada por poli(A) y la interacción poli(A)-PABP requiere, al igual que la actividad inhibitoria, un poli(A) de determinada longitud. Esto no excluye la hipótesis previa de que a altas concentraciones tanto el poli(A) como otros polinucleótidos actúan de manera inespecífica a través de una interacción polianión-ribosoma, reduciendo la eficiencia total de la iniciación (110).

Dado que la estabilidad de un mensajero es, en parte, una consecuencia de la eficiencia con que es traducido, y dicha eficiencia dependería de la longitud de su poli(A), la relación entre la longitud del poli(A) y su estabilidad sería indirecta.

La capacidad de agregar o eliminar poli(A) a una población de mRNAs le brinda a la célula la oportunidad de alterar totalmente su patrón de síntesis de proteínas sin modificar concomitantemente la complejidad de sus mensajeros.

f) Secuencias no traducibles del extremo 5' del mRNA (secuencia líder): Recientemente se han tabulado las secuencias 5' no traducibles de 211 mensajeros de eucariotes (77). Del análisis de éstas surgen las siguientes observaciones:

La longitud de esta región varía de 3 (111) hasta 742 (112) nucleótidos; sin embargo en el 70% de los mensajeros la secuencia tiene una longitud de 40-80 nucleótidos (111). Las secuencias extremadamente cortas o extremadamente largas son raras y corresponden a mRNAs virales las primeras, y a mRNAs virales o mensajeros de oncogenes, de "Epidermal Growth Factor" y de "heat shock proteins" las segundas (77).

La traducción de un mensajero parece no ser perturbada cuando la secuencia líder es alterada por delección, inserción o recombinación (113) y, aunque la heterogeneidad de las secuencias es marcada, existen algunas características conservadas o semiconservadas:

1. La traducción comienza en el AUG más próximo al extremo 5' en el 95% de los casos (77).
2. Los codones de iniciación funcionales se encuentran en un contexto de secuencia restringida. La característica más sobresaliente es la presencia de una purina, generalmente A, en la posición -3 (en el 79% de los men-

sajeros analizados) (77,114). Cuando el mensajero tiene un triplete AUG antes del iniciador, la posición -3 generalmente está ocupada por una pirimidina (114) y, en codones que codifican para metioninas internas, la frecuencia de nucleótidos en la posición -3 es totalmente al azar (77). Otro nucleótido frecuentemente conservado es una purina en la posición +4, generalmente G, (40-60% de los casos) (114).

Aunque las posiciones -3 y +4 son las más altamente conservadas en los mensajeros naturales (77,114) parece que otros nucleótidos cercanos también están conservados. Así, la secuencia "consenso" para la iniciación en eucariotes parece ser $CC_G^C CCAUG(G)$ (77). Experimentos recientes de mutagénesis sitio-dirigida confirman la importancia de la purina en la posición -3, pero aún no existen evidencias de que las otras posiciones contribuyan al reconocimiento (115).

La distribución no al azar de los nucleótidos sugiere que la maquinaria de iniciación no es indiferente al contexto de bases alrededor del triplete AUG, pero el análisis (77) y los experimentos realizados (115) incluyen mensajeros con una muy variada eficiencia de traducción y no muestran el contexto más favorable para la iniciación. Por lo tanto no permiten predecir que dos mensajes con secuen-

cias idénticas alrededor del iniciador sean traducidos con idéntica eficiencia ya que otras características (estructura secundaria o secuencia adyacente al CAP) podrían diferir de manera tal que afecten la funcionalidad del mensaje.

B) Requerimientos de factores proteicos

a) Factores de iniciación: Los factores necesarios para la unión del mensajero al complejo [Met-tRNA_i • eIF-2 • GTP • 40S • eIF-3] son los factores eIF-4A y eIF-4B (35,116). Estos se unen a mensajeros CAP (+) en una reacción que depende de la presencia de ambos y posiblemente de la proteína CBPI. La reacción requiere hidrólisis de ATP e involucra eventos en la zona del CAP o cerca de ella, ya que es inhibida por m⁷GDP (38,117).

Cuando se utiliza un extracto crudo de factores de iniciación, el requerimiento de ATP para la unión covalente (cross-linking) de los factores eIF-4A y eIF-4B al mRNA depende directamente del grado de estructura secundaria del mensajero (124). Pero cuando se utilizan factores purificados, la interacción de ambas proteínas con el mensajero depende de la presencia de ATP, independientemente de la estructura secundaria del mensajero (116).

Se ha demostrado en el sistema de germen de trigo que el factor eIF-4A es el componente que interactúa direc-

tamente con el ATP (118).

Recientemente se ha descrito un nuevo factor, eIF-4F (44), involucrado en este paso de la síntesis de proteínas. El factor estimula la unión del mensajero al complejo de 43S. Tiene una composición similar a la proteína CBP II (44,119) y al igual que ella restituye a extractos de células Hela infectadas con poliovirus la capacidad de traducir mRNAs-CAP(+) (119). Está compuesto fundamentalmente por cuatro péptidos de 24 kDa, 46 kDa, 73 kDa y 200 kDa, compartiendo con la proteína CBP II los péptidos de 24 kDa (corresponde a CBP I), el de 46 kDa (que en el caso del factor eIF-4F se demostró que es idéntico al factor eIF-4A) y el de 200 kDa. Lo que aún no se ha determinado es si los polipéptidos CBP I y eIF-4A existen como entidades monoméricas y/o como componentes del factor eIF-4F, y si el factor tiene o no algún papel funcional.

El factor eIF-1 estimula como ya se mencionó, la unión de la subunidad 40S a Met-tRNA_i. Aparentemente, induce la reubicación de Met-tRNA_i, coordinando la interacción codón-anticodón y haciendo que el "binding" del mensajero sea estable (35).

b) Proteínas que se unen al CAP CBP ("cap binding proteins", CBP): Como se mencionó en (A.d) el CAP facilita el proceso de iniciación acelerando la velocidad de unión del mensajero al complejo de iniciación. Esta función requiere un receptor para el CAP dentro de la maquinaria de la iniciación.

En preparaciones de factores de iniciación de eucariotes se han identificado por reacciones de "cross-linking" (entrecruzamiento) específico varios polipéptidos que interactúan con el CAP 5' terminal de los mensajeros.

El primer polipéptido descrito es uno de P.M. 24 kDa (120) denominado 24-CBP ó CBPI (120,121) ó eIF-4E (122). Este polipéptido fue luego purificado por cromatografía de afinidad en m^7 -GDP-Sepharosa (127) y m^7 -GTP-Sepharosa (123). Su interacción con el CAP es independiente de la presencia de ATP y Mg^{++} (117). Está presente en muy bajas concentraciones en preparaciones purificadas de eIF-3 y eIF-4B (122).

Se detectaron también polipéptidos de 28 kDa (117), 50 kDa (117) y 80 kDa (124) capaces de interactuar con el CAP pero el "cross-linking" requiere ATP y Mg^{++} , y el ATP no es reemplazable por análogos no hidrolizables.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos contra CBPs

interactuían con el polipéptido de 50 kDa e inhiben el "cross-linking" de los polipéptidos de 24, 28, 50 y 80 kDa (117,125), sugiriendo que los polipéptidos están estructuralmente relacionados.

La proteína de 24 kDa purificada es capaz de revertir la inhibición de la síntesis de proteínas producida por análogos del CAP (126), pero no es capaz de restituir la actividad de traducir mRNAs CAP(+) (actividad recuperadora) a extractos de células HeLa infectadas por poliovirus (119, 121,127,128). Además la CBP de 24 kDa se asocia durante la purificación a péptidos de alto peso molecular (120,126, 127). La actividad que restituye a las células HeLa infectadas con poliovirus la capacidad de traducir mRNAs con CAP está asociada a un complejo proteico de alto peso molecular que incluye a la proteína de 24 kDa (119,121,127,128). Los polipéptidos asociados a la proteína de 24 kDa podrían simplemente estabilizar la actividad recuperadora o bien podrían tener actividades separadas relacionadas con el reconocimiento del CAP (126). La proteína de 24 kDa purificada por cromatografía de afinidad se obtiene en dos formas diferentes, una que interactúa con el CAP y otra más compleja que tiene actividad recuperadora (127). En células HeLa infectadas por poliovirus se ha encontrado que la proteína de 24 kDa es capaz de interactuar con el CAP, pero no

de restituir la actividad de traducción de mensajeros CAP(+) (121).

Aunque aún no se sabe cuál es el componente responsable de la actividad recuperadora, se ha determinado que el anticuerpo monoclonal anti-CBP neutraliza las dos actividades (126).

Si bien aún no existen datos para asegurar cuál es la proteína fisiológicamente activa, los estudios realizados indican que existiría como un precursor de alto peso molecular cuya ruptura podría ocurrir "in vivo" como un mecanismo para generar CBPs activas o "in vitro" durante la purificación. El hecho que en polisomas de reticulocitos de conejo el único polipéptido capaz de interactuar con distintos anticuerpos monoclonales anti-CBP sea el de 50 kDa (125) y además que este mismo polipéptido sea la principal proteína que hace "cross-linking" con el CAP de mensajeros de reovirus en el complejo de iniciación 80S (117), sugiere que "in vivo" ocurre algún tipo de procesamiento que por ruptura de un precursor de alto peso molecular genera la proteína de 50 kDa que es la que posee la actividad de unirse al CAP.

c) Proteínas que se unen al Poli(A) ("poly(A) binding proteins", PABP): Los mensajeros están asociados a proteínas, y uno de los principales sitios de esta interacción es la secuencia poliadenílica (129). Las proteínas de este tipo mejor caracterizadas son dos: una de 73-78 kDa aislada de células de mamíferos y de aves (130,131) y otra de 38-40 kDa aislada de "Artemia salina" (132).

Se han propuesto varias funciones para estas proteínas, como por ejemplo estar involucradas en la asociación de hnRNP a la matriz del núcleo (132,133,134), en el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma (132,135), en la poliadenilación (132), y en la traducción de mensajeros (102,132), pero aún no se conoce su real significado funcional.

C) Hidrólisis de ATP

La hidrólisis de ATP es un requerimiento de la iniciación de la síntesis de proteínas solo en eucariotes (34,75).

La hidrólisis del ATP es necesaria para la unión de la subunidad 40S al extremo 5' del mensajero (75) y también para la migración de la subunidad desde el "sitio de entrada" en el extremo 5' hasta el codón AUG iniciador

(136).

La unión de la subunidad 40S a mensajeros con una estructura secundaria reducida es menos dependiente de ATP y del CAP que el correspondiente a mensajeros nativos (83,136, 137).

La interacción de las proteínas CBP de 28,50 y 80 kDa con el extremo 5' CAP del mensajero es dependiente de ATP y Mg^{++} solo si el extremo 5' tiene un cierto grado de estructura secundaria (117,125). Además el efecto inhibitorio sobre el "binding" ribosoma-mRNA que ejercen los anticuerpos monoclonales anti-CBP está directamente relacionado con el grado de estructura secundaria presente en el mensajero (125). También la inhibición de la formación del complejo de iniciación por alta concentración salina está directamente relacionado con el grado de estructura secundaria del mRNA (124).

Los datos involucran al ATP como mediador de la función del CAP y se sugiere actualmente que los factores que reconocen al CAP intervienen de una manera ATP-dependiente en la relajación de la estructura secundaria del extremo 5' del mensajero, facilitando su unión al mismo (69,117,124,125).

Selección del sitio de iniciación en eucariotes

Si bien el mecanismo por el cual los ribosomas de eucariotes seleccionan un sitio particular en el mensajero para iniciar la síntesis de proteínas aún no ha sido dilucidado, los resultados experimentales han llevado a proponer un modelo denominado "Mecanismo de Scanning" (114,138). Según este modelo, la subunidad 40S se une inicialmente al extremo 5' del mensajero en una reacción que requiere ATP, CBPs y factores de iniciación. Luego la subunidad migra hacia el interior del mensajero (136). Si el contexto de bases alrededor del codón AUG es el adecuado (87) la subunidad deja de migrar, el factor eIF-1 coordina la interacción codón-anticodón, y ese triplete funciona como único iniciador (115); pero si la secuencia alrededor del primer triplete AUG no es la óptima, solo unas pocas subunidades se detienen allí y la mayoría continúa migrando hasta encontrar otro AUG más lejano al extremo 5' (115).

En el modelo, la posición del triplete AUG (su proximidad al extremo 5') es fundamental en la definición del sitio de iniciación funcional (77) y el contexto de bases en que se halla el codón modularía la eficiencia con la cual ese triplete detendría la migración de la subunidad 40S (87,115).

La clave del modelo es que la subunidad 40S debe ser capaz de migrar a lo largo del mensajero hasta encontrar el codón de iniciación. Esta propiedad ha sido demostrada de varias maneras:

- a) Los complejos de iniciación que se forman entre mensajeros y subunidades 40S en presencia de edeña (oligopéptido secretado por "Bacillus brevis" que inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas) contienen 10 a 12 subunidades 40S unidas a cada molécula de mRNA (139).
- b) La esparsomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas que afecta la elongación, pero permite la formación del complejo 80S sobre el sitio normal de iniciación. Cuando se preincuban RNA mensajeros y ribosomas con esparsomicina, la incubación posterior con edeña no permite la unión de nuevas subunidades 40S (139). Por otra parte, se demostró que los mensajeros de eucariotes circulares sin extremo 5' libre no eran traducidos (79). Los experimentos con esparsomicina y edeña no solo corroboran que los ribosomas no pueden unirse a regiones internas del mensajero, sino que demuestran que la entrada de cada subunidad 40S está restringida al extremo 5'.

Si la entrada de cada subunidad se produce solamente a

través del extremo 5' y cada mensajero es capaz de tener unidas varias subunidades 40S, la subunidad es capaz de migrar. En ausencia de antibióticos, pero en condiciones en que se perturba la interacción Met-tRNA^fAUG, tales como disminuyendo la concentración de Mg⁺⁺ (85), utilizando un mensajero desnaturizado (83) o cambiando AUG por AUI (83), se obtienen mensajeros que tienen unidas varias subunidades 40S. Estos resultados indican que la propiedad de moverse a lo largo del mensajero es inherente a la subunidad.

- c) Otros estudios demostraron que en los complejos de iniciación preformados en presencia de edeña e incubados posteriormente en condiciones en que se impide la entrada de nuevas subunidades por agregado de pm⁷G las subunidades son capaces de migrar solo si tiene lugar la hidrólisis de ATP; si esto no ocurre, las subunidades quedan unidas a la zona 5' anterior al AUG (136).

Se sabe además que la unión de la subunidad 60S no requiere hidrólisis de ATP. Los datos indican que la iniciación tendría lugar en dos etapas: en la primera se produciría el "binding" de la subunidad 40S al extremo 5' del mensajero seguida por la migración ATP-dependiente hasta el AUG funcional.

El modelo explica también los datos más recientes según

los cuales aunque con la mayoría de los mensajeros de eucariotes la traducción comienza en el primer AUG (77), existe una lista de excepciones cada vez mayor (5% de los mRNAs celulares y 10% de los mRNAs virales estudiados) (87) que tienen uno o más codones AUG que preceden al AUG funcional. Además la distribución de nucleótidos alrededor del codón AUG funcional no es al azar y las alteraciones de la composición de dicha secuencia afecta la eficiencia de la traducción (115).

1.1.1.4. Formación del complejo de iniciación 80S

La unión de la subunidad 60S al complejo de 48S da lugar a la formación del complejo de iniciación 80S, y es estrictamente dependiente de la presencia del factor eIF-5 (33,42,75). La transición está acompañada de la liberación de los factores eIF-2 y eIF-3 (39,66,73,74) y de la hidrólisis del GTP unido (75).

Otros dos factores (eIF-4C y eIF-4D) han sido relacionados con este paso. El factor eIF-4C estimularía la formación del complejo de iniciación, estabilizando al complejo [Met-tRNA_i • 40S] (34,40,51,75) por interacción directa con él, y protegiéndolo de la acción de la Met-tRNA_i deacilasa ribosomal (140).

El factor eIF-4D estimula la síntesis de metionil-

puromicina y de polifenilalanina (34). Su función en la síntesis de proteínas aún no ha sido aclarada, pero se ha sugerido que aseguraría que el Met-tRNA_i esté unido en la posición correcta en el complejo de iniciación 80S.

1.1.2. Elongación

Durante esta etapa se agregan aminoácidos sucesivamente según la secuencia de codones especificada en el mensajero. Comprende una serie de eventos que se repiten cíclicamente (67) y que se esquematizan en la Fig. 4.

I) Unión de un AA-tRNA apropiado a un sitio (sitio A) en el ribosoma. El AA-tRNA está especificado por el codón del mensajero presuntamente también ubicado en el sitio A. La reacción requiere factores solubles (eEF-1) y GTP (67).

El factor eEF-1 ha sido aislado de diferentes células de eucariotes; existe en formas de distintos pesos moleculares (50 a 500 kDa). En la mayoría de los organismos estudiados existe en una forma inactiva de alto peso molecular que contiene tres subunidades (de 52-62 kDa, 47-69 kDa y 26-30 kDa) (58,141). Se han encontrado dos formas complementarias (58,141), eEF-1 α de 53 kDa que es funcionalmente equivalente al factor EF-Ts de procariotes y eEF-1 β de 30 kDa, que corresponde fun-

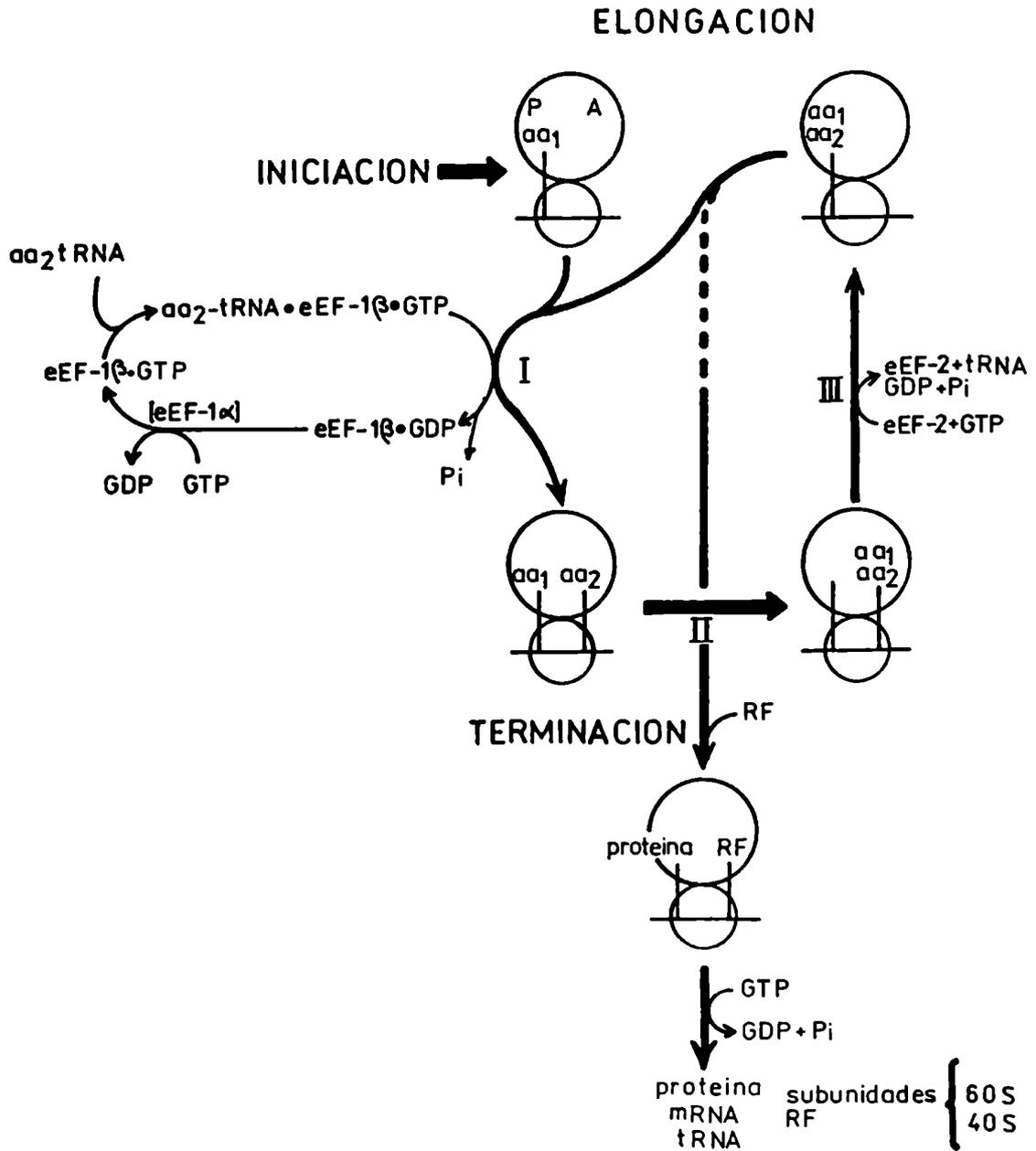


Fig. 4: Mecanismo de elongación y terminación de síntesis de proteínas.

cionalmente a EF-Tu de procariotes.

El factor eEF-1 β generalmente se aísla formando un complejo con otro polipéptido eEF-1 θ de 55 kDa, cuya función aún no se conoce (67,141).

El factor eEF-1 α , si bien es funcionalmente equivalente al EF-Tu de procariotes se diferencia de aquél en que tiene dos sitios diferentes de unión a RNA, uno para AA-tRNA y otro para rRNA (142). Además la actividad GTPásica del factor es estimulada por algunos polinucleótidos sintéticos, como poli(G), y por rRNA 28S, cuya base más abundante es G. Se ha postulado que independientemente de que ciertas proteínas ribosomales puedan tener alguna función en el proceso, el reconocimiento del rRNA 28S por el factor y la estimulación de la actividad GTPásica por el mismo RNA podría tener un papel fundamental en la etapa de decodificación (142).

- II) Formación del enlace peptídico: La transferencia del péptido naciente ubicado en el sitio P al grupo α NH₂ del AA-tRNA que se encuentra en el sitio A es catalizada por la enzima peptidil transferasa, localizada en la subunidad ribosomal mayor. La reacción no requiere factores proteicos ni GTP (67).
- III) Translocación ribosomal: involucra el movimiento relativo del mensajero y el ribosoma. Como consecuencia de

este proceso, el ribosoma se "mueve" un triplete a lo largo del mensajero en la dirección de 5' hacia 3', el peptidil-tRNA pasa del sitio A al P y libera el tRNA que ha quedado de-acilado y estaba en el sitio P (67). La reacción requiere factor de elongación eEF-2 y GTP. El factor eEF-2 ha sido aislado de la mayoría de las células de eucariotes (141,143); su peso molecular es aproximadamente de 90-110 kDa, tiene actividad GTPásica y es específicamente inactivado por el fragmento A de la toxina del cólera que cataliza su ADP-ribosilación (141,144). La ADP-ribosa se une a un aminoácido poco común, la "diftamida" (145), y el factor modificado es incapaz de catalizar la hidrólisis de GTP y la translocación.

1.1.3. Terminación

Es la etapa en la cual el péptido terminado se libera al citoplasma. Esto tiene lugar cuando durante el movimiento relativo del ribosoma y el mRNA aparecen los codones de terminación que no codifican para ningún aminoácido en el sitio A del ribosoma (146). En eucariotes se requiere la presencia de un solo factor soluble y GTP. El factor de terminación es capaz de reconocer los tres codones de terminación y el GTP, a diferencia de lo que ocurre en

células procariotes donde existen dos factores de terminación con diferente especificidad de codón y un tercero que reconoce GTP.

El factor de eucariotes tiene dos subunidades de 56 kDa; tiene actividad GTPásica en presencia de ribosomas y dicha actividad es estimulada por la presencia de codones de terminación.

La enzima peptidil transferasa también cataliza la hidrólisis de la unión peptidil-tRNA en el proceso de terminación. Esta etapa se asemeja a las de iniciación y elongación en que las moléculas que reconocen codones del mensajero requieren GTP para unirse y liberarse del ribosoma, y se diferencia de ellas en la naturaleza de la molécula que reconoce el codón: un ácido nucleico en la iniciación y elongación y una proteína en la terminación.

1.2. Regulación de la síntesis de proteínas

A continuación se hace una síntesis de los aspectos más relevantes de la regulación de la síntesis de proteínas estudiados hasta el presente.

1.2.1. Control de la iniciación por quinasa del tipo eIF-2 α

La fosforilación de la subunidad α del factor eIF-2 bloquea su funcionalidad inhibiendo la etapa de iniciación (63,66,147). Esta fosforilación es catalizada por proteínas quinasas independientes de nucleótidos cíclicos llamadas proteínas quinasas eIF-2 α (69). En lisados de reticulocitos de conejo, estas enzimas existen en forma inactiva y son activadas por incubación del lisado en ausencia de hemina o en presencia de bajas concentraciones de RNAdc (RNA de doble cadena) (63,66). En ausencia de hemina se activa una proteína de 90 kDa que se fosforila y cataliza la fosforilación de eIF-2 α , inhibiendo la iniciación (ICH: inhibidor controlado por hemina) (148). En presencia de RNAdc se activa una proteína de 67 kDa que se fosforila y cataliza la fosforilación de eIF-2 α y de histonas (IAD: inhibidor activable por RNA doble cadena) (148).

En células animales tratadas con interferón, el agregado de RNAdc también activa un inhibidor de iniciación (147) que tiene actividad de proteína quinasa independiente de AMP cíclico y que fosforila el mismo sitio de la subunidad α del factor eIF-2 que los inhibidores ICH e IAD.

En el caso de reticulocitos de conejo, ambas quinasas en su estado inactivo (pro-inhibidores) son constituti-

vas; en cambio en el caso de células animales, el pro-inhibidor es inducido por interferón.

Mecanismo de acción

En un sistema de reticulocitos de conejo donde la síntesis de proteínas está inhibida en un 100% (63,66):

- a) solo un 20-30% del factor eIF-2 está fosforilado en su subunidad
- b) La inhibición de la traducción se puede revertir por agregado de GTP.
- c) El factor eIF-2 funciona estequiométricamente y se acumula como $[eIF-2 \bullet GDP]$ y $[eIF-2 \alpha(P) \bullet GEF]$.

En base a estas observaciones, todos los autores coinciden en afirmar que la inhibición de la iniciación por fosforilación de eIF-2 se debe a la incapacidad para usar eIF-2 $\alpha(P)$ catalíticamente (o sea reciclarlo) a las concentraciones fisiológicas de nucleótidos de guanina (63,66). Sin embargo, aún no existe acuerdo en cuanto al paso de la etapa de iniciación afectado y se postulan la formación del complejo ternario (66) y de los complejos de iniciación 48S y 80S (149-150).

1.2.2. Degradación de mRNAs que opera a través de endorribonucleasas

A) Endorribonucleasa activada por RNAdc

En lisados de reticulocitos incubados en presencia de RNAdc se activa una enzima constitutiva, la 2'5'A sintasa (147). Es una oligonucleótido polimerasa, que sintetiza a oligonucleótidos de estructura $pppA(2'p5'A)_n$ ($n: 1-10$), a partir de ATP. Estos compuestos, que se denominan genéricamente 2'5'A (151) activan una endorribonucleasa (RNAasa L) capaz de degradar RNAs simple cadena, tanto virales como celulares (152).

En células nucleadas tratadas con interferón se induce la aparición de la forma inactiva de la 2'5'A sintasa, la cual requiere RNAdc para activarse (63,152).

En reticulocitos de conejo, la activación de las quinasas que fosforilan eIF-2 α ocurre rápidamente (5 a 6 minutos) y a concentraciones de RNAdc de 10^{-7} g/ml, en tanto que la activación de la oligonucleótido sintasa requiere tiempos de incubación más largos y mayores concentraciones de RNAdc (10^{-5} g/ml) (153,154). En el caso de reticulocitos humanos, a diferencia del sistema de conejo, las células no contienen inhibidores constitutivos activables por RNAdc de (154).

B) Otros tipos de ribonucleasas

A partir de diferentes fuentes se ha podido purificar parcialmente un tipo de endorribonucleasas denominadas latentes pues están presentes formando un complejo con su propio inhibidor. Se ha descrito este tipo de complejos RNAasa-inhibidor en hígado de rata (155), músculo esquelético de ratón (156), reticulocitos de rata (157), cerebro bovino (158) y tejido placentario humano (159). Es muy probable que este equilibrio enzima-inhibidor tenga algún papel en el recambio de los mRNAs y por lo tanto afecte la síntesis de proteínas.

1.2.3. Selección de mensajeros

La selección de mensajeros por la maquinaria de síntesis de proteínas es un problema que aún no se ha resuelto. Existen algunos ejemplos bien caracterizados de regulación por traducción preferencial de determinados mRNAs:

- 1) Luego de la fertilización de oocitos de "Spisula solidissima" (161).
- 2) Durante la maduración meiótica de oocitos de estrella de mar (162).
- 3) Durante la diferenciación de "Dictyostelium

discoideum" (163).

- 4) Durante el shock por calor en "Drosophila" en donde disminuye la velocidad de iniciación y elongación de los mRNAs de las proteínas que se sintetizan a bajas temperaturas (164).
- 5) Durante la infección viral; éste es uno de los casos más estudiados.

En las células infectadas por virus se produce un bloqueo de la síntesis de proteínas del huésped y se utiliza la maquinaria celular para la síntesis de proteínas virales (160,165,166). El mecanismo de inhibición parece ser diferente según el tipo de virus.

Se ha atribuido a distintos factores de iniciación la capacidad de discriminar entre diferentes mensajeros (35). Recientemente se ha demostrado que el factor eIF-4A (165) discrimina entre una amplia gama de mensajeros diferentes, entre ellos α y β globina (166), reovirus (160) y virus EMC (165), debido a que cada uno de ellos tiene diferente grado de afinidad por el factor. Esta discriminación no depende de la presencia de CAP, sino de la secuencia de bases y/o de la diferente estructura secundaria de los mRNAs.

En el caso de células infectadas con poliovirus, el huésped pierde la capacidad de traducir mRNAs-CAP (+), pro-

bablemente por inactivación de la proteína CBP11 (119). El agregado de CBP11 restituye a las células Hela infectadas con poliovirus la capacidad de traducir mensajeros con CAP, pero "in vitro" no estimula la traducción de mensajeros de poliovirus. Se ha demostrado que este mensajero tiene una afinidad inusualmente alta por el factor eIF-4A (165) que es un componente de la proteína CBP11 (119), cuya inhibición podría ser la forma en que los picornavirus logran reprogramar la maquinaria de traducción del huésped.

1.2.4. Modulación por ácidos ribonucleicos

Se han descrito una serie de RNAs de bajo peso molecular (6-14 kDa) capaces de modular la traducción en eucariotes. Algunos, aislados por ejemplo de reticulocitos de conejo, estimulan la traducción de manera no específica (167). Otros, por ejemplo de "Artemia salina" (168), hígado de rata (169) y músculo de embrión de pollo (170) inhiben la traducción.

Existen varias clases diferentes de este tipo de inhibidores; uno de ellos, rico en ácido uridílico y llamado tcrRNA, ha sido aislado de músculo de embrión de pollo e inhibe en forma discriminatoria la traducción (170). En cambio, cuando se aísla de Artemia salina inhibe la traducción de manera inespecífica, no selectiva (147).

En músculo de embrión de pollo se ha caracterizado otro RNA que inhibe la traducción. Se encuentra en el citoplasma como una ribonucleoproteína (iRNP) de 10S y contiene RNAs (iRNA) de 4S que ejercen su efecto a nivel de iniciación (171). Estos RNAs de 70-90 nucleótidos tienen muy poca estructura secundaria (172).

1.2.5. Interferón

Los interferones son una familia de glicoproteínas secretadas por células infectadas por virus, cuyo principal efecto biológico es producir un estado antiviral en células no infectadas (173,174).

En células humanas existen tres tipos antigénicamente diferentes: α , β y γ . Los tipos α y β pueden ser inducidos en células animales por varios agentes, por ejemplo ciertos virus, bacterias y RNAsdc virales o sintéticos (173). El del tipo γ es inducido en células linfoides por mitógenos y por antígenos (174).

El interferón no solo tiene actividad antiviral sino que también afecta la motilidad celular, la proliferación y varios procesos inmunológicos. La mayoría de los efectos son transitorios y dependen de la síntesis de RNA y proteínas. En la Fig. 5 se esquematiza la inducción de enzimas producida por interferón en células animales.

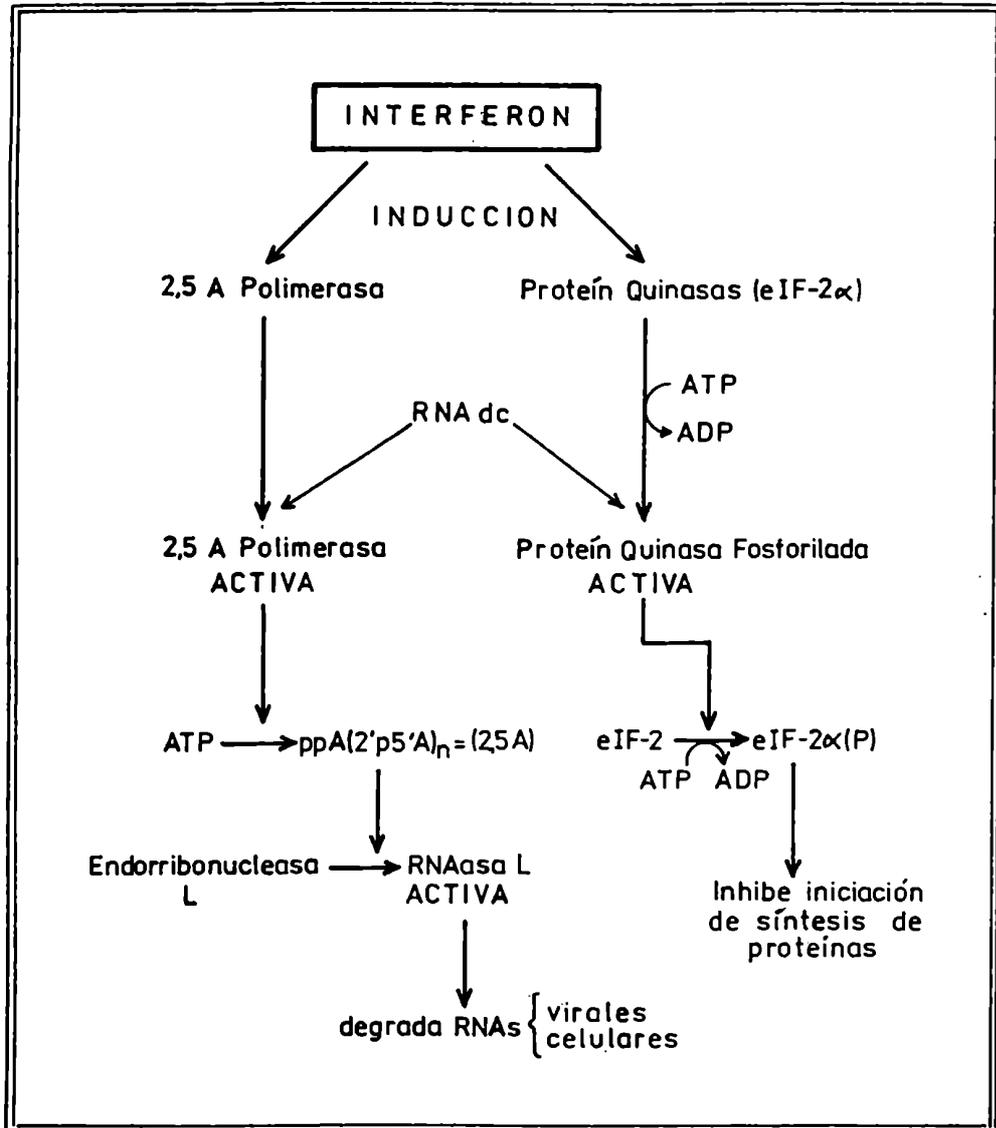


Fig. 5: Inducción enzimática producida por interferón.

El mecanismo de inhibición por inducción de estas enzimas ya se discutió en 1.2.1. y 1.2.2.

Algunas células y tejidos de aves y mamíferos contienen diferentes niveles de 2'5' polimerasa, y el contenido aumenta por tratamiento con interferón (174). En células de reticulocitos de conejo y en linfocitos humanos el nivel de enzima es muy alto (174); esto podría deberse a que el sistema 2'5'A sintetasa-RNAasa L tiene algún papel en el control de la velocidad de división celular aún en células no infectadas (175) o a que las células han sido "previamente tratadas" con interferón de manera endógena.

"In vivo" no existen evidencias directas del mecanismo por el cual el sistema 2'5'A sintetasa-RNAasa L discrimina entre RNAs virales y celulares. "In vitro" se ha demostrado que tal selección se debe a la activación localizada de las enzimas por los intermediarios replicativos del RNA viral (que tienen una estructura parcialmente de doble cadena) (173).

Se ha propuesto que la activación de la quinasa de tipo eIF-2 sería una vía inhibitoria alternativa que funciona si la acumulación de RNA viral no se detiene por la acción del sistema 2'5'A polimerasa-RNAasa L, bloqueando la iniciación de la traducción antes de que se forme una cantidad de proteínas estructurales del virus suficiente como

para permitir su ensamblado.

Otros eventos bioquímicos que no dependen de RNAdc

A) Efectos sobre la metilación del mRNA:

Es bien conocido el hecho de que la eficiencia de traducción de un mensajero que normalmente tiene CAP y está metilado disminuye si se inhibe la metilación (90). La metilación de mRNAs virales está disminuída en células tratadas con interferón (174); este podría ser otro mecanismo para inhibir la traducción de mensajeros virales.

B) Otros cambios:

En extractos de células tratadas con interferón se observa una inactivación de algunas especies de tRNAs que sucede más rápidamente que en extractos de células no tratadas (173). Esto se debe a un aumento en la actividad de la enzima (2'-5')fosfodiesterasa que degrada los oligonucleótidos 2'5'A. Esta enzima también degrada el extremo CCA de los tRNAs (174) y podría afectar la velocidad de elongación de un péptido según la composición de los mRNAs respectivos.

2. POLIAMINAS

Las poliaminas son constituyentes naturales tanto de células eucariotes como de procariotes. Las más comunes son:

Putrescina: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$

Espermidina: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

Espermina: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

La mayoría de los efectos producidos por las poliaminas en distintos sistemas biológicos pueden explicarse en términos de su naturaleza química: son policationes y por lo tanto tienen una gran afinidad por los compuestos y estructuras celulares con grupos cargados negativamente. Pero la gran variedad de efectos que ejercen estas sustancias no pueden ser totalmente atribuidos a un efecto inespecífico debido a su carga eléctrica.

En experimentos "in vitro" el agregado de concentraciones fisiológicas de poliaminas incrementa la replicación y transcripción del DNA y la traducción de mRNAs (176). "In vivo" existen una serie de evidencias indirectas que sugieren que estas bases orgánicas están involucradas en la proliferación celular. Por ejemplo se conoce que las células en estado de crecimiento activo tienen concentraciones de poliaminas mayores que las células en estado

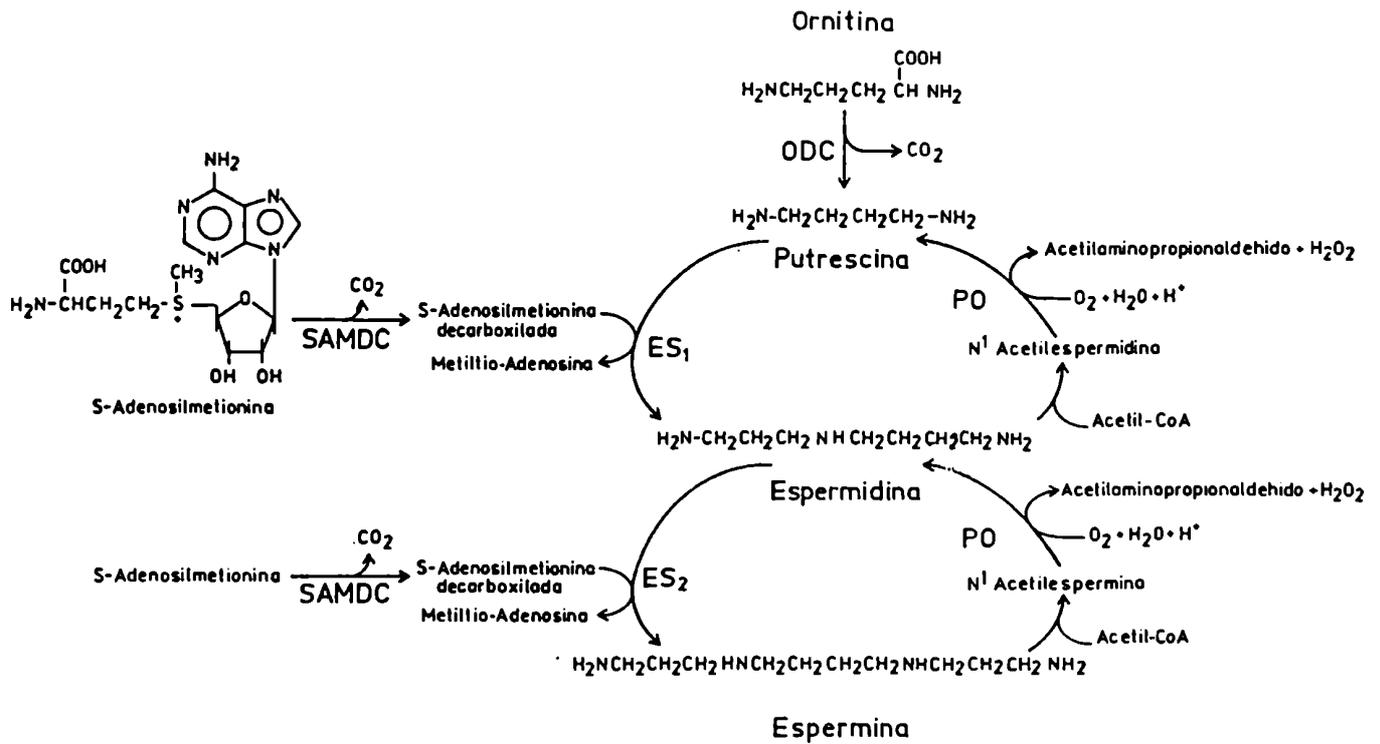
de reposo (177). Además la actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC), una de las enzimas limitantes de la biosíntesis de poliaminas (178), aumenta marcadamente en respuesta a ciertos estímulos que inducen el crecimiento, tales como el agregado de suero o insulina a un cultivo de células, la hepatectomía parcial de hígado de rata, la estimulación de linfocitos por agentes mitogénicos, la infección de células con virus tumorigénicos y la inducción de transformación neoplásica por agentes cancerígenos (179).

2.1. Biosíntesis de poliaminas en eucariotes

En células de mamíferos la biosíntesis de poliaminas (Fig. 6) comprende la acción secuencial de dos decarboxilasas y dos aminopropiltransferasas. El primer paso, la decarboxilación de la L-ornitina, es catalizado por la enzima ODC, que utiliza como cofactor fosfato de piridoxal. La segunda decarboxilasa es la SAMDC que genera un grupo aminopropil activado necesario para convertir putrescina en espermidina y espermidina en espermina. Estas dos últimas reacciones son catalizadas por dos aminopropil transferasas: esperimidina y espermina sintasa (178).

La biosíntesis de poliaminas en tejidos de mamíferos puede ser alterada sensiblemente en respuesta a estímulos intracelulares o extracelulares a través de fluc-

Figura 6:



Metabolismo de las poliaminas en células animales

tuaciones rápidas en la actividad de la enzima ODC. Esta enzima parece tener un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, así como en el crecimiento (controlado o no) de células de mamíferos. Los datos descritos por muchos laboratorios muestran un marcado aumento en la actividad de ODC al comienzo de la proliferación celular y/o desarrollo, e inversamente, cuando alguno de esos procesos cesa, la actividad de la enzima decae rápidamente (178). De este modo, la biosíntesis de poliaminas parece estar estrictamente relacionada con la capacidad proliferativa de las células de eucariotes.

La putrescina, producto de la reacción enzimática catalizada por ODC, es un regulador de la vía biosintética. Es un modulador negativo de la ODC (180) un activador de la SAMDC (180), el sustrato de la espermidina sintasa y un inhibidor competitivo de la espermina sintasa (181). En algunos tejidos en proliferación, como por ejemplo linfocitos activados con mitógenos, durante una parte del proceso de crecimiento coexisten paradójicamente altos niveles de actividad de ODC y altos niveles de putrescina (182). Esto sugiere la posibilidad de algún defecto en el control de la actividad de ODC por putrescina y otras poliaminas en células en estado de proliferación.

2.2. Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas

Aparentemente, la única manera de dilucidar el papel fisiológico de las poliaminas en células animales sería la eliminación selectiva de estos compuestos "in vivo". A diferencia de los procariones, en células eucarióticas es muy difícil la obtención de mutantes dependientes de poliaminas. Por lo tanto, para disminuir o eliminar los niveles endógenos de poliaminas habría que inhibir su producción y/o acumulación. Dado que las enzimas limitantes de la biosíntesis de estas poliaminas son las decarboxilasas, la mayoría de los inhibidores desarrollados son inhibidores de esas enzimas. En la Tabla 4 se resumen algunos inhibidores y sus propiedades.

El uso de estos inhibidores específicos ha permitido demostrar el requerimiento casi absoluto de putrescina, espermidina y espermina para la división celular (181). Estos inhibidores pueden utilizarse para dilucidar la función de las poliaminas en la fisiología celular y obtener información acerca de las enzimas involucradas en el metabolismo de las poliaminas y los mecanismos que la regulan. Además, la posibilidad de controlar la acumulación de las poliaminas ofrece aparentemente un medio concreto para aplicaciones clínicas, especialmente en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

Tabla 4: Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.

INHIBIDOR	ENZIMA AFECTADA	TIPO DE INHIBICION
$(+)-\alpha\text{-MO}$ (183)	ODC	competitiva reversible
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$		
$(+)-\alpha\text{-DFMO}$ (184)	ODC	irreversible
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{CHF}_2}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$		
MGBG (185)	SAMDC	competitiva
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\overset{\text{CH}_3}{\text{N}}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$		
MBAG (186)	SAMDC	reversible
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \parallel \quad \\ \text{C}=\text{N}-\text{NH}-\text{C} - \text{NH} \\ \\ \text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{C} - \text{NH} \\ \quad \parallel \quad \\ \quad \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$		

MO: metilornitina; DFMO: difluormetilornitina; MGBG: metil glicoxal-bis-guanil hidrazona; MBAG: metil glicoxal-bis-amino-guanil hidrazona.

3. LINFOCITOS

Los linfocitos de sangre periférica humana constituyen una población de células fisiológicamente en estado G₀ (estado de reposo) que no se dividen "in vivo" ni en cultivos "in vitro". Sin embargo, pueden ser estimuladas y comienzan a dividirse cuando a los cultivos se agregan agentes mitogénicos como fitohemoaglutinina (FHA) (188-189). Durante este proceso de transformación linfoblástica sufren una serie de cambios metabólicos entre los cuales es importante destacar un marcado aumento de la síntesis de proteínas y RNA. Los linfocitos estimulados entran en fase G₁ (190) y luego de un período de 24 horas comienzan la replicación del DNA (fase S) y a continuación, la división celular (188,189). Por lo tanto los linfocitos en cultivo, en estado de reposo y en presencia de mitógenos, constituyen un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos bioquímicos relacionados con la expresión genética durante el ciclo y la proliferación celular.

3.1. Heterogeneidad de la población de linfocitos periféricos

La diferenciación en organismos superiores determina la generación de progenies celulares diversas, individualmente especializadas, a partir de una única célula

denominada "stem cell". Un ejemplo clásico lo constituye la diferenciación de linfocitos (191,192); en los mamíferos adultos las "stem cells" se originan en la médula ósea y luego se diferencian en dos tipos de linfocitos: T y B. Los de tipo T se diferencian en el timo y son responsables de la inmunidad celular. Los del tipo B son responsables de la inmunidad humoral y se diferencian en algún lugar distinto del timo; se denominan así por analogía con las células de las aves que son funcionalmente iguales y se diferencian en la bursa de Fabricius.

Los linfocitos T, luego de diferenciarse en el timo, migran hacia los órganos linfoides periféricos y/o circulan en sangre. La población de linfocitos T está compuesta de células heterogéneas, en las cuales la diferencia en la expresión fenotípica de ciertos marcadores de superficie corresponde a las distintas funciones que son capaces de realizar. De acuerdo con sus funciones, se han clasificado en regulatorios y efectores. Los primeros amplifican (helper) o suprimen (supresor/killer) la respuesta inmunológica de otros linfocitos T y también de linfocitos B. Los efectores incluyen células directamente relacionadas con procesos de hipersensibilidad retardada, y los linfocitos T citotóxicos (192).

Los linfocitos B son comparativamente mucho menos

complejos que los T. Tienen inmunoglobulinas en su superficie que actúan como "receptores" de antígenos. Como resultado de la unión antígeno-receptor, la célula prolifera y da lugar a células plasmáticas que secretan solamente el correspondiente anticuerpo específico (191).

Esta breve síntesis demuestra la heterogeneidad funcional de la población de linfocitos circulantes. Los linfocitos humanos purificados por técnicas como la que se describirá más adelante en Métodos (193) consisten en aproximadamente un $95\% \pm 3$ de linfocitos T, un pequeño número de linfocitos B, macrófagos y otras células sanguíneas contaminantes.

3.2. Activación de linfocitos

3.2.1. Agentes mitogénicos: Su interacción con la membrana

El mitógeno no necesita penetrar a la célula para activar la proliferación de linfocitos (194). La membrana de los linfocitos sirve de transmisor de las señales que inducen la proliferación y la diferenciación celular. Los agentes que interactúan con la membrana celular y "disparan" esos eventos pueden ser inmunológicamente específicos e inducir proliferación monoclonal, o inmunológicamente no específicos e inducir la proliferación policlonal.

La mayoría de los mitógenos de linfocitos T son

agentes que inducen la proliferación policlonal en estas células e interactúan con polisacáridos de superficie. Estos mitógenos incluyen lectinas como FHA, ConA, y otros compuestos o enzimas como IO_4^- y galactosa oxidasa, respectivamente (195).

Las lectinas producen una activación de la enzima TGasa (transglutaminasa). Esta enzima cataliza el "cross-linking" entre proteínas a través de uniones γ -glutamil- ϵ -lisinas. La proliferación de los linfocitos y la activación de la enzima TGasa dependen de la concentración de lectina. El aumento en la concentración de lectina produce un incremento en la actividad de la enzima, que es a su vez paralelo a la respuesta proliferativa. Concentraciones muy altas de lectina activan la enzima pero no son mitogénicas. La activación de TGasa y el "cross-linking" de componentes de membrana serían eventos tempranos, responsables de iniciar la activación (196). Este proceso requiere no solo la interacción mitógeno-membrana sino también la participación de mediadores solubles (197). En base a los últimos estudios, el modelo postulado de la activación es el siguiente: la proliferación puede dividirse en dos etapas. La primera, dependiente del mitógeno y moviliza las células de la fase G_0 a la G_1 . La segunda es independiente del mitógeno, necesita la producción de "Interleuquina II" (IL-2

ó TCGF) y la adquisición de receptores de dicha interleuquina. Estos dos procesos dependen de la presencia de "interleuquina I". Durante la segunda etapa, la célula entra en fase S y luego se divide (198,199).

Las interleuquinas, genéricamente denominadas linfoquinas, son proteínas secretadas por linfocitos estimulados que tienen propiedades inmunorreguladoras (200). La interleuquina I (IL-1) se sintetiza cuando los linfocitos son activados por mitógenos en presencia de monocitos (198) y la tipo II por acción directa del mitógeno e interleuquina tipo I (IL-1) (198).

A altas concentraciones de Con A se inhibe la proliferación por producción de células resistentes a IL-2, posiblemente a través del "cross-linking" extensivo de proteínas de la superficie de la célula (201).

El ionóforo A23187 es un activador inmunológicamente no específico de linfocitos, cuya actividad es independiente de los dos mediadores solubles (IL-1 e IL-2) (199). Aunque todavía no está claro si la actividad mitogénica de este ionóforo afecta específicamente una subpoblación de linfocitos (células IL-2 independientes) o si todas las células son susceptibles, los resultados indican la importancia de la traslocación del calcio como paso clave para la activación.

3.2.2. Eventos bioquímicos relacionados con la estimulación de linfocitos

A. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana

Durante la estimulación, la velocidad de salida del K^+ se duplica con respecto a la célula en reposo y ocurre un aumento proporcional y paralelo del transporte activo (202). Además, también tiene lugar un aumento significativo de la entrada de Ca^{2+} , detectable a los pocos minutos de agregado del mitógeno (203). La entrada de Ca^{2+} no depende de la presencia de ATP ni de la despolarización de la membrana, pero puede ser modulado por los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos y es inhibida por agentes desacoplantes, lo cual sugiere que el Ca^{2+} es secuestrado por la mitocondria (203).

La concentración de Ca^{2+} intracelular retorna a los valores de células no estimuladas luego de 24 hs. La declinación en los niveles intracelulares de Ca^{2+} coincide con la formación del "capping celular" (proceso por el cual los receptores de Con A o FHA se entrecruzan, liberan la lectina y se internalizan). Si a los pocos minutos de estimulación se agrega α -D-metil-manósido compite con los receptores por la lectina, se bloquea el aumento de Ca^{2+} intracelular y la síntesis de DNA posterior. El efecto del α -D-metil-manósido

sobre la síntesis de DNA disminuye progresivamente cuando se agrega más tarde después de iniciada la estimulación (204). Estos resultados indican que el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular es una respuesta primaria al agregado del mitógeno, porque es directamente dependiente de la interacción ligando-receptor. En estos experimentos, las células se encuentran normalmente en una concentración de $2-3 \times 10^6$ cél/ml. En estas condiciones las interacciones entre células en suspensión son mínimas. El hecho de que el aumento de Ca^{2+} intracelular sea muy rápido (2 minutos) luego del agregado del mitógeno sugiere que las interacciones célula-célula no están involucradas en los cambios tempranos de Ca^{2+} inducidos por el mitógeno (205). Como la estimulación mitogénica de linfocitos requiere la presencia de células accesorias (monocitos), el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular no es por sí mismo una señal suficiente para la proliferación.

B. Alcalinización intracelular

La activación de linfocitos produce dos alcalinizaciones secuenciales. La primera, durante las primeras horas luego del agregado del mitógeno, es transitoria. Corresponde en el tiempo al primer paso de la activación, durante el cual aumentan la síntesis de metabolitos, de RNA, de pro-

tefnas y de TCGF. La segunda alcalinización tiene lugar entre las 24 y 48 hs, cuando la célula entra al período mitótico; esta modificación es paralela a la velocidad de síntesis de DNA. El incremento de pH parece ser necesario para facilitar la síntesis de DNA (la DNA polimerasa tiene actividad máxima a pH 9), pero no es suficiente para causarla. En los procesos descritos tienen lugar varias reacciones dependientes de quinasas, y el aumento de pH no solo aumenta la velocidad de reacción sino que desplaza la constante de equilibrio hacia la formación de producto fosforilado (206).

C. Biosíntesis de poliaminas

Ya se ha mencionado que las poliaminas están invariablemente asociadas con el crecimiento y la proliferación celular. Al igual que en otras células de eucariotes, durante la proliferación de linfocitos se observa un marcado aumento de la síntesis de poliaminas como consecuencia de un incremento en la actividad de las enzimas responsables de su biosíntesis. Así, la ODC aumenta su actividad a las pocas horas del agregado de mitógeno y alcanza su máximo a las 48 hs, en tanto que la SAMDC tiene su máximo a las 72 hs (182). En consecuencia, los niveles intracelulares de putrescina aumentan significativamente de 24 a 72 hs luego del agregado

de FHA, mientras que los de espermidina y espermina permanecen casi constantes durante las primeras 24 hs y luego aumentan gradualmente (182).

En linfocitos estimulados, el agregado de drogas que interfieren la biosíntesis de poliaminas inhibe la proliferación (207), indicando de manera directa la importancia de estas poliaminas en el crecimiento celular. Este tipo de drogas puede utilizarse para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares de la proliferación de linfocitos, determinando cuál es el sitio del ciclo celular en el que actúan las poliaminas y cuáles son los eventos bioquímicos que dependen primariamente de estas sustancias.

D. Síntesis de proteínas

Un aspecto fundamental de la respuesta linfocitaria a los mitógenos es el rápido aumento de la síntesis de proteínas. Este aumento se puede detectar en la primera hora de estimulación y alcanza su máximo aproximadamente a las 48 hs (208,209).

Durante las primeras 10 horas de cultivo, la célula utiliza toda la maquinaria de síntesis proteica preexistente, ya que el contenido de ribosomas permanece constante durante ese período (210), mientras que el porcentaje de ribosomas implicado activamente en la síntesis de proteínas

y formando parte de los polisomas aumenta del 25% al 75% (211). Por otra parte, los mensajeros presentes en linfocitos en reposo son capaces de ser traducidos "in vitro" por sistemas libres de células heterólogos (212,213).

Repetidas veces se ha sugerido que durante la estimulación de linfocitos la utilización de ribosomas y la síntesis de proteínas está regulada, al menos en parte, a nivel post-transcripcional. Se ha propuesto que la síntesis de proteínas en linfocitos en reposo tiene lugar a baja velocidad por la presencia de inhibidores (214,215), o por deficiencia de alguno de los factores de iniciación (216). También algunos autores han sugerido que el incremento de la síntesis de proteínas luego del agregado del mitógeno se debe a un aumento de la velocidad de procesamiento y/o de transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma (209,212,213).

Hay dos clases de proteínas cuyas variaciones durante la proliferación celular merecen destacarse: las histonas y la proteína que contiene hypusina.

a) Síntesis y composición de histonas

Se ha demostrado que la síntesis de histonas no ocurre solamente durante la fase S, sino que también sucede durante las fases G₁, G₂ e incluso durante la fase G₀ (190, 217).

Los linfocitos en estado de reposo, al igual que otros tipos celulares de fase G_0 , mantienen un nivel de síntesis de histonas reducido pero significativo, y cuantitativamente el tipo de histonas sintetizadas es distinto al que se forma en las otras fases del ciclo celular (217, 218). Cuando se estimulan las células con FHA no solo hay un aumento en la síntesis de histonas, sino que también hay un cambio drástico en el tipo de histonas sintetizadas. En cambio cuando se induce la reparación de DNA luego de la exposición de células a luz U.V., no se altera ni cualitativa ni cuantitativamente el perfil de síntesis de histonas (218). Estos resultados parecen indicar que la síntesis de histonas no está necesariamente asociada a la replicación del DNA, y que las variaciones en el perfil de síntesis de histonas puede utilizarse (independientemente de las consecuencias fisiológicas de estos cambios) para distinguir diferentes etapas del ciclo celular. La variante de histonas que se sintetiza en linfocitos en estado de reposo, es del mismo tipo que las formadas en otras células quiescentes, (fase G_0) (217), lo cual evidencia que los linfocitos no estarían detenidos en fase G_1 (218). Además, la cantidad de histona presente está directamente relacionado con el tiempo que la célula ha estado en la fase G_0 (218).

b) Hypusina

La hypusina N^{ϵ} -(4-amino-2-hidroxibutil) lisina es un aminoácido poco común descrito originalmente como aminoácido libre por Shiba y col. (219) en fluidos y tejidos de mamíferos. Se forma post traduccionalmente por unión covalente del grupo butilamino de la espermidina con el grupo ϵ -NH₂ de un resto de lisina seguido de la hidroxilación del C2 del grupo transferido (220).

Esta modificación ocurre sobre una única proteína, llamada Hy⁺ (PM aproximado 17.000-19.000) cuando células como linfocitos en estado de reposo o fibroblastos ayunados de suero son estimuladas (220,221). En células en reposo, la proteína sustrato de esta modificación, denominada Hy^o se sintetiza continuamente, pero la formación de hypusina es mínima. Cuando se estimulan linfocitos con mitógenos, la conversión Hy^o a Hy⁺ es paralela al aumento de síntesis de proteínas.

La proteína Hy⁺ ha sido identificada como el factor de iniciación eIF-4D (222), cuyo papel definitivo en la síntesis de proteínas aún no ha sido determinado. Se sabe que en un sistema libre de células estimula la formación de metionilpuromicina dirigida por ApUpGp y la síntesis de polifenilalanina dirigida por poly(U). Tampoco se conoce su

función en la célula intacta, pero es una de las proteínas cuantitativamente más importante y una de las más constantes en diferentes células animales. Esto indica que debe tener algún papel fisiológico en la célula intacta y que la modificación post traduccional altera su actividad.

E. Síntesis de RNA

La velocidad de transcripción luego del agregado de mitógenos a linfocitos en cultivo permanece igual al de células en reposo durante 6 hs (188) y luego aumenta alcanzando su máximo a las 48 hs de cultivo (188,223).

El estudio de los cambios que ocurren en el metabolismo del RNA luego de la estimulación ha demostrado que durante las primeras 2 hs de cultivo, la velocidad de poliadenilación de mensajeros en el núcleo se duplica (223), aumenta el transporte de mRNAs poliadenilados del núcleo al citoplasma (224) y la velocidad de metilación del RNA total; sin embargo, la metilación del CAP tiene una cinética muy semejante a la de la síntesis de RNA (225).

Recientemente se ha demostrado que luego de la estimulación se produce un acortamiento general de las cadenas de ácido poliadenílico hasta una longitud óptima para su expresión (213) (se debe recordar que la longitud del poli(A) parece estar relacionada con la eficiencia de

traducción). La cinética de degradación es la misma para todos los mensajeros en linfocitos en reposo. Estos mRNAs son muy inestables, con una vida media de 1-2 hs (226); luego de la estimulación aumenta la vida media y, por lo tanto, la masa total de mRNA por célula (227).

Solo un 4% de los mensajeros citoplasmáticos poliadenilados extraídos de linfocitos estimulados durante 72 hs son específicos del estado transformado (228). Los ensayos de traducción en presencia de análogos del CAP indican que los mensajeros de células en reposo son relativamente deficientes en estructuras 5' CAP funcionales (228).

En base a todos estos resultados se puede decir que los linfocitos durante las primeras horas de estimulación no necesitan alterar su programa de transcripción en respuesta a la lectina, y todos los cambios en la producción y traducción de mensajeros pueden lograrse a través de alteraciones en las reacciones de procesamiento y/o a nivel de síntesis de proteínas. Podría, por lo tanto, existir un mecanismo general de degradación de mensajeros que se inactivaría rápidamente luego de la estimulación. Kecskemthy y col. han propuesto que tal mecanismo podría involucrar el sistema de degradación del CAP (213). Debe destacarse que este mecanismo general de degradación a través de eliminación del CAP no necesariamente debe ser el único; nuestros resultados

indican que existen otros.

F. Síntesis de DNA y ciclo celular

El aumento de la síntesis de DNA (fase S) en linfocitos estimulados comienza recién luego de 24-30 hs de exposición al mitógeno (188,189,207).

Los datos experimentales existentes hasta hace poco tiempo indicaban que la entrada de una célula a la fase S estaba controlada por el metabolismo del RNA ribosomal. Se suponía que la síntesis o la acumulación de rRNA era un prerequisite para que las células comenzaran a sintetizar DNA (229). Más recientemente, la disponibilidad de un anticuerpo específico contra la enzima RNA-Polimerasa I ha permitido demostrar que la acumulación o síntesis de RNA ribosomal no es necesaria para iniciar un nuevo ciclo celular (230).

En condiciones fisiológicas, el tamaño celular (medido como contenido de proteínas o de RNA) está coordinado con la replicación del DNA; pero bajo ciertas condiciones pueden disociarse, lo cual sugiere que están bajo controles diferentes.

La estimulación de linfocitos con FHA en ausencia de macrófagos o IL-2 no estimula la síntesis de DNA; inversamente el agregado de macrófagos o de IL-2 sin FHA tampoco

produce la síntesis de DNA (199). Se ha demostrado que la aparición de receptores para IL-2 es necesaria para la inducción de receptores de transferrina (factor de crecimiento obligatorio en medios sin suero) (231). Actualmente se sugiere que, al igual que en otras células (232), la progresión de los linfocitos a través del ciclo celular está regulada por la aparición sucesiva de receptores de superficie para diferentes factores de crecimiento, algunos de los cuales controlarían la replicación del DNA y otros, el aumento del tamaño celular (229).

4. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El proceso de estimulación de linfocitos comprende una etapa dependiente de la presencia de mitógenos y otra, de la producción de factores solubles del tipo de las linfoquinas. La complejidad de este proceso podría ser la responsable de una fase G_1 , tan larga (aproximadamente 30 hs) hasta el comienzo de la síntesis de DNA (189).

La serie de cambios bioquímicos que ocurren en este sistema durante la prolongada fase G_1 son muy similares, sino idénticos, a los eventos inducidos por la presencia de antígenos "in vivo". Por lo tanto, la estimulación de linfocitos por mitógenos constituye un interesante modelo para estudiar el control de la proliferación y diferenciación

celular.

El aumento temprano de la síntesis proteica durante la estimulación de linfocitos no requiere síntesis de RNA (224). Este hecho parece indicar que la traducción puede ser uno de los mecanismos de control en las primeras etapas de la estimulación.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han indicado la presencia de un inhibidor de la síntesis proteica asociado a ribosomas de linfocitos en reposo, cuya actividad disminuye marcadamente o desaparece durante la estimulación (215).

Por otra parte se conoce también que la enzima ornitina decarboxilasa (responsable de la biosíntesis de poliaminas) aumenta considerablemente su actividad en las primeras horas posteriores al agregado de mitógenos a un sistema de linfocitos (178), y que las poliaminas tienen importantes funciones en el control de la traducción (233).

Por las razones expuestas, el presente trabajo tiene los siguientes objetivos:

- I) Caracterización del inhibidor de la síntesis proteica de linfocitos en reposo y estudio de su mecanismo de acción.
- II) Inhibición de la síntesis de poliaminas y su efecto sobre la estimulación de linfocitos.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en los experimentos que se describen en este trabajo son: Dextrano (PM: 5×10^5), Ficoll, Glutamina, N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico (Hepes), sal de potasio del ácido poliuridílico, EGTA, ADP, ATP, Fosfocreatina, Creatinina fosfoquinasa, tripsina, quimotripsina, Proteasas de *Bacillus subtilis* y *amyloliquefaciens*, Deoxicolato de sodio, Quitina, Tritón X-100, Ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, ácido aurintricarboxílico y edeína de laboratorios Sigma; Hypaque de Farmasa Farmacéutica Argentina; fitohemoaglutinina de Wellcome; Kryo EOB de Procter & Gamble; NP 40 de Shell; Heparina de Laboratorios Abbott; Estreptomocina de Lepetit; Penicilina G sódica de Squibb; Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM); Medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), Suero Fetal Bovino y Suero de Caballo de GIBCO; Nucleasa de *Staphilococcus aureus* de P-L Biochemicals; Sephadex G-25 y G-75 de Pharmacia; DEAE-celulosa y fosfo-celulosa de laboratorios SERVA; Sacarosa de Schwarz-Mann; germen de trigo de General Mills; esparsomicina de Upjohn. Todas las sustancias radioactivas fueron adquiridas de New England Nuclear.

Buffer salino fosfato (PBS): cada 1.000 ml contiene 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na_2HPO_4 ; 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$;

0,1 g de CaCl_2 y 0,01 g rojo fenol.

Buffer A: 20 mM Hepes (K) pH 7,4; 100 mM KCl; 4 mM MgCl_2 y 5 mM 2-mercaptoetanol.

Los buffers que se utilizaron para los fraccionamientos en sistemas convencionales contenían 10 mM Tris-ClH pH 7,4-7,5; 4 mM MgCl_2 y KCl a las siguientes concentraciones: B: 25 mM; C: 50 mM; D: 100 mM; E: 250 mM y F: 500 mM.

2. Purificación y cultivo de linfocitos

Los linfocitos se purificaron a partir de sangre periférica de dadores normales, utilizando una modificación del método descrito por Cooper (193) y Fridlender y col. (234): 500 ml de sangre venosa heparinizada se dejan sedimentar durante 90 minutos a temperatura ambiente en presencia de 0,6% de Dextrano. Luego se toma la fase plasmática rica en leucocitos, se agrega 5'-ADP (10 ug/ml) para producir la agregación de las plaquetas y se pasa rápidamente a través de una columna que contiene 4 g de fibra de nylon equilibrada con solución salina de buffer fosfato (PBS). De esta manera se retienen, además de las plaquetas, muchos de los leucocitos adherentes. El percolado se centrifuga durante 10 minutos a 400 x g y el sedimento celular se resuspende en 60 ml de PBS dividiendo la suspensión en 4

partes iguales. Cada una de ellas se coloca sobre un tubo que contiene 10 ml de una mezcla de Ficoll 12%, Hypaque sódico 50% y H₂O, cuya densidad es de $1,077 \pm 0,001$ g/ml. Se centrifuga durante 30 minutos a 400 x g para eliminar los eritrocitos y granulocitos que sedimentan en el fondo del tubo. Se recoge la interfase donde quedan las células mononucleares (linfocitos y monocitos) que se lavan por dilución con PBS y posterior centrifugación a 400 x g durante 10 minutos. Las células así obtenidas se resuspenden a una concentración de $1-2 \times 10^6$ cél/ml en un medio de cultivo adecuado, y se colocan en un erlenmeyer de 2 litros a 37°C durante 2 horas. Luego se resuspenden los linfocitos por rotación suave pasándolos a un nuevo recipiente. En esta última etapa se separan los macrófagos por sus propiedades de adhesión al vidrio. Los linfocitos purificados (aproximadamente 98%) se cultivan a 37°C en estufa con flujo de aire -5% CO₂.

Para obtener cultivos estimulados se agrega 1-2 ug de FHA ó 2-3 ug de Con A por ml.

3. Medios de cultivo

Los linfocitos a partir de los cuales se obtuvieron fracciones subcelulares y factor inhibitorio fueron cultivados en MEM, que contenía 20 mM Hepes (KOH) pH 7,4 y 10% SFB.

Los cultivos de linfocitos realizados con el objeto de estudiar el efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas se realizaron en medio RPMI 1640 con 10% de SAI (suero autólogo inactivado) por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, previamente dializado durante 6 horas contra 0,9% de NaCl al 0,9%.

A ambos medios se les agrega Glutamina (2 mM), Estreptomycin (200 ug/ml) y Penicilina G(Na) (200 U/ml).

4. Incorporación "in vivo" de timidina-(³H) en DNA

A distintos tiempos después de comenzados los cultivos (con y sin mitógeno), se tomaron muestras de 2 ml (1×10^6 cél/ml) y se reincubaron durante 2 horas a 37°C en estufa de flujo de aire-5% CO₂ en presencia de 0,5 uCi de timidina-(³H) (actividad específica 54 Ci/mmol). Posteriormente, se separaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de agua fría; después de 10 minutos se precipitó con TCA (concentración final 7%). Los precipitados se filtraron a través de filtros de vidrio y se lavó sucesivamente con HCl 0,2 N, HCl 0,05 N y etanol. Después de secar, se midió la radioactividad retenida en los filtros utilizando un contador de centelleo líquido.

5. Incorporación "in vivo" de aminoácidos radioactivos en proteínas

A distintos tiempos de cultivo se tomaron muestras que contenían 2×10^6 cél/ml y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 10 minutos. Posteriormente, en los casos en que se utilizó leucina- (^3H) , se resuspendieron en RPMI 1640 sin leucina con 10% SAI a una concentración de 4×10^6 cél/ml, y se incubaron en presencia de 1 uCi de leucina- (^3H) (actividad específica 110 Ci/mmol). En el caso de utilizar una mezcla de aminoácidos (^{14}C), se aspiró parte del medio hasta dejar las células a una concentración de 4×10^6 cél/ml y se agregó 1 uCi de aminoácidos- (^{14}C) (actividad específica promedio 250 mCi/mmol). Luego de incubar durante 2 horas a $37^\circ C$ en estufa con flujo de aire-5% CO_2 , las células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 10 minutos, se resuspendieron en 1 ml de agua fría y se dejaron a $0^\circ C$ durante 15 minutos; luego se agregó 0,5 ml de NaOH 1 N se incubó durante 15 minutos a $37^\circ C$ y posteriormente se agregó 1 ml de TCA al 25%, dejando el precipitado a $0^\circ C$ durante 30 minutos. Se filtró a través de discos de fibra de vidrio, se lavó varias veces con TCA 8% y luego de secar se midió la radioactividad retenida en un contador de centelleo.

6. Preparación de fracciones subcelulares de linfocitos y de I.T.

Los linfocitos se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en un buffer hipotónico que contenía 20 mM Hepes (K) pH 7,4, 10 mM KCl, 4 mM MgAc₂, y 5 mM 2-mercaptoetanol. Luego de 10 minutos a 4°C, se agregó igual volumen de buffer 20 mM Hepes (K) pH 7,4, 190 mM KCl, 4 mM MgAc₂, 5 mM 2-mercaptoetanol y 0,16% del detergente Kyro EOB. Después de mantener a 4°C de 15 a 20 minutos agitando ocasionalmente, se centrifugó 10 minutos a 10.000 x g, y se separó el sobrenadante que constituye la fracción S₁₀.

Para preparar el factor inhibitorio (IT) se centrifugó el extracto S₁₀ a 150.000 x g durante 3 horas y los ribosomas se resuspendieron en buffer A (20 mM Hepes (K) pH 7,4, 100 mM KAc, 4 mM MgAc₂ y 5 mM 2-mercaptoetanol). Luego se aumentó la concentración de KAc a 0,5 M y después de 45 minutos a 4°C, se centrifugó a 150.000 x g durante 3 horas. El sobrenadante resultante se dializó durante 12 horas contra buffer A.

7. Preparación de extracto de germen de trigo (S₂₃)

El extracto libre de células de germen de trigo (S₂₃) se preparó según la técnica de Roberts y Paterson (235), modificada por Abraham y col. (236): 5 g de germen de trigo fueron sometidos a una molienda en un mortero preenfriado con 5 g de perlas de vidrio y 15 ml de una solución que contenía 20 mM Hepes (K) pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM MgAc₂ y 2 mM CaCl₂. La suspensión resultante se centrifugó durante 10 minutos a 23.000 x g y se recogió el sobrenadante descartado el precipitado y la capa superior lipídica. Luego se pasó 3 veces por una columna de quitina (1 cm x 0,5 cm), equilibrada con buffer 20 mM Hepes (K) pH 7,4, 120 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 1 mM DTT. La columna de quitina se preparó lavándola con NaCl 1% a 50°C, AcH 1% a 50°C hasta absorción nula del eluato a 280 nm y luego con EDTA 10 mM, buffer Ac-/ACH 0,05 M pH 4,5 que contenía 0,25 M de KCl, buffer fosfato 0,05 M pH 7 y finalmente con el buffer en que se pasa la muestra. Los eluatos de la columna de quitina se pasaron por una columna de "Sephadex G-25 (Course)" (50 cm x 2 cm), equilibrada con el mismo buffer que se utilizó en la columna de quitina. Después de eluir con el mismo buffer y juntar las fracciones de máxima absorbancia a 260 nm (aproximadamente 10-15 ml), éstos se centrifugaron a 23.000

x g durante 10 minutos. El sobrenadante se fraccionó en pequeñas alícuotas que se guardaron congeladas a -70°C . Todas las operaciones se realizaron entre $0-4^{\circ}\text{C}$.

El tratamiento de un extracto de germen de trigo a través de la columna de quitina le aumenta la estabilidad y elimina un inhibidor, pues permite tener mayor actividad de síntesis de polipéptidos en un rango más amplio de concentraciones de extracto como se ve en la Fig. 6. La Fig. 7 muestra la actividad del extracto purificado a través de una columna de quitina en función de la concentración de Mg^{2+} . La actividad máxima se obtiene a $6,5 \text{ mM Mg}^{2+}$, concentración levemente superior al óptimo requerido por el extracto que no se purifica mediante la columna de quitina. La concentración óptima de Mg^{2+} varía de preparación a preparación, por lo tanto se determinó en cada caso.

Durante el presente trabajo se utilizó siempre $0,25$ ó $0,5$ unidades de D.O. a 260 nm de extracto por ensayo. Si bien con estas concentraciones no hay diferencias de actividad entre extractos purificados o no con quitina, el tratamiento con esta columna es conveniente pues aumenta la estabilidad de las preparaciones.

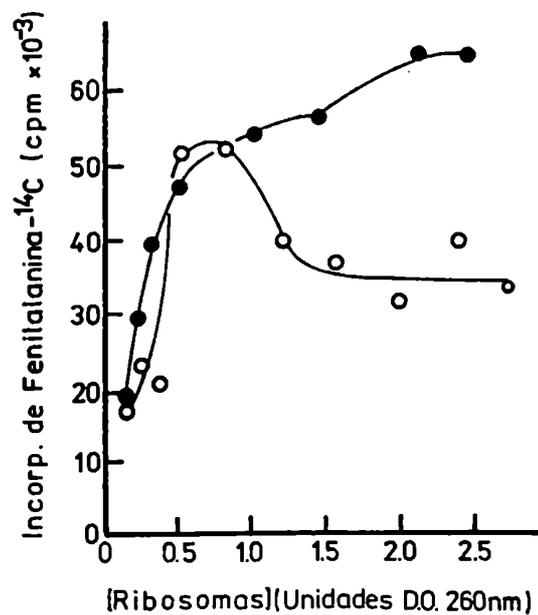


Fig. 7: Curva de concentración de extracto. Se midió la traducción dirigida por PoTi(U) en la mezcla de incubación "standard" utilizando las concentraciones indicadas de extracto tratado con quitina (●) o no tratado con quitina (○). El ensayo se realizó a una concentración de Mg^{2+} de 6 mM.

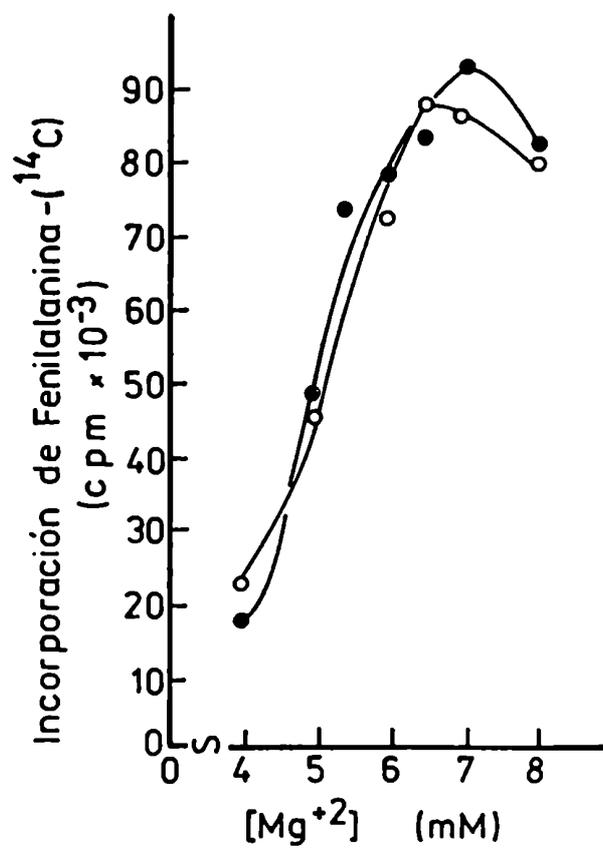


Fig. 8: Curva de concentración de Mg²⁺. Se midió la incorporación de fenilalanina-(¹⁴C) en el sistema de ensayo "standard" en presencia de 0,5 (○) o 1 U (●) de DO a 260 nm y a las concentraciones de Mg²⁺ que se indican.

8. Síntesis "in vitro" de polifenilalanina

La mezcla de incubación se realizó en un volumen final de 0,05 ml y contenía: 20 mM buffer Hepes (K) pH 7,6, 1 mM ATP, 0,02 mM GTP, 8 mM fosfocreatinina, 2 ug de fosfocreatinina quinasa, 10 ug de tRNA de germen de trigo, 6 mM MgAc₂, 100-110 mM KAc, 0,25 a 0,5 unidades de absorbancia (a 260 nm) de extracto de germen de trigo (S23), 40 ug de Poly (U) y 0,05 uCi de (¹⁴C)-fenilalanina.

Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a 27°C; la reacción se detuvo por agregado de 1 ml de H₂O fría que contenía 1 mg de fenilalanina y 50 ug de albúmina sérica bovina como "carrier". Luego de añadir 0,5 ml de NaOH 1 N se continuó la incubación durante 15 minutos más a 27°C, con el fin de hidrolizar los aminoacil-tRNA. Posteriormente, se agregó ácido tricloroacético frío (concentración final 10%) y se recogió el precipitado en filtros de fibra de vidrio (GF/C); se lavó con ácido tricloroacético al 8%, se secó y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

9. Preparación de polisomas de hígado de rata o cobayo

Se siguió la técnica de Ramsey y Steele (237), pero agregando a todas las soluciones 10-20% de fracción sobrenadante de alta velocidad (S₁₅₀) de hígado de rata para inhi-

bir la actividad ribonucleásica (238).

9.1. Preparación de la fracción de alta velocidad (S₁₅₀) de hígado de rata (239)

Se decapitaron 6-8 ratas mantenidas a dieta normal. Se extrajeron los hígados rápidamente y se colocaron en sacarosa 0,25 M a 0°C. Todas las operaciones siguientes se realizaron entre 0-4°C.

Los hígados se escurrieron, se pesaron, se desmenuzaron con tijeras y se resuspendieron en 2 volúmenes de sacarosa 0,25 M en Tris-ClH 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM, MgAcetato 5 mM (TKM) que contenía DTT 1 mM. Luego de homogeneizar mecánicamente, se centrifugó durante 10 minutos a 17.000 x g. Se recogió el sobrenadante, descartándose el precipitado y la fase lipídica superior, y se centrifugó durante 2,5 hs a 150.000 x g (50.000 rpm en centrífuga Spinco utilizando rotor 50Ti). Se recogieron las 4/5 partes superiores del sobrenadante, que constituyen la fracción S₁₅₀, y se guardaron a -70°C.

9.2. Purificación parcial de la fracción S₁₅₀

8-10 ml de la fracción S₁₅₀ se ajustaron a 0,1 M Tris y pH 6,5 con buffer Tris-ClH M pH 7,5 y ácido AcH M. Se agregó solución neutralizada de sulfato de protamina (10 mg/ml) hasta una concentración final de 0,17 mg/ml.

Después de 30 minutos a 0°C se centrifugó a 10.000

x g durante 15 minutos, descartándose el precipitado protamina-RNA y recogiendo el sobrenadante. A esta fracción se agregó sulfato de amonio sólido hasta alcanzar el 40% de saturación. Después de 30 minutos a 0°C, se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 x g y se agregó al sobrenadante más sulfato de amonio hasta alcanzar el 70% de saturación. Luego de 30 minutos a 0°C y centrifugación de 15 minutos a 10.000 x g, se descartó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 8 ml de 20 mM Tris-ClH pH 7,5, 1 mM DTT y 0,1 mM EDTA. La solución se dializó contra 1 lt de 20 mM Tris-ClH pH 7,5 que contenía 3 mM 2-mercaptoetanol y 0,1 mM EDTA durante 3-4 hs con un cambio de líquido de diálisis. Se agregó 1 mM DTT y 10% de glicerol a la preparación que se guardó a -70°C, fraccionada en pequeñas alícuotas.

9.3. Preparación de polisomas (libres y unidos a membrana) a partir de hígado de rata o cobayo

Varias ratas o cobayos mantenidos con dieta normal se decapitaron extrayendo los hígados como se describió en (9.1.). Todas las operaciones se realizaron en frío. Luego de desmenuzar los hígados, se resuspendieron en 4 volúmenes de sacarosa 0,25 M que contenía 10% de fracción S₁₅₀, 50 mM Tris-ClH pH 7,5, 250 mM KCl y 5 mM MgAc₂, y se homogeneizaron suavemente en forma mecánica. La suspensión se trató con "alfa" amilasa cristalina (10 unidades/ml de

extracto de hígado) y 0,1 mM de CaCl_2 durante 15 minutos a 4°C , luego se centrifugó a 1.500 rpm durante 2-4 minutos y se descartó el precipitado. Después de centrifugar nuevamente durante 20 minutos a $70.000 \times g$ (23.000 rpm) en rotor SW 25.2, se separó cuidadosamente el sobrenadante que contenía los polisomas libres del precipitado de microsomas.

A la fracción sobrenadante con los polisomas libres se agregó Tritón X-100 y deoxicolato de Na hasta concentraciones finales de 1 y 0,5% respectivamente. Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a $22.000 \times g$ durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante, que luego se centrifugó sobre capas de sacarosa.

El precipitado de microsomas se homogeneizó en 10 ml de una solución que contenía 50% de S_{150} , 250 mM KCl y 20 mM MgAc_2 . Se centrifugó durante 5 minutos a $1.500 \times g$ y el sobrenadante se recentrifugó a $17.000 \times g$ durante 10 minutos. La fracción sobrenadante que se obtuvo en esta etapa se dividió en dos porciones. Una de ellas se centrifugó directamente sobre capas de sacarosa. La otra se trató con Tritón X-100 y deoxicolato a concentraciones de 1 y 0,5% respectivamente y, luego de centrifugar a $22.000 \times g$ durante 5 minutos, el sobrenadante se sometió a la centrifugación sobre capas de sacarosa.

Centrifugación sobre capas de sacarosa: En tubos del rotor 50 Ti se prepararon las capas de sacarosa que se indican en la Fig. 8, y sobre ellas se colocaron cuidadosamente 5 ml de cada fracción (polisomas libres, microsomas sin tratar o tratados con detergente). Se centrifugó durante 12-16 horas a 50.000 rpm en rotor 50 Ti (150.000 x g). En los tubos en que se sembró fracción que contenía polisomas libres o microsomas tratados con detergente (polisomas despegados de membranas), se aspiró suavemente el sobrenadante, cada precipitado se lavó por rotación suave con una solución que contenía Tris-HCl 10 mM pH 7,5, KCl 10 mM y MgAc₂ 1,5 mM (10/10/1,5). En los tubos en los que se sembraron microsomas se descartó la fase superior y se recogió la fase intermedia, que se diluyó (1/1) con TKM que contenía 1 mM DTT. Las suspensiones resultantes se colocaron sobre capas de 2 ml de sacarosa 1 M en TKM (1 mM DTT) y se centrifugaron a 150.000 x g durante 90 minutos. El precipitado obtenido, como así también los polisomas libres y los despegados de membranas se guardaron congelados a -70°C. Antes de usar se resuspendieron en buffer 10/10/1,5.

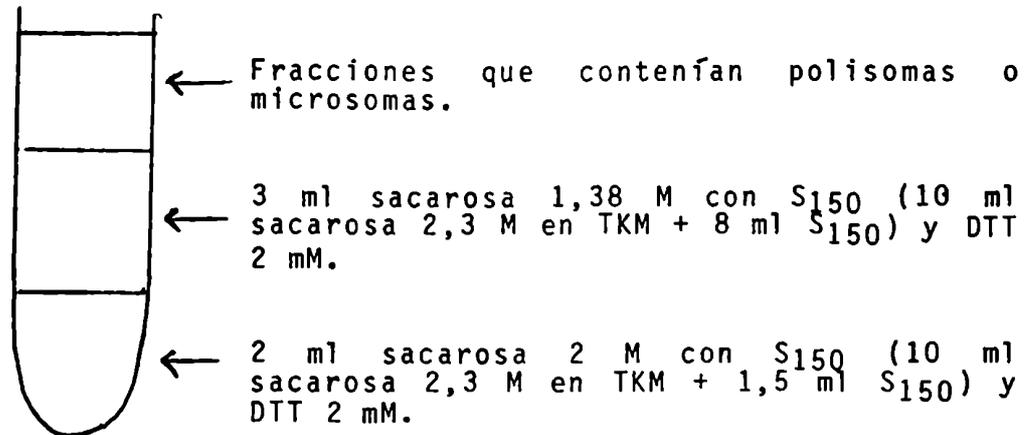


Fig. 9.- Capas de sacarosa para preparar polisomas o microsomas.

10. Síntesis "in vitro" dirigida por mensajeros endógenos de hígado de rata

La mezcla de incubación para la síntesis polipeptídica con polisomas de hígado de rata se realizó en un volumen total de 0,075 ml y contenía buffer Hepes (K) pH 7,6, 20 mM; 90 mM KAc; 3,5 mM MgAc₂; 1 mM ATP; 0,02 mM GTP; 8 mM fosfocreatina; 3 ug de fosfocreatina quinasa; 2 mM ditionitrosol; 7,5 ug de tRNA de hígado de rata; 0,03 mM de cada uno de 19 aminoácidos excepto metionina; 5 uCi de metionina-(³⁵S) (1.000 Ci/mmol); 20-40 ug de proteínas de fracción sobrenadante y 0,5 unidades de absorbancia a 260 nm

de suspensión de polisomas. El ácido aurintricarboxílico, la esparsomicina y el lavado ribosomal de linfocitos se agregaron según lo indicado en cada experimento. Las incubaciones se realizaron a 27°C y se tomaron alícuotas de 10 ul de la mezcla de reacción a diferentes tiempos. Luego se midió la radioactividad en el material insoluble en ácido tricloroacético como se describió más arriba.

11. Obtención de RNA ribosomal (rRNA) de germen de trigo

Se preparó un extracto (S30) a partir de 60 g de germen de trigo utilizando un procedimiento similar al descrito más arriba. Luego de pasar el extracto por una columna de "Sephadex G-25", se separaron los ribosomas por centrifugación a 150.000 x g durante 3 horas. El precipitado obtenido se lavó con buffer 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ y luego se resuspendió en 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂. Se realizaron dos extracciones sucesivas con fenol saturado con buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) en presencia de 0,5% SDS y 0,2 M NaCl. La fase acuosa resultante se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto en presencia de NaCl 0,2 M. Se dejó durante 24 horas a -20°C. El precipitado obtenido por centrifugación a 16.000 rpm por 30 minutos se liofilizó.

La composición del rRNA se analizó por centrifuga-

ción en un gradiente de sacarosa de 5-25%.

Preparación de rRNA-celulosa: Con el rRNA así obtenido que contenía fundamentalmente un pico de 18 S se preparó rRNA-celulosa según la técnica de Fedoroff y col. (240). Para ello se resuspendieron 20 mg de rRNA en una solución que contenía 35% de etanol absoluto y 65% de buffer 50 mM Tris-HCl pH 6,85, con 0,1 M NaCl y 1 mM EDTA, agregando luego 5 g de celulosa previamente lavada con etanol absoluto. Se dejó la suspensión (10 ml) durante una hora a temperatura ambiente y luego se agregó etanol absoluto filtrando al vacío a través de papel Whatman N°3. Se resuspendió el precipitado en etanol absoluto que contenía 10 mM MgAc₂: 0,6 g rRNA-celulosa cada 20 ml de etanol y se irradió con luz U.V. de 254 nm a 10 cm de distancia durante 80-90 minutos. Se filtró al vacío lavando el material con etanol absoluto y luego con buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,6 que contenía 0,8 M KCl, 14 mM MSH y 10% glicerol (v/v), hasta que el líquido de lavado no mostró más absorbancia a 260 nm.

Midiendo la absorbancia a 260 nm del rRNA que se puso en contacto con la celulosa, se calculó que se pegaron 30 unidades de D.O. a 260 nm/g de celulosa, lo que corresponde a 1,5 mg de rRNA/g de celulosa (considerando que 1 g de RNA tiene una absorbancia a 260 nm de 20).

12. Análisis mediante gradientes de sacarosa

Las partículas que difieren en tamaño pero que poseen la misma densidad se pueden separar por sus distintas velocidades de sedimentación en gradientes de sacarosa. La densidad máxima de la sacarosa en estos gradientes es menor que la de la partícula más densa que se somete a la centrifugación; por lo tanto, la centrifugación debe realizarse por menor tiempo que el necesario para que la partícula de mayor coeficiente de sedimentación llegue al fondo.

12.1. Sedimentación y análisis de polirribosomas

Se usaron gradientes lineales de sacarosa de 15 a 45%, preparados con una bomba peristáltica. Las soluciones de sacarosa contenían 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM KCl y 5 mM MgAc₂. Después de preparar los gradientes, se dejaron en la heladera por lo menos una hora.

Los polirribosomas se resuspendieron en TKM, se sembraron 1,5 unidades de D.O. a 260 nm en cada tubo y se centrifugaron durante 45 minutos a 45.000 rpm utilizando un rotor SW 50,1. Después de la centrifugación, se extrajo el contenido de uno de los tubos empujando desde el fondo con una solución de sacarosa más concentrada (55%) y se analizaron los gradientes registrando la absorbancia a 254 nm en

un analizador de gradientes ISCO, equipado con una celda de flujo.

12.2. Sedimentación y análisis de RNA ribosomal

Para analizar el rRNA se utilizaron gradientes de 5-25% de sacarosa en buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,6, que contenía 150 mM NaCl y 0,5% SDS. Para ello, el rRNA se resuspendió en una solución 20 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, sembrando luego en el gradiente 1 a 2 unidades de absorbancia a 260 nm.

Se centrifugó durante 135 minutos a 45.000 rpm en un rotor SW 50-1. La distribución de RNA se determinó con un analizador de gradientes ISCO a 254 nm.

III. RESULTADOS

1. Caracterización del sistema de linfocitos: condiciones de estimulación

Los linfocitos humanos periféricos son células metabólicamente en estado de reposo que pueden ser inducidas a transformarse en linfoblastos por acción de mitógenos tales como la fitohemoaglutinina (FHA) y la concanavalina A (Con A). El efecto del agregado de mitógenos a linfocitos en cultivo ha sido bien estudiado. Las células sufren una serie de cambios metabólicos que incluyen un marcado aumento de la síntesis de RNA y proteínas, y la iniciación de la replicación del DNA alcanzando un estado de activa proliferación (188,189).

Con el objeto de caracterizar al sistema, se realizaron estudios preliminares para determinar las condiciones óptimas de estimulación. Para ello se midió la síntesis de DNA de linfocitos inducidos a proliferar en diferentes condiciones, determinando la incorporación de Timidina-(³H) en pulsos de 2 horas de duración.

1.1. Concentración del mitógeno

En la Fig. 10 se observa el efecto del agregado de diferentes concentraciones de FHA y Con A a linfocitos en cultivo. La estimulación de la síntesis de DNA fue del mismo orden independientemente del medio de cultivo utilizado (MEM ó RPMI 1640).

En los experimentos siguientes de inducción de blastogénesis se utilizó 1 ug de FHA/ml ó 2 a 3 ug de Con A/ml. En el caso de FHA el óptimo se obtiene a una concentración menor que la elegida, pero a 0,5 ug/ml la situación es límite y cualquier error en la dilución o en la medida del volumen puede producir una estimulación menor.

1.2. Requerimientos del suero

Los requerimientos nutritivos mínimos para el cultivo de células en general, y para la proliferación de linfocitos en particular, fueron determinadas estudiando la necesidad de factores esenciales para el crecimiento tales como aminoácidos, hidratos de carbono, vitaminas y sales que constituyen el medio de cultivo definido. El factor indefinido del crecimiento lo constituye el suero. Aunque se han aislado algunos factores séricos esenciales para el crecimiento celular (por ejemplo "Epidermal Growth Factor") aún existe controversia en cuanto a la cantidad y calidad de los

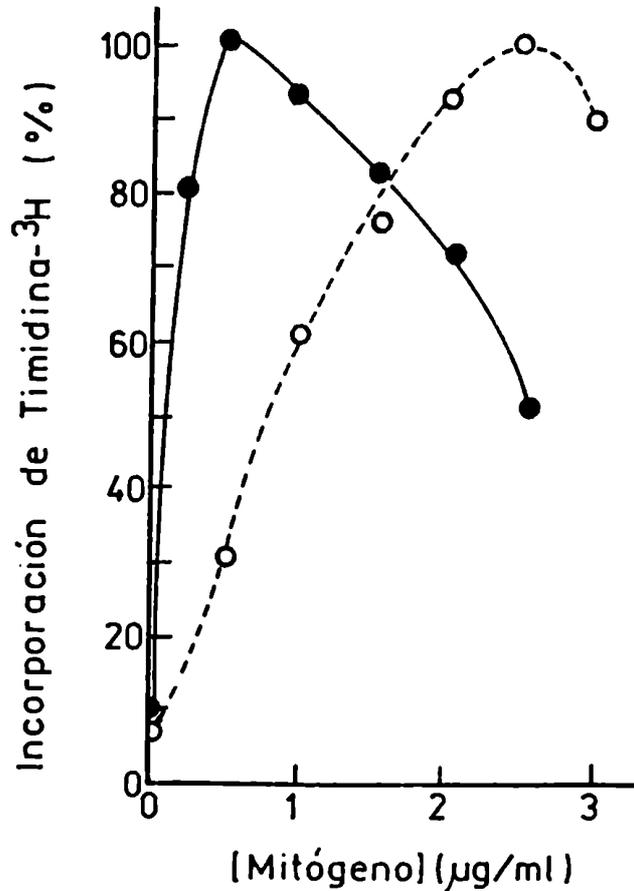


Fig. 10: Curva de concentración del mitógeno. Cultivos que contenían 1×10^6 linfocitos/ml se estimularon con cantidades crecientes de FHA (●) ó Con A (○). Luego de 72 hs se tomaron alícuotas de 2×10^6 células y se midió la incorporación "in vivo" de timidina (³H) en material TCA insoluble. El medio de cultivo utilizado fue MEM ó RPMI 1640, en presencia de 10% de SFB. 100% corresponde a 77.638 cpm y 99.980 cpm para FHA y Con A, respectivamente.

componentes de origen sérico necesarios para la proliferación. Por esta razón, se analizó qué tipo de suero se requería para la proliferación de linfocitos. Para ello se estimularon las células con FHA durante 72 hs, en MEM ó RPMI 1640 y en presencia de 10% de diferentes tipos de suero.

La Fig. 11 muestra que el efecto del SFB sobre la proliferación es comparable al del SA y del SAI, en tanto que el SC solo permite una estimulación menor.

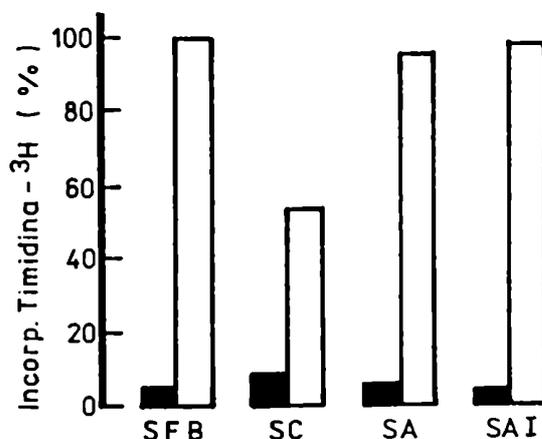


Fig. 11: Efecto del suero. 1×10^6 cél/ml se cultivaron durante 72 hs en presencia (□) o ausencia (■) de FHA, en MEM ó RPMI 1640 que contenía 10% de SFB (suero fetal bovino), SC (suero de caballo), SA (suero autólogo), SAI (suero autólogo inactivado); luego se midió incorporación "in vivo" de timidina (³H) en material TCA insoluble.

1.3. Velocidad de síntesis de DNA

La Fig. 12 muestra la velocidad de incorporación de Timidina radioactiva a material insoluble en TCA en linfocitos mantenidos en estado de reposo durante tiempos variables antes del agregado del agente mitogénico.

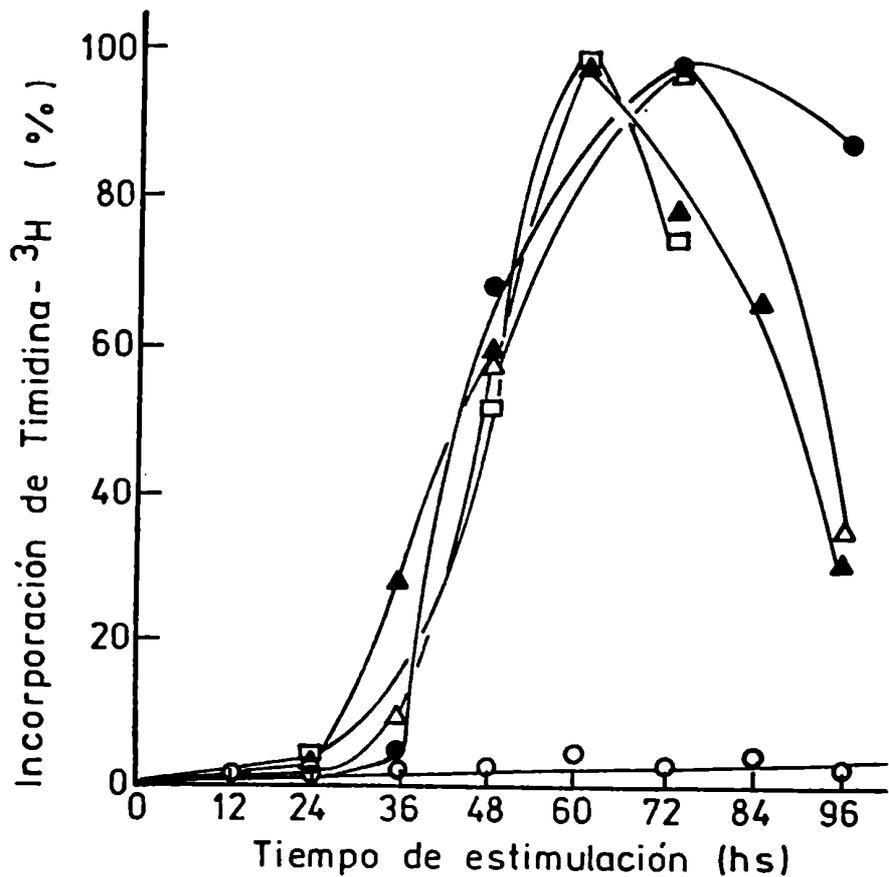


Fig. 12: Velocidad de síntesis de DNA. Efecto del agregado de FHA a cultivos mantenidos en estado de reposo durante tiempos variables. 1×10^6 células/ml fueron cultivadas en ausencia de FHA (\circ) o en presencia de FHA luego de permanecer en cultivo en estado de reposo: 0 hs (\bullet), 24 hs (Δ), 48 hs (\blacktriangle) y 72 hs (\square). A los tiempos que se indican se tomaron alícuotas de 2 ml de cultivo y se midió incorporación de timidina (^3H) a material TCA insoluble.

2. Inhibidor de traducción (IT) obtenido de linfocitos en reposo

2.1. Caracterización

2.1.1. Efecto del lavado ribosomal sobre la traducción en sistemas heterólogos

Trabajos previos (215,241) demostraron la existencia de un factor inhibitorio de la traducción (IT) asociado a ribosomas de linfocitos en reposo, que desaparece cuando los linfocitos son estimulados con FHA. Los resultados indicaron que el factor es capaz de bloquear la traducción dirigida por Poly(U) o por mRNAs endógenos en un sistema libre de células homólogo preparado a partir de linfocitos activados, y que la etapa afectada parecía ser la elongación.

Para confirmar esta posibilidad, se midió el efecto del IT sobre diferentes sistemas libres de células de eucariotes, como los obtenidos de germen de trigo y de hígado de rata. En la Fig. 13 se observa que el factor extraído de ribosomas de linfocitos en reposo inhibe marcadamente la traducción dirigida por Poli(U) o RNA mensajero endógeno en sistemas de germen de trigo e hígado de rata, respectivamente; el lavado ribosomal obtenido a partir de linfocitos estimulados produce solo una ligera inhibición en ambos sistemas. Estos resultados prácticamente idénticos a los obtenidos con el sistema de linfocitos, permitieron ini-

ciar un estudio más detallado del IT, evitando el uso de linfocitos humanos en la preparación de sistemas libres de células necesarios para ensayar la síntesis proteica.

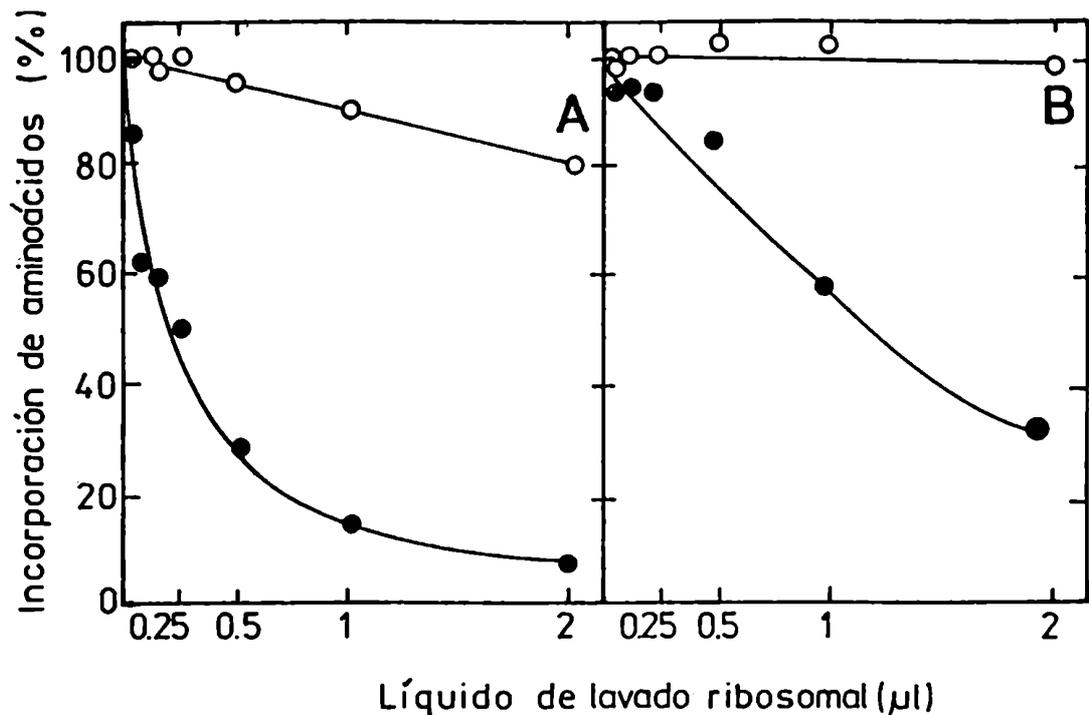


Fig. 13: Efecto de IT en sistemas heterólogos. Efecto del lavado ribosomal obtenido a partir de linfocitos en reposo (●) o estimulados (○) sobre la síntesis polipeptídica: (A) síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo; (B) síntesis de polipéptidos dirigida por RNA mensajeros endógenos en sistema de hígado de rata. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. En los controles realizados en ausencia de lavado ribosomal (100%), la incorporación de fenilalanina (^{14}C) en (A) y de metionina (^{35}S) en (B) fue de 51.530 cpm y 103.945 cpm, respectivamente. Ambos líquidos de lavado ribosomal contenían 5 mg/ml de proteínas.

2.1.2. Efecto de la fracción post ribosomal sobre la traducción

Se investigó la presencia del factor inhibitorio en la fracción post-ribosomal, sobrenadante de 150.000 x g (S₁₅₀) de los extractos de linfocitos. Para ello se midió el efecto del agregado del lavado ribosomal y su correspondiente S₁₅₀ sobre la síntesis de polifenilalanina en sistema de germen de trigo. En la Fig. 14 se muestran los resultados obtenidos. Estos resultados y los que se muestran más adelante (propiedades, mecanismo de acción y actividad nucleolítica) indican que la actividad inhibitoria de la traducción de la fracción S₁₅₀ es similar a la correspondiente al lavado ribosomal. Este hecho permitió disponer de mayor cantidad de material para encarar los estudios, utilizando como fuente de inhibidor la fracción S₁₅₀.

2.2. Propiedades

2.2.1. Estudios sobre la naturaleza del factor

Con el objeto de identificar y purificar el IT se analizó el efecto de diferentes agentes sobre los extractos de linfocitos. En esta serie de ensayos se utilizó una dilución del factor capaz de inhibir en un 50% la síntesis de polifenilalanina en el sistema de germen de trigo.

(A) Sensibilidad a la temperatura: Los extractos de

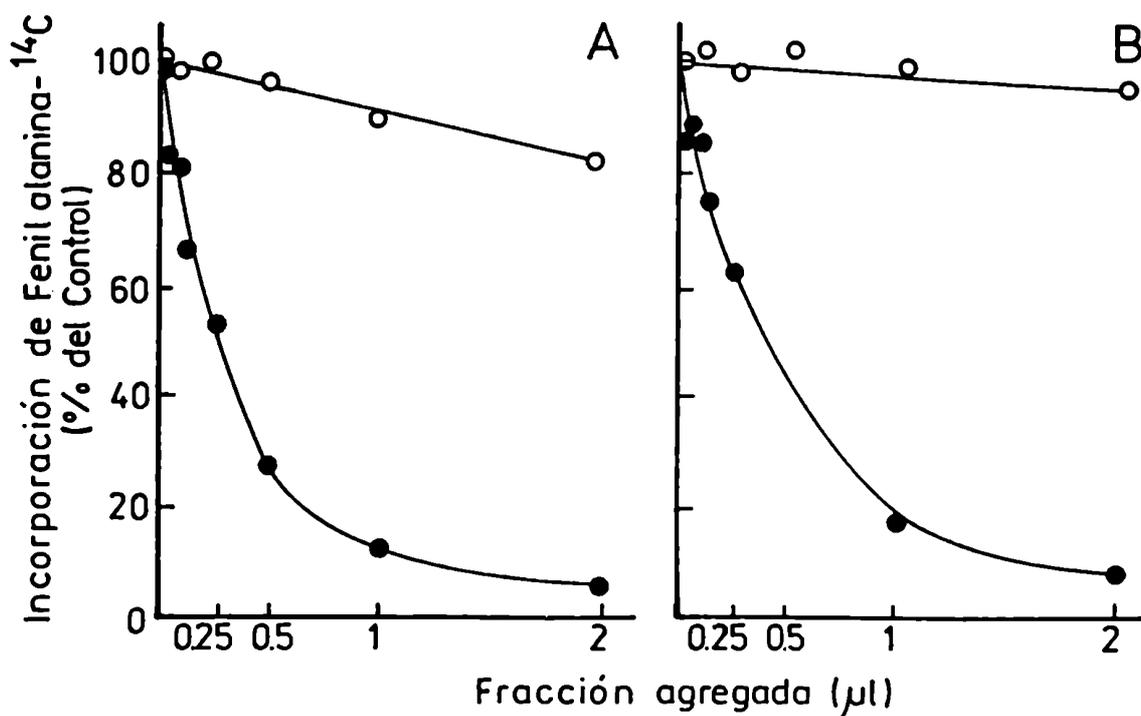


Fig. 14: Actividad inhibitoria de la fracción S₁₅₀. Efecto de (A) lavado ribosomal y (B) la fracción S₁₅₀ sobre la síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo. Las fracciones obtenidas de linfocitos en reposo (●) ó estimulados (○) se ensayaron como se indica en Materiales y Métodos. Todas las fracciones ensayadas contenían 1 mg/ml de proteínas. En los controles realizados en ausencia de lavado ribosomal o fracción S₁₅₀ (100%) la incorporación de fenilalanina (^{14}C) fue de 64.417 cpm.

linfocitos en reposo (lavado ribosomal y S₁₅₀) se incubaron durante 5 minutos a diferentes temperaturas; luego se ensayó la actividad residual del factor sobre la síntesis de polifenilalanina "in vitro" en un sistema de germen de trigo.

Los resultados de la Tabla 5 indican que la actividad inhibitoria de ambas fracciones es parcialmente termoestable, ya que solo pierden el 25% de su capacidad inhibitoria luego de un calentamiento de 5 minutos a 90°C.

Tabla 5: Sensibilidad a la temperatura de IT

Temperatura (°C)	Pérdida de la actividad inhibitoria (%)	
	Lavado ribosomal	S ₁₅₀
0	0	0
50	0	0
70	0	0
80		11
90	25	25

Las fracciones sometidas a un calentamiento a distintas temperaturas se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se centrifugaron a 12.000 x g durante 1 minuto. Se ensayó la actividad residual del sobrenadante sobre la síntesis de polifenilalanina en un extracto de germen de trigo. En cada caso se restó la radioactividad incorporada en ausencia de Poli(U) (blanco de reacción).

(B) Acción de proteasas: Para realizar este estudio se seleccionaron previamente proteasas cuya actividad pudiera bloquearse antes de medir la síntesis de polifenilalanina "in vitro" para no alterar el ensayo de la actividad del factor.

La Tabla 6 da la síntesis de polifenilalanina en presencia de distintas proteasas previamente tratadas con Trasylol o calentadas con el objeto de inhibir la actividad proteolítica. Es interesante señalar que, utilizando inhibidor de tripsina o PMSF, no se logró detener la acción proteolítica de la tripsina ni la de quimiotripsina en las condiciones de nuestros ensayos.

Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizó tripsina, quimiotripsina y proteasa de *B. amyloliquefaciens* para ensayar la sensibilidad del IT a la acción de proteasas.

Los datos de la Tabla 7 demuestran que la actividad inhibitoria es totalmente resistente a la acción de las proteasas ensayadas.

Tabla 6: Inactivación de proteasas

Proteasa	Inhibidor de actividad proteolítica	Síntesis de polifenilalanina residual (%)
Tripsina (100 ug/ml) (1)	Trasylo1 (600 U/ml)	50
Quimiotripsina (100 ug/ml) (1)	Trasylo1 (600 U/ml)	60
Pronasa B (5 ug/ml) (2)	Calentamiento 5 min a 75°C	20
Proteasa de <i>B. subtilis</i> (5 ug/ml) (2)	Calentamiento 5 min a 75°C	0
Proteasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> (5 ug/ml) (2)	Calentamiento 5 min a 75°C	57

Las enzimas se incubaron durante (1) 1 h a 30°C ó (2) 12 hs a 30°C en 100 mM Tris-AcH pH 7,6 que contenía 10 mM Ca²⁺. Luego de agregar Trasylo1 o de calentar según se indica, se incorporaron a un ensayo "standard" de síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo. La síntesis de polifenilalanina en presencia de las enzimas sin inhibir fue menor del 5% respecto del control (100% de incorporación corresponde a la síntesis en ausencia de agregados).

Tabla 7: Acción de proteasas

Agregados al sistema de síntesis de polifenilalanina	Actividad inhibitoria residual (%)
Lavado ribosomal	100
Lavado ribosomal + tripsina	87
Lavado ribosomal + quimiotripsina	99
Lavado ribosomal + proteasa de <i>B. amyloliquefaciens</i>	96,5
S ₁₅₀	90
S ₁₅₀ + proteasa de <i>B. amyloliquefaciens</i>	78

En los casos en que se indican los extractos de linfocitos fueron incubados a 30°C durante 1 hora en presencia de tripsina o quimiotripsina o durante 18 hs en presencia de proteasa de B.a. (relación 1/100 de proteasa a extracto de linfocitos). La acción de la tripsina y quimiotripsina se detuvo por agregado de 600 U/ml de Trasylol y la de proteasa de *B. amyloliquefaciens*, por calentamiento durante 5 minutos a 75°C antes de iniciar el ensayo de la síntesis de polifenilalanina. La mezcla de reacción control con lavado ribosomal o S₁₅₀ sin tratar incluye la proteasa utilizada en cada caso previamente inactivada.

(C) Acción de nucleasas: La Tabla 8 indica que la actividad inhibitoria también es totalmente resistente a la acción de ribonucleasa estafilocócica. La acción de esta enzima es dependiente de la presencia de Ca^{2+} y por lo tanto se puede detener antes del ensayo de síntesis de polifenilalanina por agregado de EGTA que compleja el Ca^{2+} .

Tabla 8: Acción de ribonucleasa

Agregados al sistema de síntesis de polifenilalanina	Actividad inhibitoria residual (%)
Lavado ribosomal	100
Lavado ribosomal + nucleasa stafilocócica	103

El lavado ribosomal se incubó solo o en presencia de 10 ug/ml de ribonucleasa stafilocócica y 0,2 mM Ca^{2+} durante 1 h a 30°C. Se detiene la acción de la enzima por agregado de EGTA 0,48 mM y se agrega un sistema de germen de trigo midiendo luego la síntesis de polifenilalanina.

(D) Tratamiento con sulfato de amonio: El experimento se realizó agregando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido a la fracción S150 hasta alcanzar las concentraciones de 30 y 70% de saturación. Los precipitados obtenidos entre 0-30% y 30-70% de saturación de sulfato de amonio se resuspendieron en 0,5 ml de Buffer A y se dializaron contra el mismo buffer. También se dializó el sobrenadante que queda después de la precipitación con sulfato de amonio al 70%. Luego se midió el efecto del agregado de cada una de las fracciones obtenidas sobre la síntesis de proteínas dirigida por Poli(U) en sistema de germen de trigo.

Los resultados de la Tabla 9 muestran que la actividad inhibitoria de la traducción precipita preferentemente entre 30 y 70% de saturación de sulfato de amonio, aunque parte de la actividad queda en las otras fracciones.

Tabla 9: Precipitación con sulfato de amonio

Agregados al sistema de síntesis de polifenilalanina	Actividad de síntesis de polifenilalanina (%)	
	Exp. A	Exp. B
Ninguno	100	100
S150	1,5	7,3
Fracción ppda. por sulfato de amonio entre:		
0-30% saturación	45	82,1
30-70% saturación	6,5	35,7
Sobrenadante de sulfato de amonio al 70% de saturación	26,4	47,7

El sistema de síntesis sin ningún agregado (100% de actividad) incorporó 45.047 cpm.

(E) Tratamiento con ácido tricloroacético: Se agregó ác. TCA (concentración final del 10%) a la fracción S₁₅₀ y después de separar el precipitado formado se midió la actividad inhibitoria residual del sobrenadante. La Tabla 10 indica que en dicho sobrenadante se recuperó muy poca actividad inhibitoria.

Tabla 10: Acción de ác. TCA

Agregados al sistema de síntesis de polifenilalanina	Actividad inhibitoria residual (%)
IT	100
IT + ác TCA	19,7

Luego de agregar ác. TCA a la fracción S₁₅₀ (conc. final 10%) se dejó durante 30 minutos a 0°C. Se centrifugó a 12.000 x g durante 5 minutos a 0°C y se dializó el sobrenadante contra buffer A. Se midió la actividad inhibitoria residual en el sobrenadante agregando una alícuota del mismo al ensayo "standard" de síntesis de polifenilalanina.

(F) Tratamiento alcalino: La fracción post ribosomal se sometió a la acción de KOH 0,4 M durante 30 minutos a 37°C y luego de neutralizada y dializada, se midió su efecto sobre la síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo. Los resultados de la Fig. 15 demuestran que el inhibidor es parcialmente lábil al tratamiento alcalino.

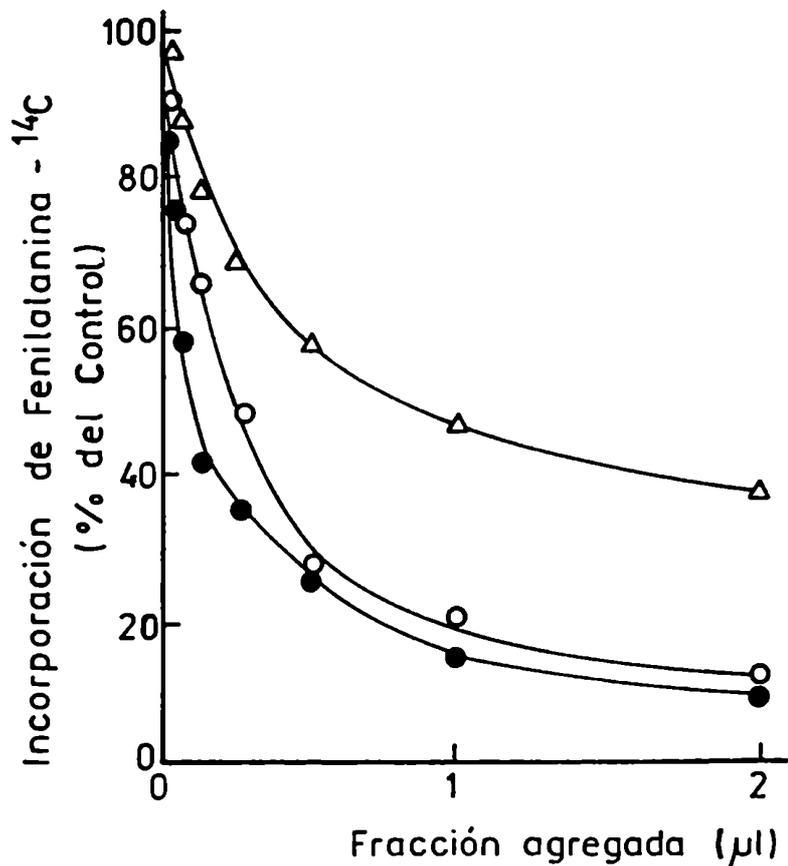


Fig. 15: Efecto del tratamiento alcalino. Se midió la actividad inhibitoria de la traducción de la fracción S_{150} sin tratar (●) o preincubada durante 30 minutos a 37°C en ausencia (○) o presencia (Δ) de KOH 0,4 M. En los controles (100%) se incorporaron 64.288 cpm.

(G) Fenolización de la fracción S₁₅₀: Dado que el IT resultó resistente a la acción de proteasas y de ribonucleasa stafilocócica y que fue además parcialmente lábil al tratamiento alcalino, se investigó si podía ser extraído con fenol como sucede con los ácidos nucleicos. Para ello se midió la presencia o ausencia de IT en la capa acuosa que queda luego del tratamiento con fenol.

Los resultados (Tabla 11) muestran que el inhibidor no se comporta como un ácido nucleico en cuanto a su posible extracción con fenol. La recuperación de material luego del tratamiento se controló fenolizando la fracción S₁₅₀ en presencia de una cantidad conocida de tRNA de germen de trigo. Como se indica en la Tabla 12, la fase acuosa que se recupera no solo no tiene actividad inhibitoria de traducción sino que estimula la síntesis de polifenilalanina en la misma proporción que una cantidad equivalente de tRNA de germen de trigo, indicando una recuperación cuantitativa de ácidos nucleicos después de la fenolización.

Tabla 11: Efecto de la fenolización sobre IT

Agregados al sistema de síntesis	Incorporación de fenilalanina (^{14}C) (%)
Ninguno	100
S ₁₅₀ 2 u _l	3,5
5 u _l	2,4
S ₁₅₀ tratado con fenol (capa acuosa):	
2 u _l	96,2
5 u _l	81

La fracción S₁₅₀ fue tratada con fenol y la capa acuosa fue precipitada con alcohol como se indica en Materiales y Métodos. El precipitado se resuspendió en un volumen igual al original y se agregaron los volúmenes que se indican al ensayo "standard" de síntesis de polifenilalanina.

Tabla 12: Recuperación del material fenolizado

Agregados al sistema de síntesis	Incorporación de fenilalanina (^{14}C) (cpm)
Ninguno	14.137
tRNA germen de trigo (5 mg/ml)	
0,8 u1	39.972
1,6 u1	44.415
tRNA fenolizado	
0,8 u1	35.910
1,6 u1	44.780

Se fenolizaron 0,1 ml de tRNA de germen de trigo de 5 mg/ml en presencia de S_{150} como se indica en Materiales y Métodos. El precipitado alcohólico de la fase acuosa se resuspendió en un volumen igual al original y se midió su efecto sobre la traducción de Poli(U) en un sistema de germen de trigo. La mezcla de reacción utilizada es la ya descrita en la que se omitió el tRNA.

(H) Efecto del agregado de sulfato de protamina: Se agregó sulfato de protamina a la fracción S₁₅₀ hasta alcanzar una concentración de 0,17 mg/ml en condiciones en que no precipitan proteínas (0,1 M en Tris-ClH, pH 6,5). Se mantuvo a 0°C con agitación durante 30 minutos y luego de centrifugar, se analizó el efecto del sobrenadante sobre la síntesis de polifenilalanina. Los resultados de la Tabla 13 indican que el inhibidor no es precipitable por el sulfato de protamina en estas condiciones.

Tabla 13: Efecto del agregado de sulfato de protamina.

Agregados al sistema de síntesis	Actividad del sistema (%)	
	Exp. A	Exp. B
Ninguno	100	100
S ₁₅₀ 5 u1	19,5	38,6
S ₁₅₀ (0,1M Tris-HCl, pH 6,5) 5 u1	34,4	45
S ₁₅₀ tratado con sulfato de protamina 5 u1	12,7	36

Las fracciones S₁₅₀ ensayadas en cada caso contenían 1 mg/ml de proteína. Luego de agregar sulfato de protamina se dejó a 0°C durante 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos y se ensayó el sobrenadante en el sistema "standard" de síntesis de polifenilalanina. El extracto sin ningún agregado (100%) incorporó 33.139 cpm.

2.2.2. Comportamiento del inhibidor de traducción en sistemas de fraccionamiento convencionales

(A) DEAE-celulosa y "Sephadex" G-75:

Se analizó el comportamiento del IT en DEAE-celulosa. Debido a que el IT es parcialmente termoestable previamente se calentó a 60°C durante 5 minutos, luego de enfriar rápidamente en baño de hielo se centrifugó a 12.000 x g durante 1 minuto, y el sobrenadante se pasó por una columna de DEAE-celulosa. La Fig. 16 muestra la D.O. a 280 nm y el efecto sobre la síntesis de polifenilalanina-(¹⁴C) de cada fracción. La actividad inhibitoria no fue retenida por DEAE-celulosa en las condiciones utilizadas.

Se juntaron las fracciones con mayor actividad (indicadas en el gráfico con una barra). Luego de concentrarlas, se dializaron contra buffer D y se pasaron por una columna de "Sephadex G-75" equilibrada y eluída con el mismo buffer.

La Fig. 17 muestra la D.O. de cada fracción a 280 nm, su actividad inhibitoria sobre la síntesis de polifenilalanina-(¹⁴C) en extracto de germen de trigo, y la calibración previa de la columna con marcadores de Peso Molecular conocido. Pese a que el pico de actividad inhibitoria es muy ancho, se puede calcular que el inhibidor eluye como una

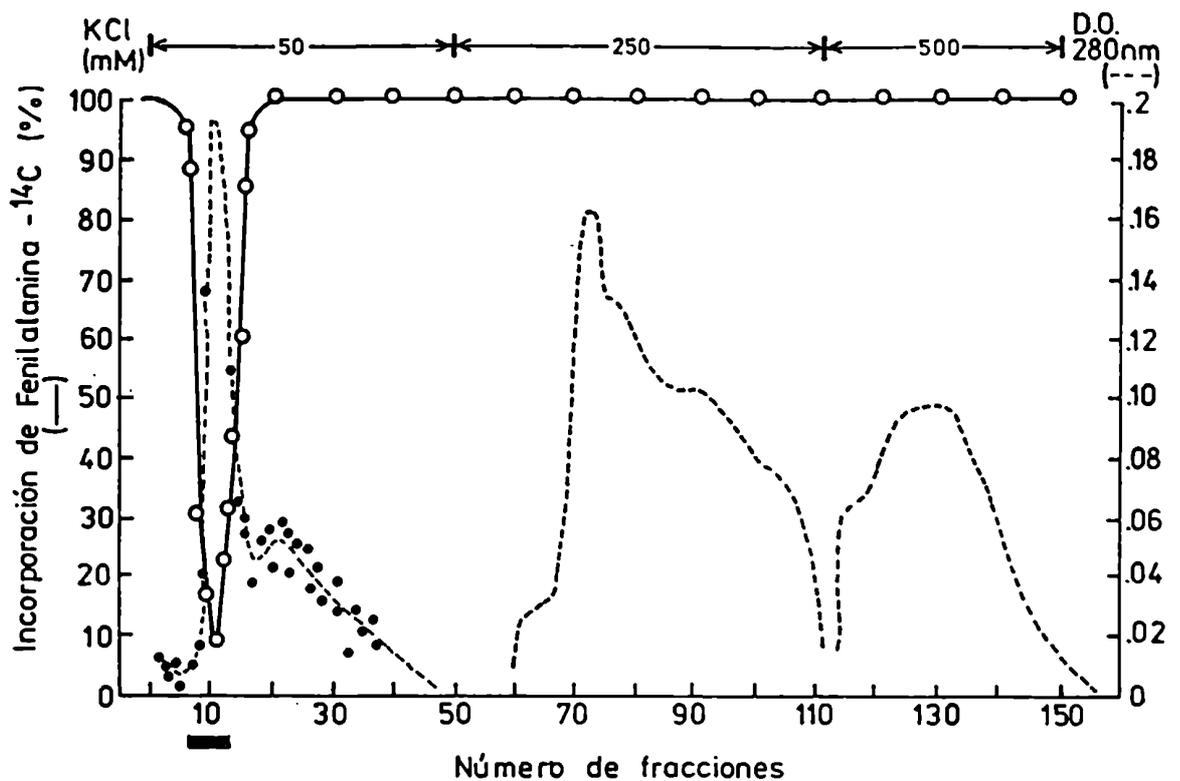


Fig. 16: Columna de DEAE-celulosa (7,4 cm x 1,2 cm) equilibrada con buffer C. Se sembraron 1,5 ml de fracción S₁₅₀ previamente tratada como se indicó y que contenía 1 mg/ml de proteínas. La columna se eluyó con buffers C, E, F, cuyas concentraciones de KCl se indican en el gráfico, recogiendo fracciones de 1 ml. (●---●) D.O. a 280 nm. (○—○) Síntesis de polifenilalanina (¹⁴C) en extracto de germen de trigo expresada en (%). Se ensayaron 2 ul de cada fracción. El sistema sin agregados (100%) incorporó 59.602 cpm.

sustancia de peso molecular de alrededor de 17.000 daltons.

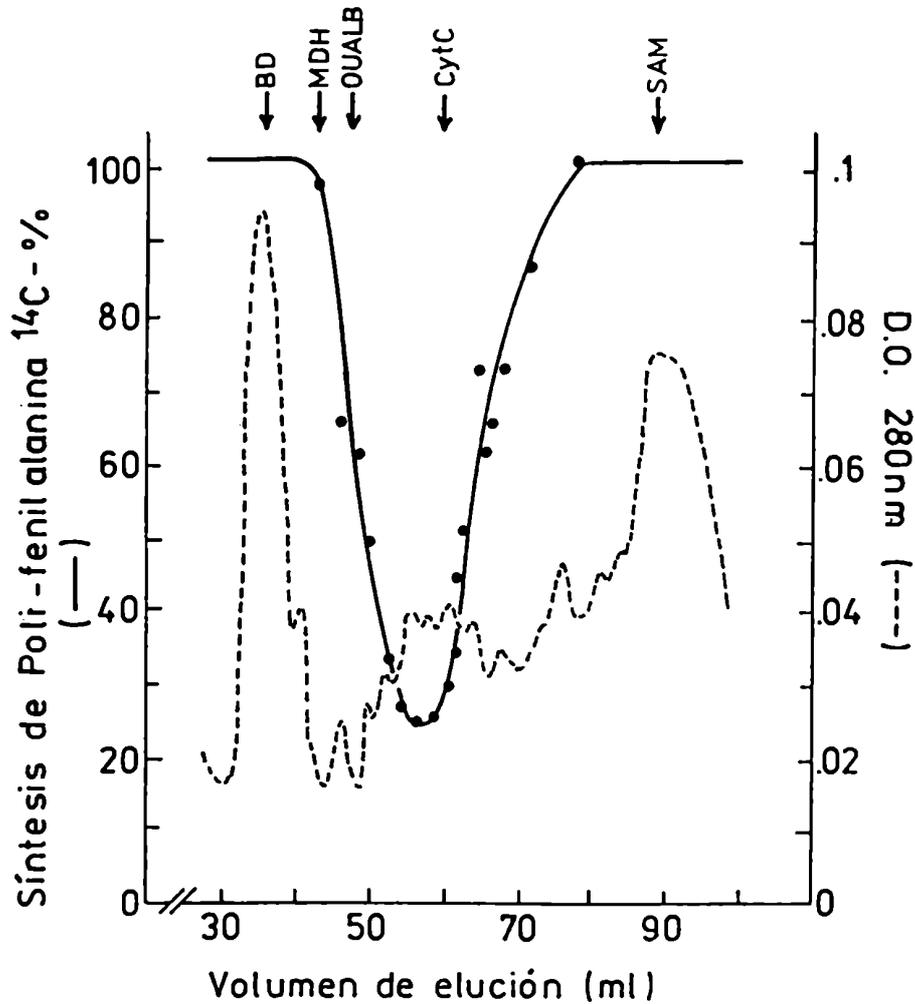


Fig. 17: Columna de "Sephadex G-75" (60 cm x 1,5 cm) equilibrada con buffer D. Se sembró 1 ml del IT que no fue retenido por DEAE-celulosa con un contenido de 0,17 mg/ml de proteínas. (---) D.O. a 280 nm, (●—●) síntesis de polifenilalanina- ^{14}C (%) en presencia de 20 μl de cada fracción. El sistema sin agregados incorporó (100%) 44.635 cpm. (↓) Marcadores de peso molecular conocido: Azul dextrano (AD), málico deshidrogenasa (MDH), ovoalbúmina (OvA), citocromo C (Cyt C), sulfato de amonio (SAM).

(B) DEAE-celulosa y fosfocelulosa:

Se repitió el fraccionamiento en DEAE-celulosa pero sembrando la muestra a menor fuerza iónica. Para ello se equilibraron la muestra y la columna con buffer B (25 mM KCl) y se eluyó con el mismo buffer a las concentraciones de KCl que se indican en la Fig. 18.

Como en el caso ya descrito anteriormente, tampoco a menores fuerzas iónicas la DEAE-celulosa retuvo la actividad inhibitoria. Se juntaron las fracciones con mayor actividad inhibitoria (señaladas con una barra en el gráfico), se concentraron y aplicaron sobre otra columna de fosfocelulosa equilibrada con buffer B, eluyendo con buffers D (100 mM KCl) y E (250 mM KCl). El efecto de cada fracción sobre la síntesis de polifenilalanina- ^{14}C que se muestra en la Fig. 19 indica que el IT es retenido por la fosfocelulosa y puede eluirse de ella con soluciones de KCl 100 mM.

En cada una de las etapas descritas en el punto (B), se midió concentración de proteínas por el método de Lowry (242) y unidades de inhibidor; los datos se resumen en la Tabla 14.

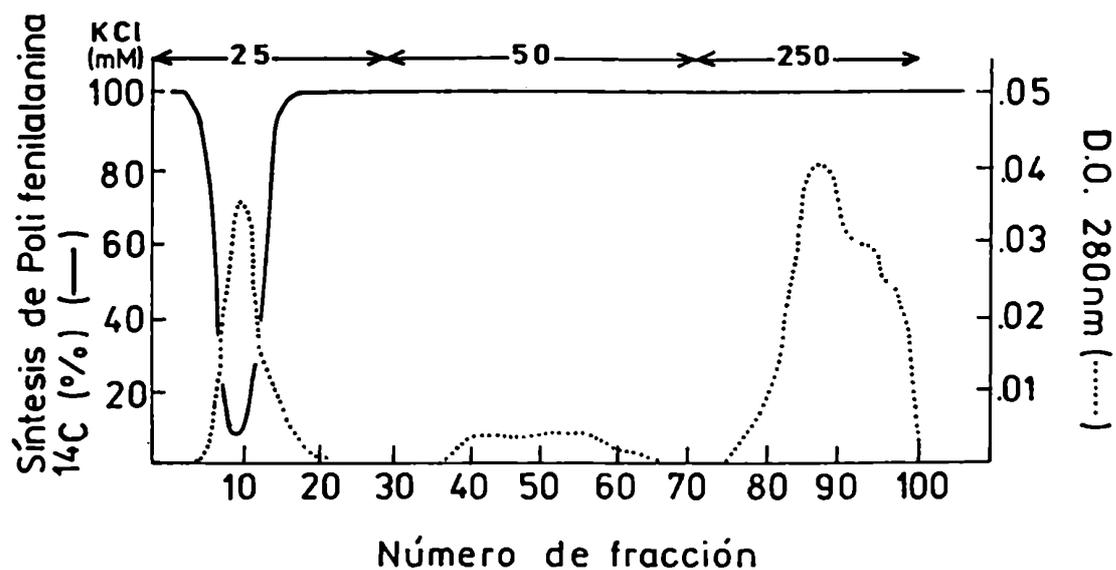


Fig. 18: Columna de DEAE-celulosa (7,4 cm x 1,2 cm) equilibrada con buffer B. Se sembró 1,5 ml de fracción S_{150} que contenía 0,31 mg/ml de proteínas, previamente calentada como ya se indicó. Se recogieron fracciones de 1 ml. (·-·-·) D.O. a 280 nm, (—) síntesis de polifenilalanina (^{14}C) (%) en presencia de 5 μl de cada fracción. El extracto de germen de trigo sin agregados (100%) incorporó 59.812 cpm.

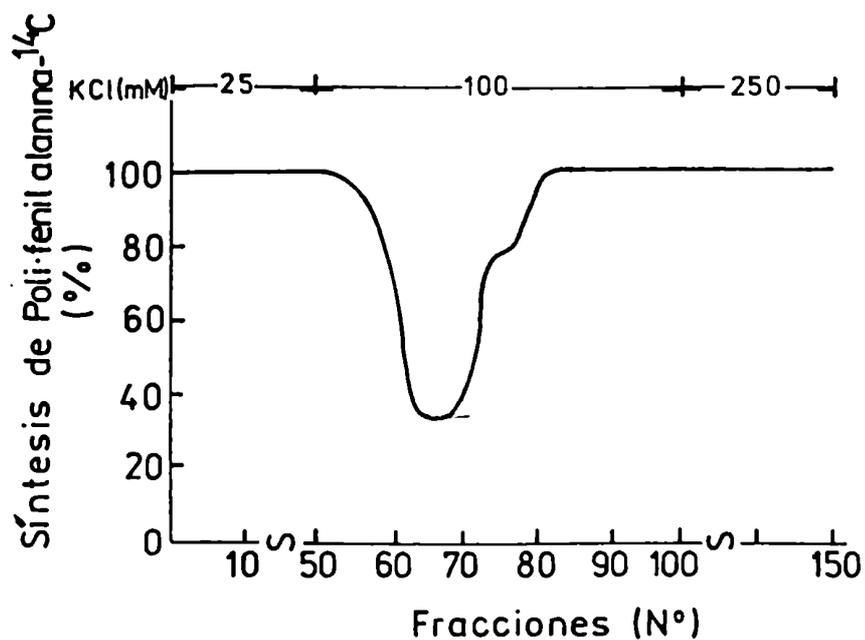


Fig. 19: Columna de fosfocelulosa (12,1 cm x 1,2 cm) equilibrada con buffer B. Se sembró 1 ml de fracción S₁₅₀ no retenida por DEAE-celulosa que contenía 0,03 mg/ml de proteínas. Se recogieron fracciones de 1 ml y se ensayó su actividad inhibitoria agregando 10 ul de cada fracción a un ensayo "standard" de síntesis de polifenilalanina-¹⁴C (—). Síntesis de polifenilalanina-¹⁴C (%). El extracto sin agregados incorporó (100%) 48.160 cpm. Como el contenido de proteínas es muy bajo, fue nula la D.O. a 280 nm de todas las fracciones.

Tabla 14

Etapa	Volumen (ml)	Unidades totales ^(*)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica	Purificación	Rendimiento (%)
S150	2,7	5.684	1,46	3.893	1	100
S150 0 5'	2,7	5.684	0,837	6.790	1,7	100
DEAE-cel	2,2	1.205	0,066	18.258	4,7	21
Fosfo-cel	0,54	69,3	$3,2 \times 10^{-3}$	21.625	5,5	1,2

(*) Se define una unidad de inhibidor como la cantidad necesaria para reducir al 50% la síntesis de polifenilalanina en las condiciones "standard" de ensayo.

(C) Hidroxiapatita:

En experimentos anteriores se vio que la actividad inhibitoria se comportaba como una sustancia de naturaleza básica (no es retenida por DEAE-celulosa pero sí por fosfocelulosa, de la cual se eluye con KCl 100 mM). Por esta razón se estudió el comportamiento del inhibidor en una columna de hidroxiapatita (2 cm x 0,5 cm), eluyendo en condiciones en que se sabe eluyen las proteínas básicas (243). La columna se preparó en buffer fosfato 1 mM pH 6,85. Se sembró la fracción S₁₅₀ previamente dializada contra el mismo buffer; se lavó la columna sucesivamente con (I) NaCl 1 mM, (II) CaCl₂ 3 M, nuevamente con NaCl 1 mM y (III) buffer fosfato 1 M pH 6,8. Cada fracción eluída de la columna se concentró a 3 ml, y se dializó contra buffer B. Luego se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (242) y el efecto de una alícuota de 10 ul de cada fracción sobre la síntesis de polifenilalanina-(¹⁴C) en extracto de germen de trigo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	Inhibición de la traducción (%)
Muestra sembrada en la columna de hidroxiapatita	0,5	0,7	95
Fracción (I) (NaCl 1 mM)	7	0,06	0
Fracción (II) (CaCl ₂ 3 M)	7,5	0,017	21
Fracción (III) (buffer fosfato 1 M)	7,5	0,1	-10

Estos resultados indican que el factor se fija fuertemente a hidroxiapatita, de la cual solo se recupera parcialmente con CaCl₂ 3 M.

(D) rRNA-celulosa:

Recientemente se ha descrito la purificación de factores de iniciación de síntesis de proteínas por afinidad a RNA ribosomal (rRNA) en columnas de rRNA-celulosa (244-245). Debido a que la actividad inhibitoria de la síntesis de proteínas aislada de linfocitos en reposo se encuentra en parte asociada a los ribosomas, se probó su comportamiento en una columna de rRNA-celulosa. Para ello se preparó rRNA celulosa como se indica en Materiales y Méto-

dos, y este material se resuspendió en buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 14 mM MSH, 10% glicerol (v/v) en presencia de 0,1 M KCl; se preparó una columna (5 cm x 0,5 cm) y se lavó con el mismo buffer hasta reducir a cero la absorción a 280 nm. Se sembró la fracción S₁₅₀ dializada contra el buffer y se eluyó con el mismo buffer a las siguientes concentraciones de KCl (I) 0,1 M, (II) gradiente de 0,1 a 0,5 M y (III) 1 M. Las fracciones obtenidas (de 0,8 ml cada una) fueron dializadas contra el buffer en presencia 0,1 M KCl y se midió el efecto de 10 ul de cada una sobre la síntesis de polifenilalanina-(¹⁴C) en sistema de germen de trigo. La actividad de IT se eluye con la solución de lavado (I).

El factor no fue retenido por la columna, posiblemente porque su afinidad por rRNA es baja en las condiciones usadas o bien porque degrada al rRNA unido a la celulosa.

Aunque se había descrito anteriormente que la actividad inhibitoria de síntesis de proteínas aislada de linfocitos en reposo parecía no tener actividad nucleolítica; a la luz de los experimentos que se describen más adelante puede decirse que el IT no es retenido por la columna porque degrada al rRNA.

Debido a que la cantidad de material proveniente de lavado ribosomal es muy escasa, se estudió solamente su comportamiento en DEAE-celulosa e hidroxapatita. En ambos

casos es idéntico a la actividad inhibitoria de la fracción S150.

Todos los intentos realizados con el objeto de purificar el factor IT dieron una recuperación muy baja. Teniendo en cuenta este hecho y que el material con que se trabaja es de linfocitos humanos y por lo tanto escaso, optamos por no purificar más el IT y estudiar su mecanismo de acción.

2.2.3. Mecanismo de acción del inhibidor de traducción

A) Efectos sobre la cinética de traducción "in vitro" de Poli(U)

(a) De la fracción S150 y del lavado ribosomal:

Resultados anteriores de nuestro laboratorio habían indicado que el lavado ribosomal de linfocitos en reposo ejercía su acción a nivel de elongación (241). Con el propósito de investigar si la fracción S150 inhibía la misma etapa, se comparó la cinética de síntesis de polifenilalanina en ausencia o presencia de esparsomicina, ATA o fracción S150 o lavado ribosomal agregados luego de 10 minutos de incubación (Fig. 20).

El ATA (ácido aurintricarboxílico) es un inhibidor de iniciación y en las condiciones del ensayo, bloquea la formación de complejos de iniciación debidos a asociación

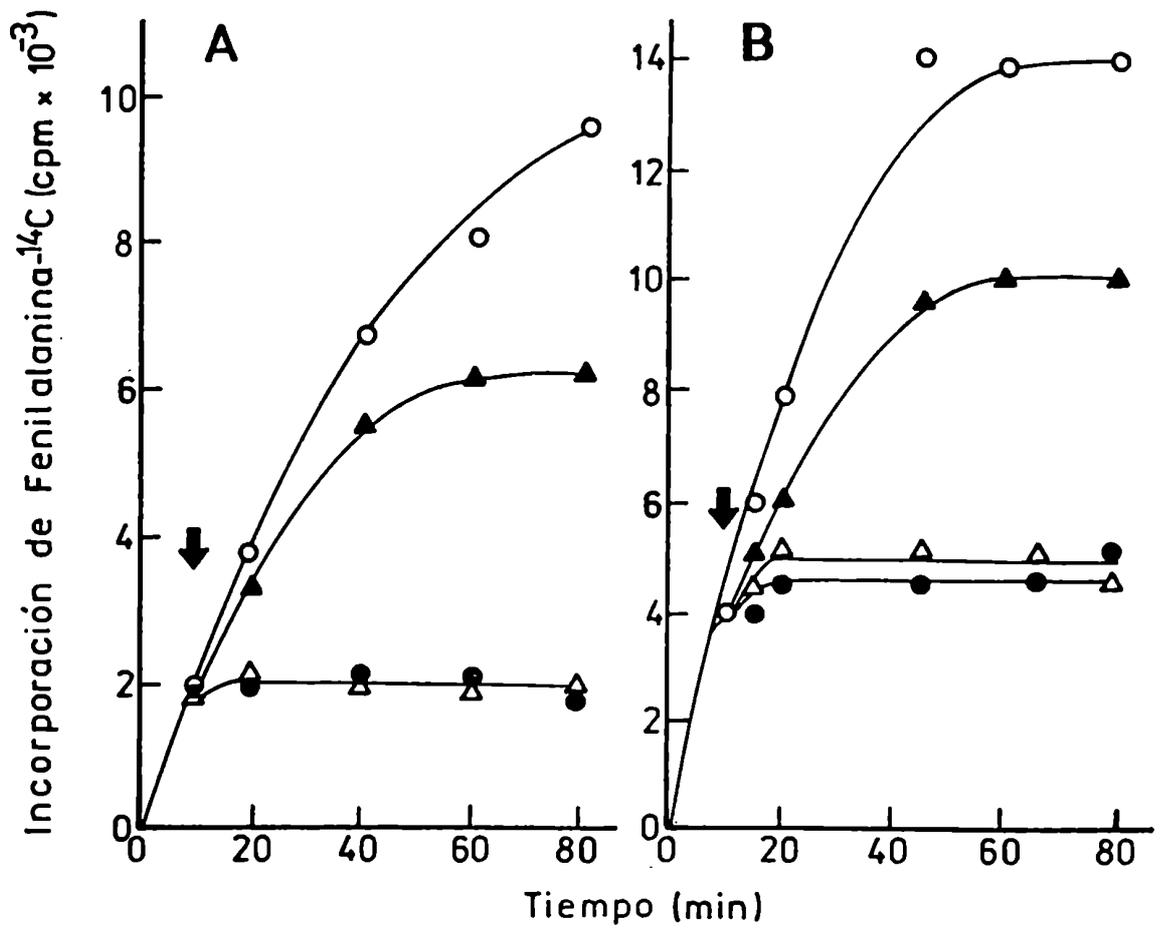


Fig. 20: Efectos comparativos de ATA, esparsomicina e IT sobre la cinética de traducción de Poly(U) en extractos de germen de trigo. La síntesis de polifenilalanina (¹⁴C) se realizó en un ensayo "standard" sin ningún agregado (○) o agregando 7×10^{-5} M ATA (▲), 7×10^{-5} M esparsomicina (△) o 10 ug de lavado ribosomal (●) en A ó 10 ug de S150 (●) en B luego de 10 min de incubación como indica la flecha. A los tiempos que se indican se tomaron alícuotas de 10 ul en las cuales se determinó la radioactividad precipitable por TCA.

tardía del Poli(U) a los ribosomas; por lo tanto disminuye la formación de polipéptidos después de un período de alrededor de 10 minutos. En cambio, la esparsomicina es un inhibidor de elongación y bloquea inmediatamente la incorporación de fenilalanina- (^{14}C) . El agregado del lavado ribosomal (Fig. 20A) o de la fracción S₁₅₀ (Fig. 20B) a la mezcla de incubación produce una inhibición de la síntesis de polifenilalanina con la misma cinética que la esparsomicina.

(b) De las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio:

La Fig. 21 muestra que la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas con sulfato de amonio por encima de 30% de saturación, producen un bloqueo de la traducción que sigue igual cinética a la mostrada por el inhibidor original. En cambio, la fracción que precipita entre 0 y 30% de saturación de sulfato de amonio inhibe la traducción con una cinética correspondiente a un inhibidor de iniciación.

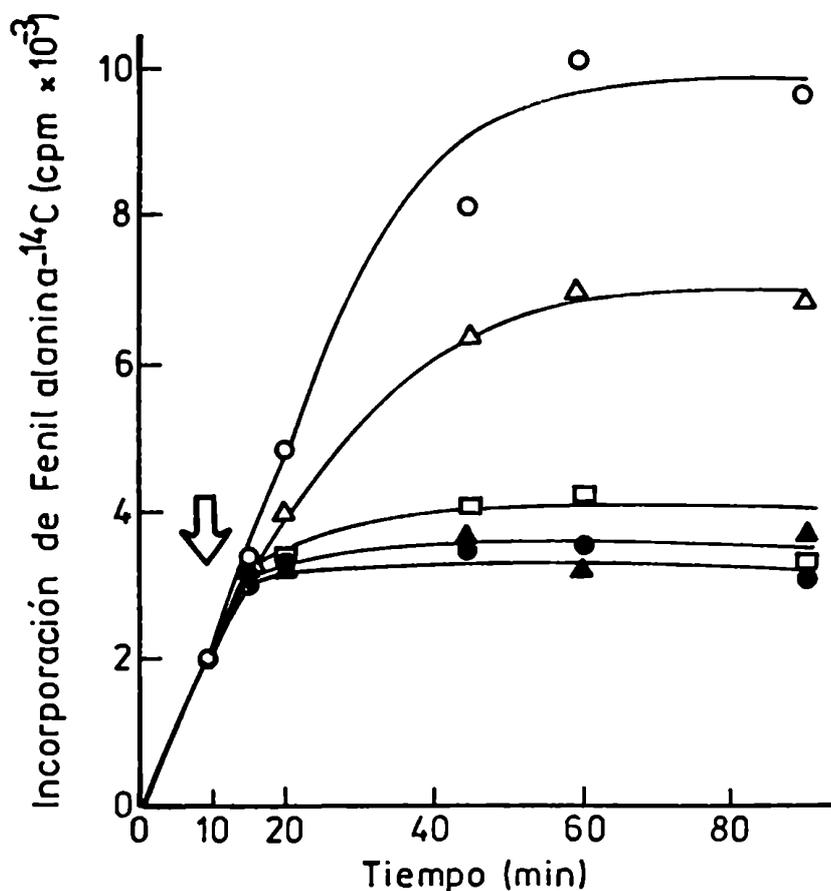


Fig. 21: Cinética de inhibición de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. La síntesis de polifenilalanina (^{14}C) se realizó en un ensayo "standard" sin ningún agregado (O) o agregando luego de 10 minutos de incubación como indica la flecha S150 (●), fracción que precipita con sulfato de amonio entre 0-30% de saturación (Δ), que precipita entre 30-70% de saturación (Δ) ó sobrenadante que queda luego de precipitar con sulfato de amonio entre 30-70% (□). En cada caso se utilizaron 5 μg de proteínas.

B) Efectos sobre la traducción de polisomas de hígado de rata

La iniciación de la traducción con Poli(U) es diferente a la que tiene lugar con RNA mensajeros naturales. Para un mejor conocimiento del modo de acción del IT, se ensayó la actividad del lavado ribosomal sobre un sistema de hígado de rata que contenía polisomas. Los resultados de la Fig. 22 muestran que el ATA también en este sistema es capaz de bloquear la síntesis polipeptídica luego de un período de 5 a 10 minutos durante el cual, presumiblemente, se completan los péptidos nacientes. Esto indica que los polisomas pueden reiniciar la síntesis y que el ATA frena totalmente la reiniciación. En cambio, el agregado de esparsomicina frena instantáneamente la síntesis como se debe esperar para un inhibidor de elongación. Nuevamente el efecto del IT es idéntico al de esparsomicina.

C) Actividad nucleolítica del inhibidor de traducción

Estudios previos parecían indicar que el IT aislado de linfocitos en reposo no tenía actividad nucleolítica, ya que no producía alteraciones en el perfil de distribución de polisomas de linfocitos estimulados luego de una incubación de 15 minutos con el factor (241).

Sin embargo, debido al comportamiento del factor frente a rRNA-celulosa y a su rápida acción sobre la elonga-

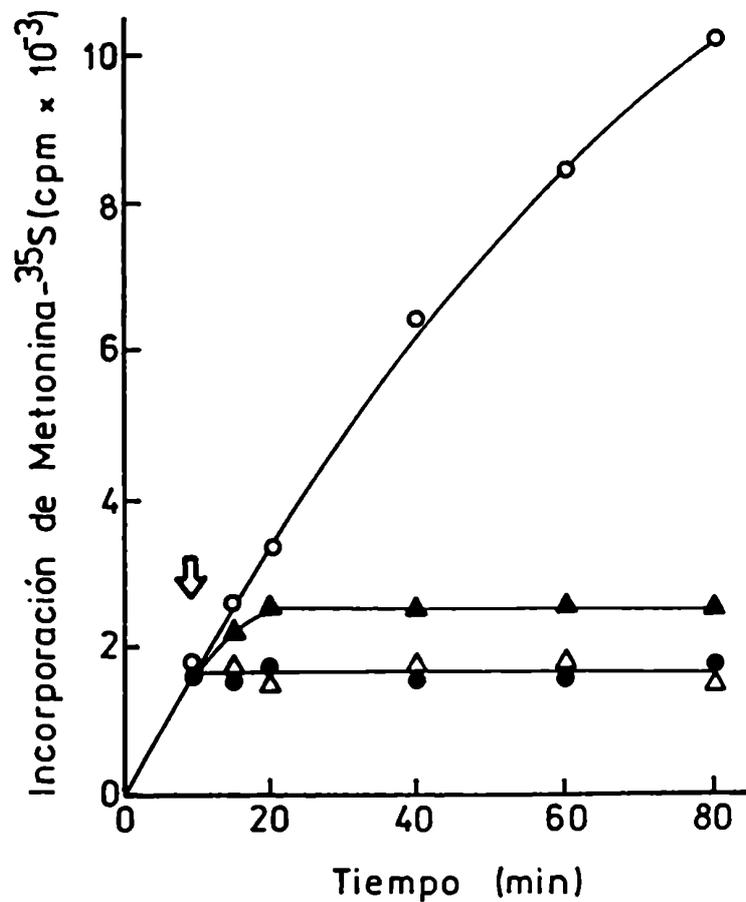


Fig. 22: Efectos de ATA, esparsomicina e IT sobre la cinética de síntesis polipeptídica en polisomas de hígado de rata. Las mezclas de reacción se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. La síntesis polipeptídica fue realizada sin ningún agregado (○) ó con el agregado de 7×10^{-5} M ATA (▲), 7×10^{-5} M esparsomicina (△) o 10 ug IT (●) luego de 10 min de incubación.

ción de la síntesis proteica se decidió reinvestigar su actividad nucleolítica utilizando varios métodos.

a) Degradación de RNA ribosomal de germen de trigo

El rRNA obtenido a partir de germen de trigo se resuspendió en 20 mM Tris-ClH pH 7,4, 14 mM MSH y 10% glicerol (v/v). Se incubó en ausencia o en presencia de lavado ribosomal y S₁₅₀, y se analizó el producto de la reacción por centrifugación en gradientes de sacarosa. Los resultados de la Fig. 23 indican que el IT es capaz de degradar rápidamente al rRNA de germen de trigo.

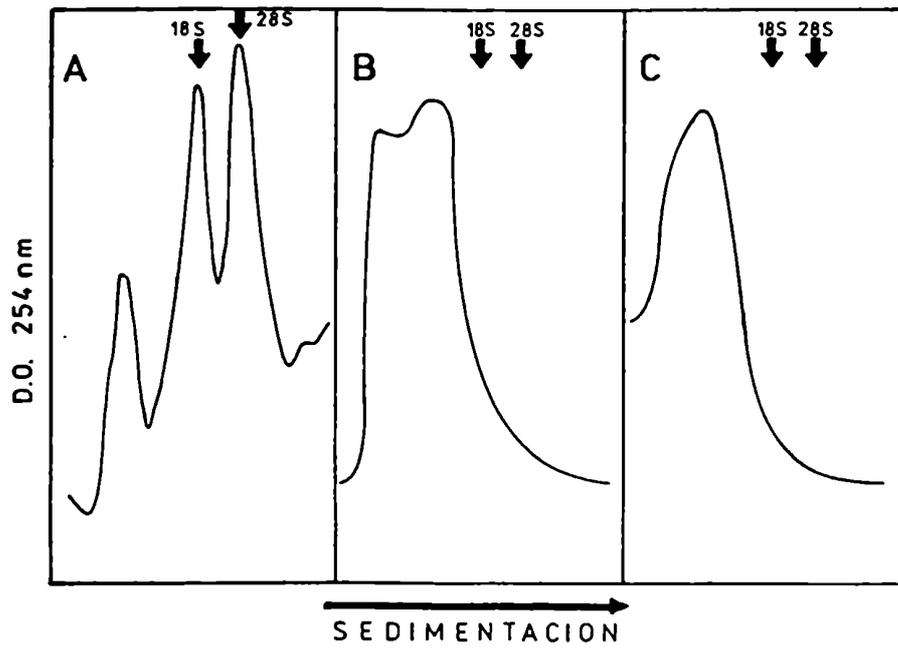


Fig. 23: Análisis en gradientes de sacarosa de 1 U de D.O. a 260 nm de RNA ribosomal de germen de trigo, incubado en ausencia (A) o en presencia de S_{150} (B) o lavado ribosomal (C) (50 ug/ml de proteínas en cada caso). La incubación se realizó durante 15 min a 0°C . Se utilizó un gradiente lineal de 5-20% de sacarosa y se centrifugó como se indica en Materiales y Métodos.

b) Degradación de polisomas de hígado de cobayo

(1) Extractos de linfocitos en reposo:

Se estudió el efecto del lavado ribosomal y la fracción S₁₅₀ parcialmente purificada sobre polisomas de hígado de cobayo. Se incubaron polisomas con un volumen de cada fracción capaz de inhibir el 100% de la síntesis de polifenilalanina-(¹⁴C) en un sistema de germen de trigo. Después de la incubación, se analizó la distribución de polisomas por centrifugación en un gradiente de 15-40% de sacarosa como se describe en Materiales y Métodos. Los perfiles de la Fig. 24 indican que el IT (asociado a ribosomas o post-ribosomal) crudo o parcialmente purificado tiene actividad nucleolítica sobre polisomas de hígado de cobayo. Los agregados polirribosómicos son destruidos y solo aparecen picos de monómeros, dímeros y algo de trímeros después de la incubación con el factor.

(2) Extractos de linfocitos estimulados:

La fracción S₁₅₀ o el lavado ribosomal de linfocitos estimulados no mostraron acción nucleolítica sobre polisomas de hígado de cobayo (Fig. 25).

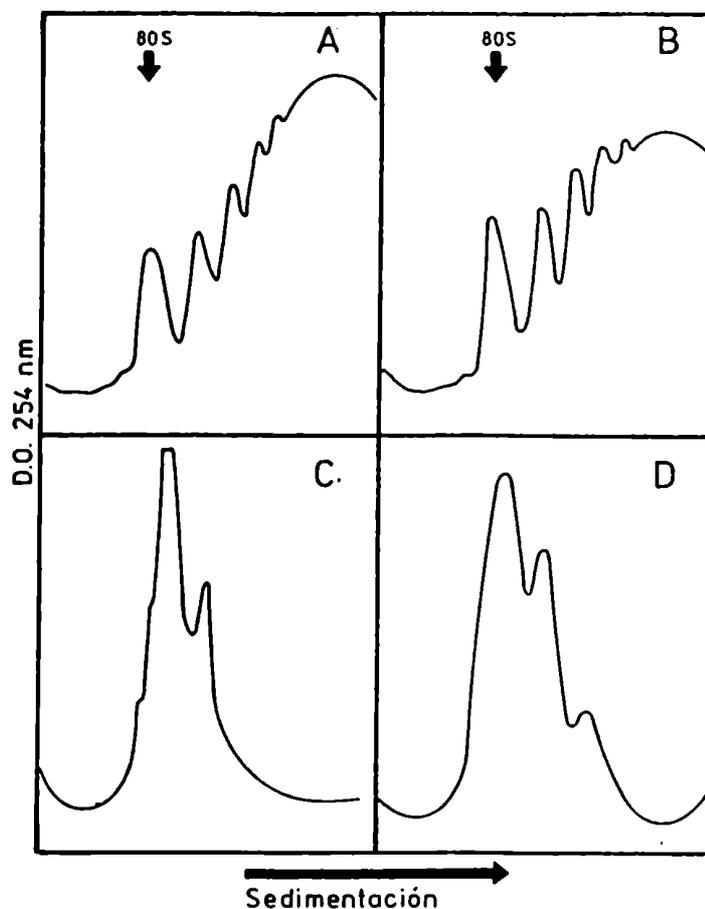


Fig. 24: Análisis en gradientes lineales de sacarosa de polisomas de cobayo no tratados (A,B) o tratados (C,D) con $11. 1,5 U$ de D.O. a $260 nm$ sin incubar (A) o incubados $15 min$ a $30^{\circ}C$ sin agregados (B) o en presencia de lavado ribosomal (C), S_{150} (crudo o parcialmente purificado) (D). En cada caso, los polisomas se incubaron con $10 ug$ de proteínas y se analizaron en un gradiente lineal de $15-45\%$ de sacarosa.

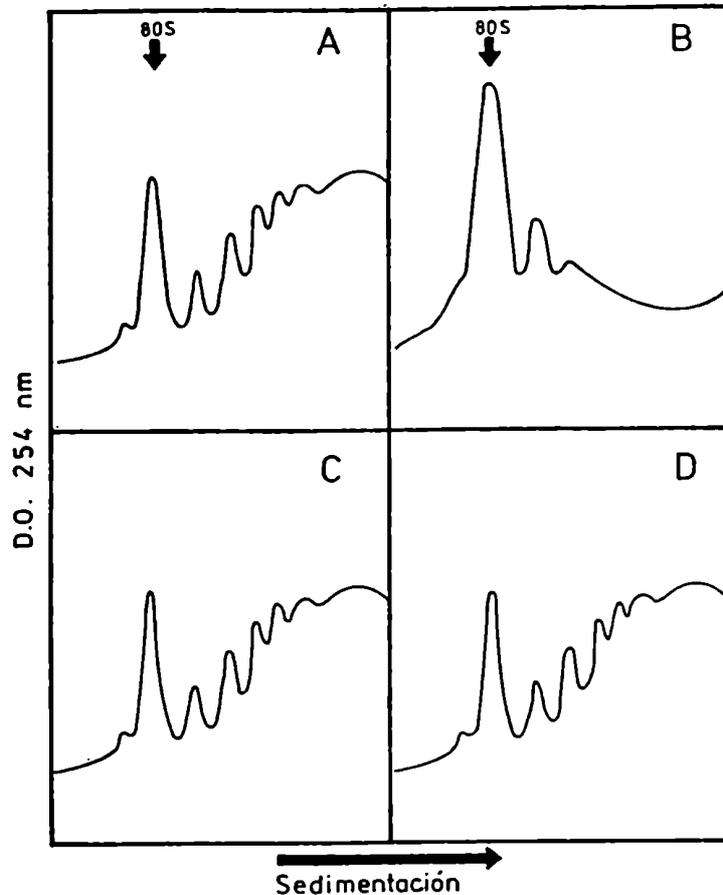


Fig. 25: Análisis en gradientes lineales de sacarosa de polisomas de cobayo no tratados (A) o tratados con lavado ribosomal de linfocitos en reposo (B) o lavado ribosomal (C) y S_{150} (D) de linfocitos estimulados. Se utilizó 1 μ g de cada fracción (en el caso de linfocitos en reposo corresponde a la cantidad que inhibe un 50% de la síntesis de polifenilalanina "in vitro"), 1,5 U de D.O. a 260 nm de polisomas y se incubó durante 15 min a 30°C. El análisis en el gradiente lineal de 15-45% de sacarosa se realizó como se describió en Materiales y Métodos.

c) Degradación de mensajeros sintéticos.

(1) Sobre Poli(U) radioactivo:

Se midió la actividad nucleolítica de las fracciones que se indican en la Tabla 15 sobre Poli(U) radioactivo en una mezcla de reacción similar a la utilizada para la síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo, reemplazando la fenilalanina (^{14}C) por el mismo aminoácido no radioactivo (2 μM). En este caso, la mezcla se incubó durante 10 minutos a 27°C .

Tabla 15: Actividad nucleolítica de IT sobre Poli(U)-(^3H)

FRACCION AGREGADA	ORIGEN DE LA FRACCION	POLI(U)-(^3H) PRECIPITABLE POR TCA	
		(cpm)	(%)
Ninguna	-----	28.268	100
Lavado ribosomal S ₁₅₀	Linfocitos en estado de reposo	4.212 3.872	14,9 13,7
Lavado ribosomal S ₁₅₀	Linfocitos estimulados con FHA	28.230 27.254	100 96,5

Se utilizaron 10 μg de proteínas de cada fracción.

Tanto el lavado ribosomal como la fracción S_{150} de linfocitos en reposo hidrolizaron el ácido poliuridílico hasta compuestos solubles en TCA, en tanto que las fracciones provenientes de células estimuladas no presentaron esta actividad hidrolítica.

(2) Cinética de la actividad nucleolítica sobre Poli(U) radioactivo:

Con un ensayo análogo al descrito en el párrafo anterior, se midió la cinética de la actividad nucleolítica de los extractos obtenidos a partir de linfocitos en reposo o estimulados. Se incubó a 27°C y a los tiempos que se indican en la Fig. 26 se tomaron alícuotas y se midió la radioactividad precipitable por TCA que representa el Poli(U) de alto peso molecular que queda después de la reacción.

3. Inhibición de la biosíntesis de poliaminas: su efecto sobre la proliferación de linfocitos

Numerosos estudios han indicado que la proliferación de linfocitos requiere la biosíntesis de poliaminas.

Los compuestos DFMO y MGBG inhiben las enzimas ornitina decarboxilasa y S-adenosil metionina decarboxilasa, respectivamente, bloqueando la síntesis de putrescina y espermidina. Por esta razón, se utilizó estos inhibidores

para investigar en detalle el posible rol de las poliaminas en la proliferación de linfocitos.

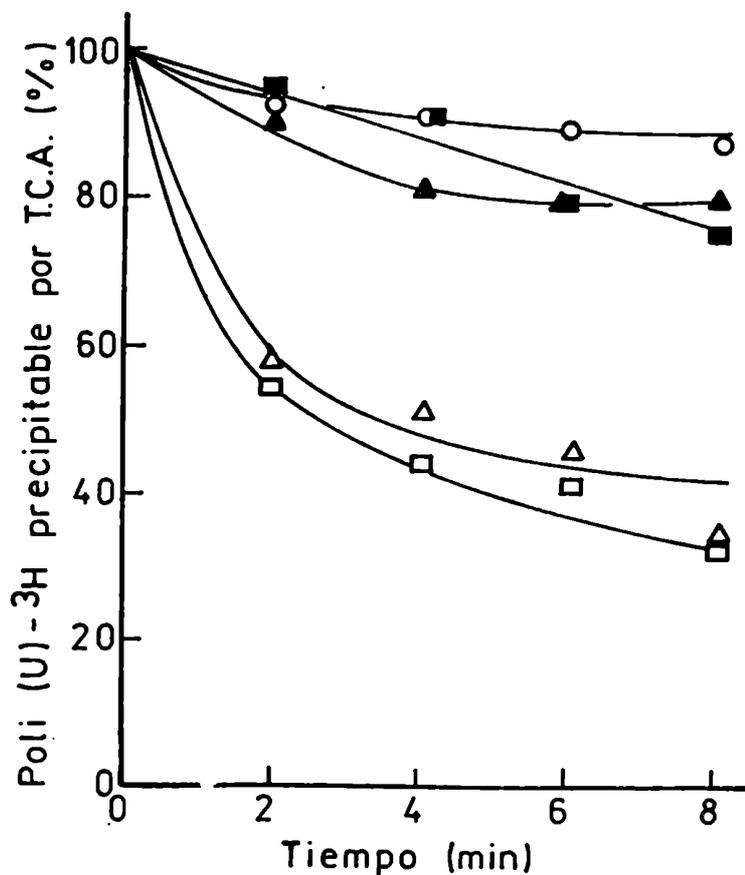


Fig. 26: Cinética de actividad nucleolítica sobre Poli(U) (³H). Se utilizó el ensayo "standard" de síntesis de polifenilalanina en extracto de germen de trigo. Las incubaciones a 27°C se realizaron sin ningún agregado (○) ó en presencia de 10 ug de proteínas de cada una de las siguientes fracciones: lavado ribosomal (Δ) y S₁₅₀ (□) de linfocitos en reposo o lavado ribosomal (▲) y S₁₅₀ (■) de linfocitos estimulados.

3.1. Efecto del agregado de distintas concentraciones de DFMO y MGBG sobre la síntesis de macromoléculas

Las células fueron cultivadas con FHA en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de DFMO y MGBG. A las 72 horas de cultivo se midió la síntesis de DNA y proteínas "in vivo" por incorporación de timidina-(³H), leucina-(³H) o aminoácidos-(¹⁴C) en material insoluble en TCA en la forma en que se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Excepto en el caso en que se usó MGBG a una concentración de 1 uM, todas las concentraciones utilizadas de ambas drogas inhibieron la proliferación celular (medida como síntesis de DNA) como así también la síntesis de proteínas.

Si bien el DFMO produjo el mismo grado de inhibición en la mayoría de los casos, se observó cierta variabilidad a niveles de 1 mM, por lo tanto en los experimentos siguientes se utilizó una concentración de 3 mM.

En cambio, en el caso de MGBG, si bien a 2,5 uM se observó un marcado efecto inhibitorio, aumentando su concentración a 5 uM su efecto fue significativamente mayor. Por esta razón, en los experimentos siguientes se utilizó MGBG a una concentración de 5 uM. No se ensayaron niveles mayores, pues producen un marcado aumento de efectos tóxicos.

Tabla 16: Curva de concentración de drogas

Cultivo de linfocitos en presencia de	Radioactividad insoluble en TCA		
	Timidina-(³ H) (%)	Leucina-(³ H) (%)	Aminoácidos-(¹⁴ C) (%)
FHA	100	100	100
FHA + 1 mM DFMO	46,1	61,5	44
FHA + 3 mM DFMO	50,6	55,5	44,6
FHA + 1 uM MGBG	100	55	
FHA + 2,5 uM MGBG	55	21	
FHA + 5 uM MGBG	35,5	18	

Cultivos que contenían 1×10^6 linfocitos/ml se estimularon con 1 ug/ml de FHA en presencia o ausencia de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas. A las 72 hs se tomaron alícuotas de 2 ml y se midió la incorporación de Timidina-(³H), Leucina-(³H) o aminoácidos-(¹⁴C) como se indica en Materiales y Métodos. El agregado de drogas se realizó simultáneamente con el agregado de FHA. En todos los casos se restó la radioactividad incorporada en cultivos control que no contenían FHA.

3.2. Efecto del agregado de DFMO a distintos tiempos durante la estimulación de linfocitos

(A) Sobre la síntesis de DNA:

Las células estimuladas por acción de FHA se cultivaron en ausencia o presencia de 3 mM DFMO agregado a diferentes tiempos luego de la adición de FHA.

La Fig. 27 muestra que el agregado de la droga entre las 0 y 24 hs luego del comienzo de la estimulación produce inhibición de la síntesis de DNA, pero cuando el agregado se hace 48 hs luego de la estimulación el efecto es muy reducido. Esto indica que la síntesis de poliaminas en linfocitos no solo está directamente relacionada con la replicación del DNA y la proliferación celular, sino que es un requerimiento, especialmente durante las primeras 24 a 48 hs de cultivo. Este resultado está de acuerdo con el de otros autores que muestran que, en células transformadas, la presencia de la droga no impide a la mayoría de las células la entrada a la fase S, pero la síntesis de DNA no puede completarse y las células permanecen en dicha fase del ciclo (246).

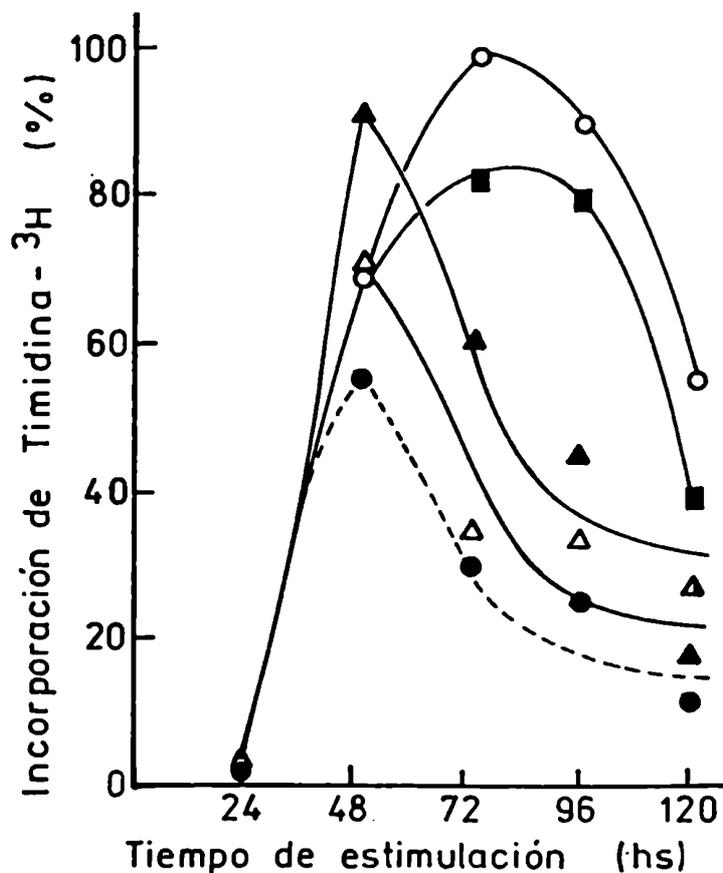


Fig. 27: Efecto sobre la síntesis de DNA del agregado de DFMO a diferentes tiempos durante la estimulación. Cultivos de 1×10^6 linfocitos/ml estimulados con $1 \mu\text{g/ml}$ de FHA se cultivaron en ausencia (○) o en presencia de 3 mM DFMO. La droga se agregó junto con la FHA, 0 hs de estimulación (●) o luego de estar en contacto con la FHA durante 12 hs (△), 24 hs (▲) o 48 hs (■). A los tiempos indicados se tomaron muestras de 2 ml y se midió la incorporación de timidina-(^3H) en DNA. En todos los casos se restó radioactividad incorporada en cultivos controles, células cultivadas en ausencia de FHA. Los resultados que se grafican representan el promedio de 5 a 8 experimentos diferentes.

(B) Sobre la síntesis de proteínas:

Se midió la síntesis de proteínas "in vivo" en linfocitos estimulados por FHA a los cuales se agregó 3 mM DFMO, a diferentes tiempos luego del comienzo de la estimulación. En todos los casos el agregado de la droga produce una inhibición de la síntesis de proteínas (Fig. 28).

Es interesante destacar que cuando la droga se agrega simultáneamente con el mitógeno, aunque la síntesis de proteínas se inhibe totalmente durante las primeras 24 hs, las células son capaces de comenzar a sintetizar DNA. Cuando el agregado se realiza después de 48 hs de iniciada la estimulación, se produce instantáneamente una reducción de un 35% en la síntesis de proteínas, pero el efecto sobre la síntesis de DNA es muy poco significativo.

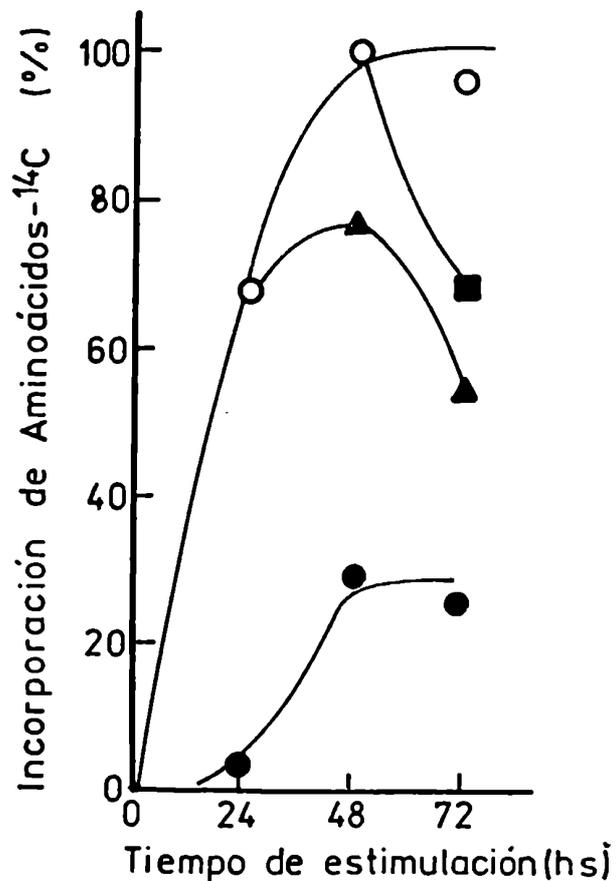


Fig. 28: Efecto sobre la síntesis de proteínas del agregado de DFMO a diferentes tiempos durante la estimulación. Cultivos de 1×10^6 linfocitos/ml fueron estimulados con $1 \mu\text{g/ml}$ de FHA. Luego se cultivaron durante 72 hs sin ningún agregado (○) ó agregando 3 mM DFMO junto con la FHA (●), ó 24 hs (▲) ó 48 hs (■) después de iniciada la estimulación. A los tiempos que se indican se tomaron alícuotas de 2 ml y se midió síntesis de proteínas como se describe en Materiales y Métodos, utilizando aminoácidos (^{14}C). En todos los casos se restó la radioactividad incorporada en células no estimuladas. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos diferentes.

3.3. Efecto del agregado de DFMO a diferentes tiempos antes de iniciar la estimulación con FHA

Los linfocitos en estado de reposo fueron cultivados durante tiempos variables en presencia de DFMO antes de ser estimulados con FHA.

(A) Efecto sobre la síntesis de DNA:

Los resultados obtenidos (Fig. 29) muestran que el agregado de DFMO a linfocitos durante 24 hs o 48 hs antes de añadir FHA inhibe la síntesis de DNA con una cinética muy semejante a la obtenida cuando el agregado se realiza junto con el mitógeno.

(B) Sobre la síntesis de proteínas:

La presencia de la droga produce el mismo tipo de inhibición (Fig. 30), independientemente del tiempo que permanezca en contacto con las células antes de la estimulación con el mitógeno. Es interesante señalar que, en el experimento de la Fig. 28, la síntesis de proteínas a las 24 hs de estimulación sin inhibidor era mucho mayor que en este experimento. En el caso en que se usó leucina-(³H), las células se resuspendieron en un medio sin leucina y se incubaron en estas condiciones durante 30 minutos antes del agregado de aminoácido radioactivo. Este ayuno afecta la síntesis de proteínas en forma acentuada.

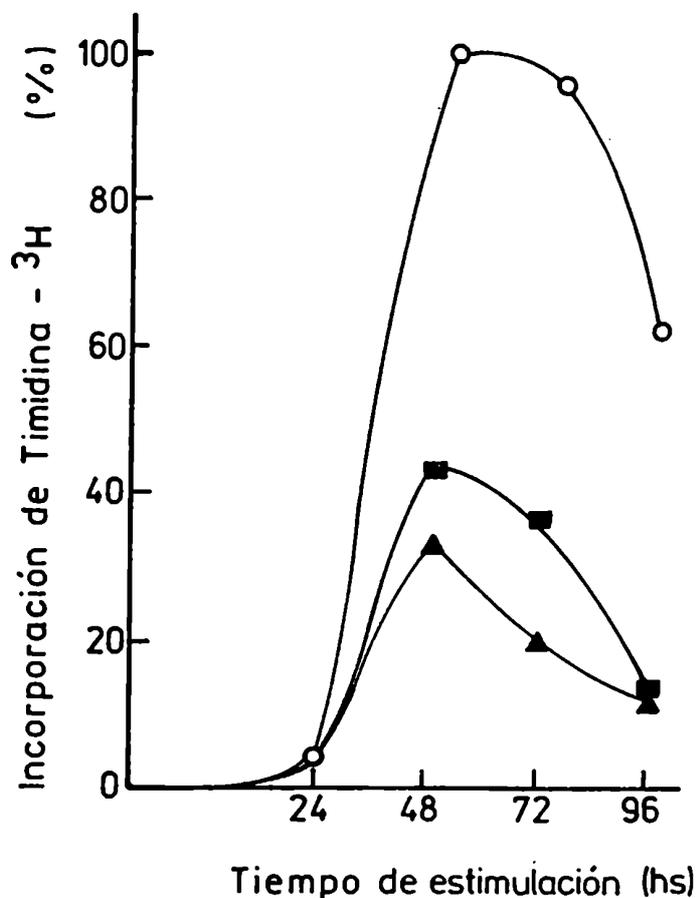


Fig. 29: Efecto sobre la síntesis de DNA del agregado de DFMO antes del comienzo de la estimulación. Linfocitos resuspendidos a una densidad de 1×10^6 cel/ml se cultivaron sin ningún agregado (○) ó en presencia de 2 mM DFMO durante 24 hs (▲) o 48 hs (■) antes de añadir FHA. Al cabo de esos períodos se agregó 1 ug/ml de FHA y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 2 ml para medir la incorporación de timidina-³H) como se indica en Materiales y Métodos. En todos los casos, se restó la radioactividad incorporada en cultivos controles (linfocitos mantenidos en cultivo durante el mismo tiempo sin ningún agregado).

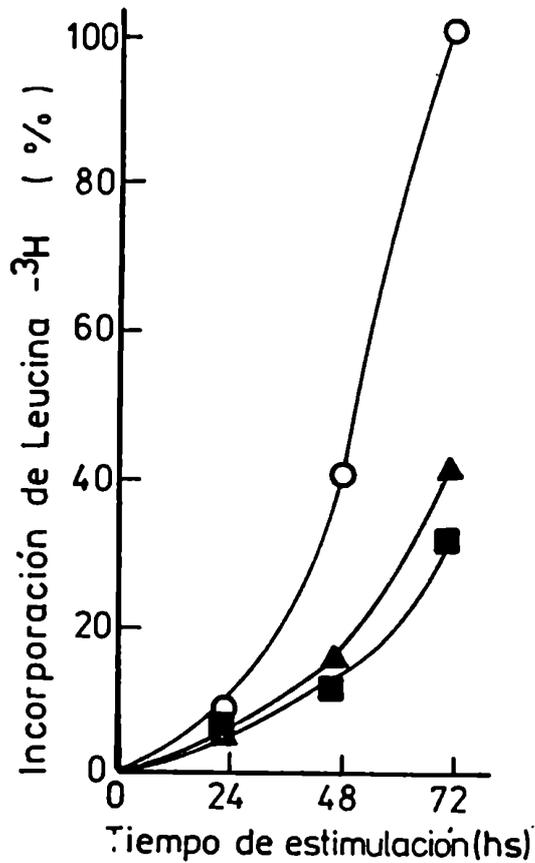


Fig. 30: Efecto sobre la síntesis de proteínas del agregado de DFMO antes de la estimulación. Cultivos que contenían 1×10^6 linfocitos/ml se mantuvieron a 37°C sin ningún agregado (O) o agregándoles 2 mM DFMO 24 hs (▲) o 48 hs (■) antes de la estimulación. Luego de esos períodos, se estimuló con 1 $\mu\text{g/ml}$ de FHA y a los tiempos que se indican se midió la incorporación de leucina (^3H) a proteínas como se describe en Materiales y Métodos. En cada caso, se restó la incorporación a células control (mantenidas en cultivo en las mismas condiciones de temperatura y durante el mismo tiempo, pero sin ningún agregado).

3.4. Efecto del agregado de MGBG a diferentes tiempos durante la estimulación de linfocitos

(A) Sobre la síntesis de DNA:

Las células estimuladas con el mitógeno se cultivaron sin ningún agregado o añadiendo 5 uM MGBG a distintos tiempos durante la estimulación. Los resultados que se muestran en la Fig. 31 indican que el agregado de este inhibidor afecta la síntesis de DNA en forma más acentuada que el DFMO, y a diferencia de este último ejerce una marcada inhibición sobre la incorporación de timidina-(³H), aún agregándolo 48 hs después de la estimulación.

(B) Efecto sobre la síntesis de proteínas:

También se midió la síntesis de proteínas en células estimuladas con FHA y cultivadas en ausencia o en presencia de 5 uM MGBG agregado a distintos tiempos luego de la estimulación.

Como se muestra en la Fig. 32, en este caso el agregado del inhibidor desde el comienzo de la estimulación produce el mismo efecto que el agregado del DFMO, es decir, una inhibición total de la síntesis de proteínas durante las primeras 24 hs y una inhibición solo del 50% en la síntesis de DNA medida a las 48 hs. En cambio, cuando el MGBG se agrega luego de 48 hs de cultivo, inhibe la síntesis de pro-

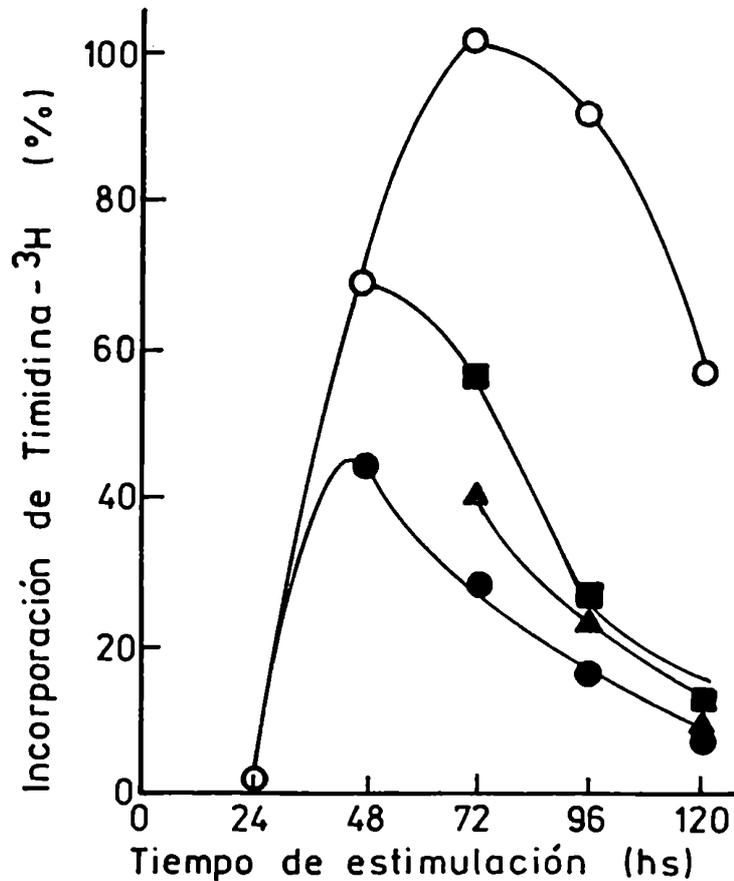


Fig. 31: Efecto de MGBG sobre la síntesis de DNA. Linfocitos cultivados a una densidad de 1×10^6 cel/ml y estimulados con 1 ug/ml de FHA se cultivaron en ausencia (○) o en presencia de 5 uM MGBG agregado junto con el mitógeno (0 hs) (●) o luego de 24 hs (▲) o 48 hs (■) de estimulación. A los tiempos indicados, se midió incorporación de timidina (^3H) en material TCA insoluble como se indica en Materiales y Métodos, restando en cada caso la radioactividad incorporada en células cultivadas en ausencia de mitógeno. Los datos de la figura representan el promedio de 4 a 5 experimentos diferentes.

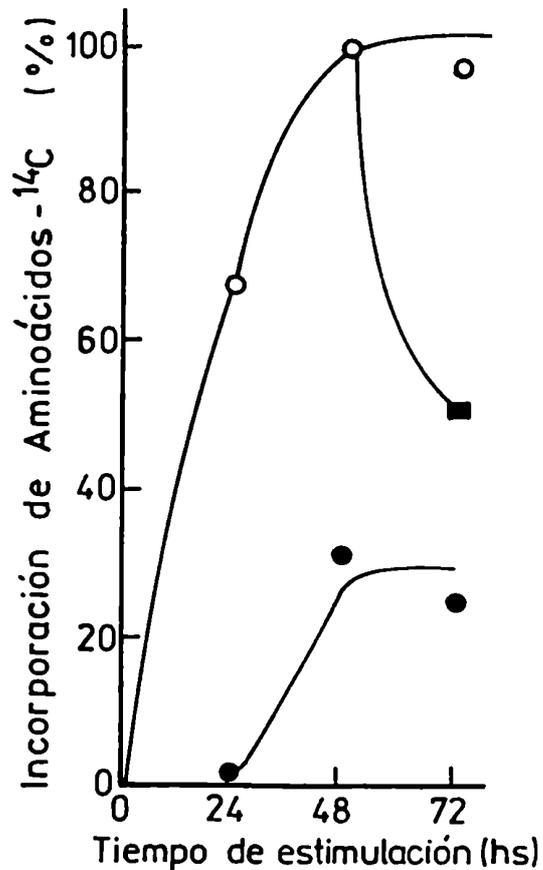


Fig. 32: Efecto de MGBG sobre la síntesis de proteínas. Cultivos de linfocitos que contenían 1×10^6 cel/ml fueron estimulados con 1 ug/ml de FHA y cultivados solos (○), agregándoles 5 uM MGBG junto con el mitógeno (●) o luego de permanecer en cultivo en contacto con la FHA durante 48 hs (■). A los tiempos que se indican, se tomaron muestras de 2 ml c/u y se midió incorporación de aminoácidos (^{14}C) a material TCA insoluble como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados que se muestran representan el promedio de tres experimentos diferentes y en cada caso, se restó la radioactividad incorporada en células control (cultivadas en ausencia de FHA).

teínas en más de un 50%, mientras que el DFMO tiene un efecto menos marcado.

3.5. Efecto del agregado de putrescina a distintos tiempos durante la estimulación de linfocitos en presencia de DFMO

Con el objeto de investigar si los efectos de DFMO y MGBG sobre la síntesis de macromoléculas en linfocitos se debe a niveles insuficientes de poliaminas, se agregó putrescina en diversas condiciones y en diferentes momentos durante el proceso de estimulación.

Para realizar estos estudios, se estimularon células con FHA en presencia de DFMO y luego se agregó putrescina a los cultivos midiendo la síntesis de DNA y proteínas.

(A) Síntesis de DNA:

En todos los casos, la putrescina es capaz de revertir el efecto del DFMO (Fig. 33). Esto significa que la droga actúa específicamente sobre la síntesis de poliaminas. El efecto de la droga no es tóxico, ya que aún después de 48 hs de cultivo en presencia de DFMO la maquinaria celular está en condiciones de completar la replicación del DNA.

(B) Síntesis de proteínas:

En este caso, la putrescina también revierte el

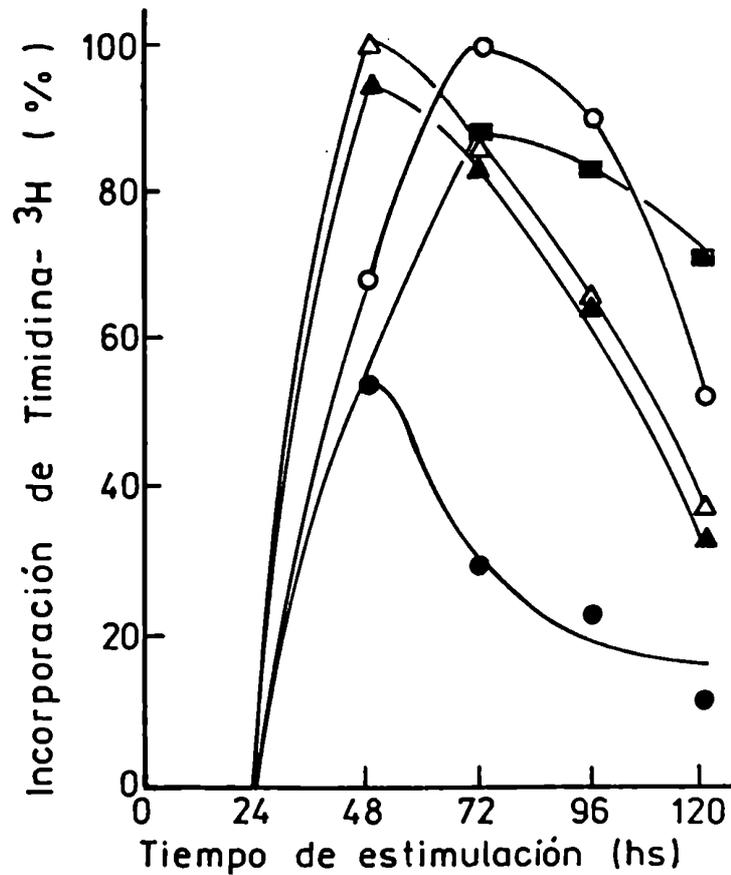


Fig. 33: Efecto del agregado de putrescina a linfocitos cultivados en presencia de DFMO. Se estimularon cultivos de linfocitos que contenían 1×10^6 cél/ml con $1 \mu\text{g/ml}$ de FHA y se les agregó al mismo tiempo 3 mM DFMO. A una parte de los cultivos se agregó putrescina $10 \mu\text{M}$ en el momento de la estimulación (0 hs) o luego de estimular en presencia de DFMO durante 24 hs ó 48 hs. Células cultivadas con FHA (○); células en presencia de FHA y 3 mM DFMO (●); células cultivadas con FHA y 3 mM DFMO agregando $10 \mu\text{M}$ putrescina desde el comienzo de la estimulación (△), a las 24 hs (▲) o a las 48 hs (■). A los tiempos indicados, se midió la incorporación de timidina (^3H) como se describe en Materiales y Métodos. En cada caso, se restó la radioactividad incorporada en células control (cultivadas sin ningún agregado).

efecto del DFMO sobre la síntesis de proteínas, independientemente del tiempo que las células hayan sido incubadas con la droga (Fig. 34).

También se estudió el efecto del agregado de putrescina a concentraciones mayores sobre la velocidad de síntesis de DNA y de proteínas de linfocitos estimulados en presencia de DFMO. Tanto a concentraciones de 30 μ M como a 100 μ M, la putrescina revierte el efecto del DFMO sobre la síntesis de DNA y de proteínas con la misma cinética que la mostrada en las Fig. 33 y 34 para 10 μ M de putrescina.

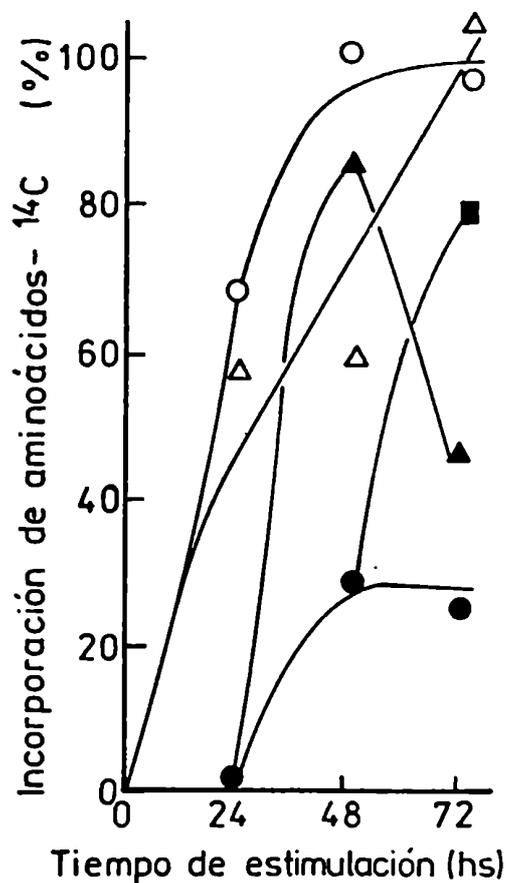


Fig. 34: Efecto del agregado de putrescina sobre la síntesis de proteínas de linfocitos cultivados en presencia de FHA y DFMO. Los linfocitos a una concentración de 1×10^6 células/ml se cultivaron en presencia de 1 μ g/ml de FHA (○) ó con 1 μ g/ml de FHA + 3 mM DFMO sin ningún agregado (●) o agregando 10 μ M putrescina al comienzo del cultivo (△), luego de 24 hs (▲), ó 48 hs (■). A los tiempos que se indican, se tomaron muestras de 2 ml y se midió la síntesis de proteínas por incorporación de aminoácidos (¹⁴C) como se describe en Materiales y Métodos. En cada caso, se restó la radioactividad incorporada en cultivos control (linfocitos cultivados sin ningún agregado).

3.6. Efecto sobre la síntesis de DNA del agregado de putrescina a diferentes tiempos durante la estimulación de linfocitos cultivados en presencia de MGBG

En estos casos la putrescina es capaz de revertir el efecto de la droga solo durante las primeras 24 hs de cultivo; luego de ese lapso la célula no está en condiciones de sintetizar DNA. Además, el agregado de putrescina a las 0 y 24 hs desplaza la curva de DNA hacia la izquierda, es decir, a menores tiempos (Fig. 35).

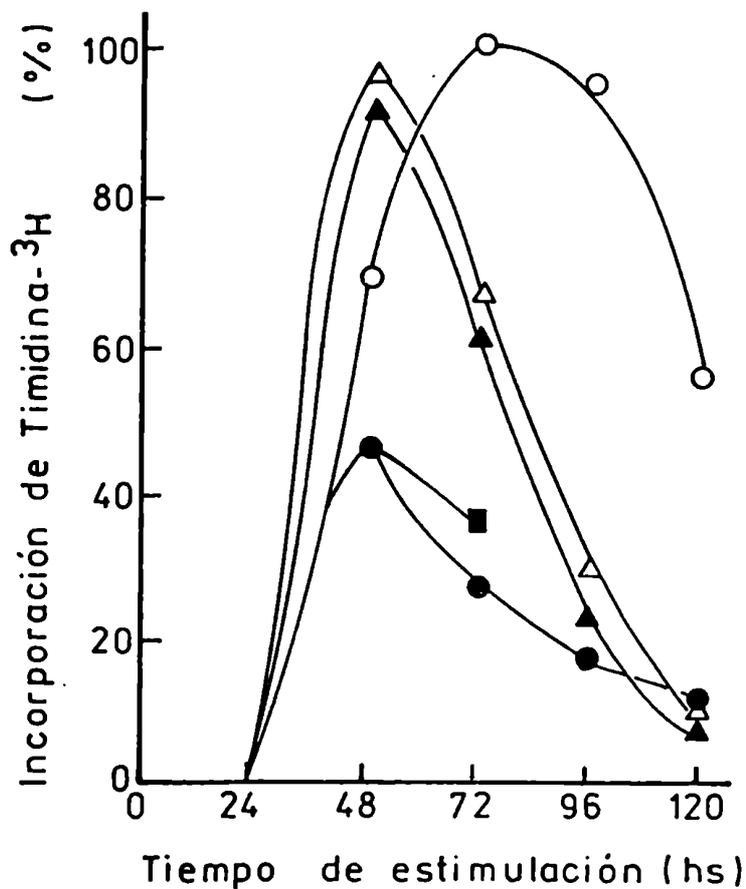


Fig. 35: Efecto del agregado de putrescina sobre la síntesis de DNA en linfocitos cultivados en presencia de MGBG. Se cultivaron 1×10^6 cél/ml en presencia de 1 ug/ml de FHA (○) ó con 1 ug/ml de FHA y 5 uM MGBG sin ningún agregado (●) ó agregando 10 uM putrescina en el momento de la estimulación (△), luego de 24 hs (▲) o de 48 hs (■). A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 2 ml y se midió síntesis de DNA por incorporación de timidina (^3H). En cada caso, se restó la radioactividad incorporada en cultivos control (linfocitos mantenidos en cultivo sin ningún agregado).

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La síntesis proteica es una de las etapas fundamentales de la expresión genética. Si bien la maquinaria celular responsable de la síntesis proteica ha sido altamente conservada, aún no se han aclarado aspectos claves de la regulación de su funcionamiento.

Los linfocitos humanos periféricos son células fisiológicamente en estado de reposo, que cuando se cultivan en presencia de mitógenos sufren un proceso de transformación linfoblástica y proliferan. Esta transformación está acompañada de una serie de eventos tempranos que incluyen, entre otros, el aumento de la actividad de la ornitina decarboxilasa, una de las enzimas responsables de la biosíntesis de poliaminas.

Los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la blastogénesis son prácticamente idénticos a los producidos por la presencia de antígenos "in vivo". Por estas razones, la estimulación de linfocitos por mitógenos representa un modelo adecuado para estudiar el control de la proliferación y diferenciación celular.

Los experimentos realizados con sistemas libres de células han indicado que la reducida síntesis de proteínas que se observa en linfocitos en reposo se debe probablemente

a la ausencia de factores de iniciación (216) y/o a la presencia de factores citoplasmáticos que bloquean la formación de complejos de iniciación (214). La posibilidad de un mecanismo de regulación más complejo se vio reforzada por el hallazgo en nuestro laboratorio de un nuevo inhibidor de traducción (IT) asociado a ribosomas de linfocitos en reposo, cuya actividad desaparece durante la estimulación (215,241).

Por otra parte, también se sabe que los niveles de la enzima ODC aumentan en las primeras horas del proceso de transformación y que las poliaminas tienen importantes funciones en el control de la traducción (178). Por lo tanto, nos propusimos caracterizar el inhibidor de síntesis proteica de linfocitos en reposo, estudiar su mecanismo de acción y analizar el efecto de la inhibición de la biosíntesis de poliaminas sobre la estimulación de linfocitos.

Los resultados de los experimentos realizados "in vitro" descritos en este trabajo confirman la existencia de un inhibidor de traducción presente en linfocitos en reposo, que desaparece o se inactiva luego de la estimulación por mitógenos. Este inhibidor además de estar asociado a ribosomas también se encuentra activo en el citosol. Ambas formas del factor IT (el obtenido por tratamiento salino de los ribosomas o el que se encuentra en la fracción

post-ribosomal) son activas en sistemas libres de células homólogos y heterólogos.

Los estudios realizados con el propósito de obtener información acerca de la naturaleza química del IT han indicado que no se comporta como un ácido nucleico; es una sustancia de naturaleza básica, parcialmente termoestable y totalmente resistente a la acción de las proteasas utilizadas en nuestras condiciones de ensayo.

El material con que se ha trabajado se obtiene a partir de linfocitos humanos y por lo tanto es escaso. Además, la relación de volúmenes correspondiente a la fracción S₁₅₀/lavado ribosomal es de 10/1, por lo que no todos los ensayos se realizaron con ambas fracciones. En aquellos casos en que se utilizaron ambas preparaciones, los resultados indican que tanto el lavado ribosomal como la fracción S₁₅₀ tienen las mismas propiedades físico-químicas.

Varios autores han sugerido que las diferencias en la síntesis de proteínas entre linfocitos en estado de reposo y estimulados se deben exclusivamente al proceso de iniciación de la traducción. Wettenhall y col. (216) han propuesto que las diferencias observadas "in vivo" se originan en la falta de los factores de iniciación en linfocitos en reposo. McCairs y col. (228) atribuyen la diferencia en la síntesis proteica a la ausencia de CAPs funcionales en

los mensajeros de linfocitos en reposo. Sin descartar la posibilidad de estos controles a nivel de iniciación, nuestros resultados indican que el IT en cualquiera de sus formas (soluble o asociado a ribosomas) inhibe la síntesis de proteínas con una cinética idéntica a la que se obtiene con esparsomicina, que es un inhibidor de la elongación de polipéptidos. Se ha obtenido el mismo tipo de cinética tanto con RNA mensajeros naturales o artificiales, y utilizando preparaciones crudas de IT o preparaciones obtenidas con sulfato de amonio por encima de 30% de saturación.

Estos resultados indicarían que la regulación de la síntesis de proteínas en linfocitos también puede ocurrir a nivel de la etapa de elongación, porque el IT ejerce su acción en esta etapa del proceso y desaparece o se inactiva durante la estimulación con mitógenos.

Kay y col. han descrito un inhibidor que se obtiene de linfocitos en reposo y que bloquea la síntesis de proteínas en la etapa de iniciación (214). Nuestros resultados no excluyen esa posibilidad, ya que cuando se hace el fraccionamiento con sulfato de amonio de la fracción S₁₅₀ de linfocitos en reposo, se separan dos actividades: una que precipita por encima de 30% de saturación y que presenta una cinética de inhibición igual a la que se obtiene con esparsomicina, y la otra fracción que se obtiene por debajo de

30% de saturación, cuya cinética inhibitoria es semejante a la que muestra el ATA (inhibidor de iniciación de la síntesis proteica).

Los estudios descritos en el presente trabajo muestran que el IT tanto del citosol como el asociado a ribosomas poseen actividad nucleolítica. Esta actividad es capaz de degradar RNA ribosomal, RNA mensajero que se encuentra formando parte de polisomas o RNA mensajero artificial libre.

Cuando las células son estimuladas a proliferar desaparece la actividad nucleolítica del lavado ribosomal y de la fracción post-ribosomal. Estos resultados parecen opuestos a los descritos previamente (241), que indicaban la ausencia de nucleasas en las preparaciones de IT. La diferencias señaladas pueden deberse a los distintos métodos de ensayo utilizados.

La desaparición de la actividad del factor IT durante la estimulación de linfocitos podría estar causada por un aumento en la velocidad de su degradación o una inactivación por asociación con algún factor específico. En este sentido, recientemente se ha comunicado la existencia en diferentes tejidos (placenta humana (159), hígado de rata (155), reticulocitos de rata (157) y músculo esquelético de ratón (156)) de ribonucleasas asociadas a un factor inhibi-

torio específico. Se ha postulado que existe un equilibrio:



y que este equilibrio se desplaza hacia uno u otro lado, dependiendo del estado metabólico de la célula. En todos los casos estudiados, el inhibidor de nucleasa es termolábil, y se destruye por la acción de proteasas. La existencia de este tipo de moléculas permitiría una regulación rápida de la síntesis de proteínas, e independiente de la transcripción y por un mecanismo que no excluye otros tipos de controles. La presencia de estos sistemas (RNAasas-inhibidor) en linfocitos estaría de acuerdo con el rápido aumento de la síntesis de proteínas que se produce luego de la estimulación. Además explicaría por qué no se había detectado actividad nucleolítica anteriormente, ya que en los ensayos previos se utilizaron sistemas de linfocitos estimulados y en estos extractos podría existir inhibidor de ribonucleasa en cantidad suficiente como para neutralizar la actividad del IT. Teniendo en cuenta esta posibilidad, se trató de destruir la actividad inhibitoria del IT que podría existir en extractos de linfocitos estimulados. Para ello se calentaron los extractos a diferentes temperaturas o se trataron con reactivos de grupos sulfhidrilos, ya que los inhibidores hallados en otros sistemas son sensibles a estos agentes (155,157). En nuestro caso, ninguno de los tratamientos men-

cionados dio origen a la aparición de actividad inhibitoria de síntesis proteica en extractos de linfocitos estimulados, indicando que estos sistemas posiblemente no contienen IT, o si lo poseen se encuentra bloqueado en forma irreversible.

Es interesante señalar que la actividad nucleolítica de los extractos de linfocitos en reposo también resultó resistente al tratamiento con inhibidores de RNAsa obtenidos de placenta humana.

La primera parte de este trabajo confirmó la existencia de un inhibidor de la traducción en linfocitos en reposo, cuya actividad desaparece durante el proceso de estimulación. La cinética de acción del inhibidor sobre la síntesis proteica en varios sistemas "in vitro" está de acuerdo con la presencia de una intensa actividad nucleolítica en distintas preparaciones de IT.

En extractos de linfocitos estimulados no se ha podido detectar inhibidores de nucleasas, por lo que se postula que el factor IT, que posiblemente contribuya a mantener inhibida la síntesis proteica de los linfocitos en reposo, se destruye o bloquea en forma irreversible durante la estimulación linfoblástica.

La eficiencia de la traducción de un RNA mensajero depende de una serie de factores. Entre ellos no solo se debe tener en cuenta la integridad del mensajero y de los

ribosomas, sino también la disponibilidad de factores proteicos y la concentración óptima de iones tales como Mg^{2+} , K^+ y poliaminas.

Se sabe que las poliaminas tienen un rol fundamental en la síntesis de proteínas "in vitro", aumentando la eficiencia y la fidelidad de la traducción. Además, estas poliaminas se requieren durante el crecimiento y la proliferación celular tanto en procariotes como en eucariotes (176).

Los resultados de este trabajo en cuanto a la función de las poliaminas en la estimulación de linfocitos están de acuerdo con algunos obtenidos por otros autores. La utilización de inhibidores específicos de las enzimas responsables de la biosíntesis de poliaminas impide la proliferación de linfocitos en presencia de mitógenos. El agregado de MGBG tiene efectos más drásticos que el DFMO, cuya acción sobre la proliferación depende del tiempo que las células hayan estado en contacto con el mitógeno antes del agregado de DFMO. En el caso en que la droga se agrega junto con la FHA, la inhibición de la síntesis de DNA es solo de un 40%; esto puede deberse a que, como los linfocitos periféricos no son células sincronizadas, una parte de ellos entraría en fase S aún con bajos niveles de poliaminas.

El efecto del DFMO es casi nulo sobre la proliferación cuando se agrega a células que han sido estimuladas durante 48 horas, posiblemente porque la enzima ODC ya se ha inducido en el primer período sin inhibidor y ha formado suficiente cantidad de poliaminas para todo el proceso. No sucede lo mismo con MGBG, que inhibe la proliferación aún después de 48 hs de estimulación. Estos resultados confirman que los requerimientos de poliaminas constituyen eventos tempranos durante la proliferación y que el MGBG tiene efectos secundarios tóxicos (247,248). La acción primaria de ambas drogas es a nivel de la biosíntesis de poliaminas, ya que en ambos casos se puede revertir el efecto por agregado de putrescina.

Ambos inhibidores producen una marcada disminución de la síntesis de proteínas, independientemente del tiempo que las células hayan estado en contacto con el mitógeno antes del agregado de la droga. Los resultados más interesantes corresponden a los experimentos en que el inhibidor de la síntesis de poliaminas y el mitógeno se agregan al mismo tiempo. En ese caso, la síntesis de proteínas durante las primeras 24 horas de estimulación es idéntica a la velocidad de síntesis proteica de linfocitos en estado de reposo. A pesar de ello, parte de las células son capaces de entrar a la fase S y comenzar a sintetizar DNA, lo que

podría indicar que el aumento de la síntesis proteica de las primeras 24 horas no es tan importante para iniciar la replicación del DNA. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores que han postulado que la síntesis de proteínas y la proliferación celular son eventos relacionados, pero no necesariamente dependientes entre sí, sino que tienen distintos mecanismos de control. Se debe señalar que las diferencias en la síntesis de proteínas entre linfocitos en reposo y estimulados en presencia o no de drogas, se observaron en los casos en que se midió síntesis proteica por incorporación de aminoácidos- (^{14}C) y no con leucina- (^3H) . En este último caso, las células fueron sometidas a un ayuno de leucina que probablemente dañó la capacidad biosintética total de los linfocitos.

Los estudios del efecto del agregado de putrescina a linfocitos estimulados en presencia de DFMO o MGBG refuerzan la idea de la toxicidad de la segunda. La putrescina es capaz de revertir el efecto del DFMO sobre la proliferación en cualquier momento, confirmando que el inhibidor sólo actúa bloqueando la síntesis de poliaminas. En cambio, cuando las células fueron tratadas con MGBG, la putrescina solo tiene efecto hasta las 24 horas de cultivo, y produce reversión sólo durante tiempos cortos.

El incremento casi instantáneo de la síntesis de

proteínas luego de agregar putrescina a una célula tratada con DFMO indicaría que uno de los efectos primarios de la ausencia de poliaminas es la inhibición de la traducción, probablemente sin afectar la maquinaria biosintética.

Los estudios de la estimulación de linfocitos utilizando inhibidores de la biosíntesis de poliaminas muestran la importancia de estas drogas en la investigación de los mecanismos de regulación de la síntesis de macromoléculas que pueden controlar el proceso de proliferación celular.

La transformación blastogénica de linfocitos es uno de los sistemas más fisiológicos para estudiar la coordinación o disociación que pueda existir entre la síntesis de proteínas y la replicación del DNA. El uso de DFMO y otros inhibidores específicos de la formación de poliaminas puede permitir analizar qué proteínas son necesarias para controlar este tipo de procesos, fundamentalmente para inducir el pasaje de las células de la fase G₁ a S, que es la etapa inicial de la proliferación.

Marcelo Ferrer

J. Algranati

REFERENCIAS

- 1) Darnell, J.E.: Progr.Nucleic Acid Res.Molec.Biol. 22, 327-353, 1979.
- 2) Darnell, J.E.Jr.: Nature 297, 365-371, 1982.
- 3) Chambon, P.: Ann.Rev.Biochem. 44, 613-638, 1975.
- 4) Corden, J.; Wasylyk, B.; Buchwalder, A.; Sassone-Corsi, P.; Kedinger, C.; Chambon, P.: Science 209, 1406-1414, 1980.
- 5) Mellon, P.; Parker, V.; Gluzman, Y.; Maniatis, T.: Cell 27, 279-288, 1981.
- 6) Weisbrod, S.: Nature 297, 289-295, 1982.
- 7) Derman, E.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78, 5425-5429, 1981.
- 8) Weintraub, H.; Larsen, A.; Groudine, M.: Cell 24, 333-334, 1981.
- 9) Hagenbüchle, O.; Tosi, M.; Schibler, U.; Bovey, R.; Wellaver, P.K.; Young, R.A.: Nature 289, 643-646, 1981.
- 10) McNight, G.S.; Palmiter, R.D.: J.Biol.Chem. 254, 9050-9058, 1978.
- 11) Acheson, N.H., en: "Molecular Biology in Tumor Viruses", 2°Ed., (Ed. Tooze, J.) C.S.H.L., New York, 1980.
- 12) Myers, R.M.; Rio, D.C.; Robbins, A.K.; Tjian, R.: Cell 25, 373-384, 1981.

- 13) Nevins, J.R.; Ginsberg, H.W.; Blanchard, J.M.; Wilson, M.C.; Darnell, J.E.: *J.Virol.* 32, 727-733, 1979.
- 14) Bach, M.L.; Lacroute, F.; Botstein, D.: *Proc.Natl.Acad. Sci.* 76, 386-390, 1979.
- 15) Klar, A.J.S.; Strathern, J.N.; Broach, J.R.; Hicks, J.B.: *Nature* 289, 239-244, 1981.
- 16) Akusjarvi, G.; Persson, H.: *Nature* 292, 420-426, 1981.
- 17) Shaw, A.R.; Ziff, E.: *Cell* 22, 905-916, 1980.
- 18) Wilson, M.C.; Darnell, J.E.: *J.Molec.Biol.* 148, 231-251, 1981.
- 19) Nevins, J.R.; Wilson, M.C.: *Nature* 290, 113-118, 1981.
- 20) Maki, R.; Roeder, W.; Traunecker, A.; Sidman, C.; Wabl, M.; Rascke, W.; Tonegawa, S.: *Cell* 24, 353-365, 1981.
- 21) Rogers, J.; Early, P.; Carter, C.; Calame, K.; Bond, M.; Hood, L.; Wall, R.: *Cell* 20, 303-312, 1980.
- 22) Kornblihtt, A.R.; Vibe-Pedersen, K.; Baralle, F.E.: *The EMBO J.*: 3, 221-226, 1984.
- 23) Soeiro, R.; Vaughn, M.H.; Warner, J.R.; Darnell, J.E.: *J.Cell.Biol.* 39, 112-118, 1968.
- 24) Lewin, B.: *Cell* 4, 77-93, 1975.
- 25) Fraser, N.W.; Sehgal, P.B.; Darnell, J.E.Jr.: *Proc. Natl.Acad.Sci.* 76, 2571-2575, 1979.
- 26) Salditt-Georgieff, M.; Harpold, M.; Wilson, M.; Darnell, J.E.: *Molec.Cell.Biol.* 1, 179-187, 1981.

- 27) Bastos, R.N.; Volloch, Z.; Aviv, A.: J.Molec.Biol. 110, 191-203, 1977.
- 28) Chung, S.; Landfear, S.M.; Blumberg, D.D.; Cohen, N.S.; Lodish, H.A.: Cell 24, 785-797, 1981.
- 29) Wiskocil, R.; Bensky, P.; Dower, W.; Goldberger, R.F.; Gordon, J.I.; Deeley, R.G.: Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 4474-4478, 1980.
- 30) Wool, I.G.: Ann.Rev.Biochem. 48, 719-754, 1979.
- 31) Rubtsov, P.M.; Musakhanov, M.; Zakharyev, V.; Krayev, A.; Skryabin, K.; Bayev, A.: Nucleic Acids Res. 8, 5779-5794, 1980.
- 32) Veldman, G.M.; Klootwijk, J.; De Regt, V.; Planta, R.; Branlant, C.; Krol, A.; Ebel, J-P.: Nucleic Acids Res. 9, 6935-6952, 1981.
- 33) Schreier, M.H.; Erni, B.; Staehelin, T.: J.Mol.Biol. 116, 727-753, 1977.
- 34) Benne, R.; Hershey, J.W.B.: J.Biol.Chem. 253, 3078-3087, 1978.
- 35) Thomas, A.A.M.; Benne, R.; Voorma, H.O.: FEBS Lett. 128, 177-185, 1981.
- 36) Safer, B.; Adams, S.L.; Kemper, W.M.; Berry, K.W.; Lloyd, M.; Merrick, W.C.: Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 2584-2586, 1976.
- 37) Benne, R.; Wong, C.; Luedi, M.; Hershey, J.W.B.:

- J.Biol.Chem. 251, 7675-7681, 1976.
- 38) Grifo, J.A.; Tahara, S.M.; Leis, J.P.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J.; Merrick, W.C.: J.Biol.Chem. 257, 5246-5252, 1982.
- 39) Trachsel, H.; Staehelin, T.: Biochim.Biophys. Acta 565, 305-314, 1979.
- 40) Goumans, H.; Thomas, A.; Verhoeven, A.; Voorma, H.O.; Benne, R.: Biochim.Biophys.Acta 608, 39-46, 1980.
- 41) Benne, R.; Hershey, J.W.B.: Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 3005-3009, 1976.
- 42) Benne, R.; Brown-Luedi, M.L.; Hershey, J.W.B.: J.Biol. Chem. 253, 3070-3077, 1978.
- 43) Meyer, L.J.; Brown-Luedi, M.L.; Corbett, S.; Tolan, D.R.; Hershey, J.W.B.: J.Biol.Chem. 256, 351-356, 1981.
- 44) Grifo, J.A.; Tahara, S.M.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J.; Merrick, W.C.: J.Biol.Chem. 258, 5804-5810.
- 45) Jones, R.L.; Sadnik, I.; Thompson, H.A.; Moldave, K.: Arch.Biochem.Biophys. 199, 277-285, 1980.
- 46) Proud, C.G.; Clemens, M.J.; Pain, V.M.: FEBS Lett. 148, 214-220, 1982.
- 47) Valenzuela, D.; Chaudhuri, A.; Maitra, U.: Fed.Proc. 40, 1749, 1981.
- 48) Valenzuela, D.; Chaudhuri, A.; Maitra, U.: J.Biol.Chem. 257, 7712-7719, 1982.

- 49) Brown-Luedi, M.L., Meyer, L.J., Milburn, S.C.; Yau, P.M.; Corbett, S.; Hershey, J.W.B.: *Biochem.* 21, 4202-4206, 1982.
- 50) Duncan, R.; Hershey, J.W.B.: *J.Biol.Chem.* 258, 7228-7235, 1983.
- 51) Van Der Mast, C.; Thomas, A.; Goumas, H.; Amesz, H.; Voorma, H.O.: *Eur.J.Biochem.* 75, 455-464, 1977.
- 52) Panniers, R.; Henshaw, E.C.: *J.Biol.Chem.* 258, 7928-7934, 1983.
- 53) Pain, V.M.; Clemens, M.J.: *Biochem.* 22, 726-733, 1983.
- 54) De Haro, C.; Datta, A.; Ochoa, S.: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 75, 243-247, 1978.
- 55) Russell, D.W.; Spremulli, L.L.: *Arch.Biochem.Biophys.* 201, 518-526, 1980.
- 56) Russell, D.W.; Spremulli, L.L.: *J.Biol.Chem.* 254, 8796-8800, 1979.
- 57) Seal, S.N.; Schmidt, A.; Marcus, A.: *J.Biol.Chem.* 258, 10573-10576, 1983.
- 58) Seal, S.N.; Schmidt, A.; Marcus, A.: *J.Biol.Chem.* 258, 859-865 y 866-871, 1983.
- 59) Checkley, J.M.; Cooley, L.; Ravel, J.L.: *J.Biol.Chem.* 256, 1582-1586, 1981.
- 60) Mitsui, K.; Datta, A.; Ochoa, S.: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 78, 4128-4132, 1981.

- 61) Stringer, E.A.; Chaudhuri, A.; Valenzuela, D.; Maitra, U.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77, 3356-3359, 1980.
- 62) Siekierka, J.; Manne, V.; Mauser, L.; Ochoa, S.: Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 80, 1232-1235, 1983.
- 63) Ochoa, S.: Arch.Biochem.Biophys. 223, 325-349, 1983.
- 64) Hughes, S.M.: FEBS Lett. 164, 1-8, 1983.
- 65) Tahara, S.M.; Traugh, J.A.; Sharp, S.B.; Lundak, T.S.; Safer, B.; Merrick, W.C.: Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 789-793, 1978.
- 66) Safer, B.: Cell 33, 7-8, 1983.
- 67) Clark, B.: Trends Biochem.Sci. 5, 207-210, 1980.
- 68) De Haro, C.; Ochoa, S.: Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 2713-2716, 1978.
- 69) Maitra, U.; Stringer, E.A.; Chaudhuri, A.: Ann.Rev. Biochem. 51, 869-900, 1982.
- 70) Hunt, T.: Trends Biochem.Sci. 5, 178-181, 1980.
- 71) Baglioni, C.; Vesco, C.; Jacobs-Lorena, M.: C.S.H. Symp.Quant.Biol. 34, 555-565, 1969.
- 72) Nygard, O.; Westermann, P.: Nucleic Acids Res. 10, 1327-1334, 1982.
- 73) Traschel, H.; Staehelin, T.: Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 204-208, 1978.
- 74) Peterson, D.T.; Merrick, W.C.; Safer, B.: J.Biol.Chem. 254, 2509-2516, 1979.

- 75) Trachsel, H.; Erni, B.; Schreier, M.H.; Staehelin, T.:
J.Mol.Biol. 116, 755-767, 1977.
- 76) Jay, G.; Nomura, S.; Anderson, C.W.; Khoury, G.: Nature
291, 346-349, 1981.
- 77) Kozak, M.: Cell 34, 971-978, 1983.
- 78) Rosenberg, M.; Paterson, B.M.: Nature 279, 696-701,
1979.
- 79) Kozak, M.: Nature 280, 82-85, 1979.
- 80) Zalkin, H.; Yanofsky, C.: J.Biol.Chem. 257, 1491-1500,
1982.
- 81) Giles, N.H.: Am.Nat. 112, 641-657, 1978.
- 82) Mattick, J.; Zehner, Z.; Calabro, M.; Wakil, S.: Eur.J.
Biochem. 114, 643-651, 1981.
- 83) Kozak, M.: Cell 19, 79-90, 1980.
- 84) Zagorska, L.; Chroboczek, J.; Klitas, S.: Eur.J.Bio-
chem. 122, 265-269, 1982.
- 85) Kozak, M.: J.Biol.Chem. 254, 4731-4738, 1979.
- 86) Stewart, J.; Sherman, F.; Shipman, N.; Jackson, M.: J.
Biol.Chem. 246, 7429-7445, 1971.
- 87) Kozak, M.: Nucleic Acids Res. 12, 857-872, 1984.
- 88) Smith, A.E.; Marcker, K.A.: Nature, 226, 607-610, 1970.
- 89) Ranu, R.S.; Wool, I.G.: Nature 257, 616-618, 1975.
- 90) Banarjee, A.K.: Microbiol.Rev. 44, 175-205, 1980.
- 91) Furuichi, Y.; Lafiandra, A.; Shaktin, A.J.: Nature 266,

235-239, 1977.

- 92) Moyer, S.A.: *Virology* 112, 157-168, 1981.
- 93) Smith, A.E.; Clark, J.M.: *Biochemistry* 18, 1366-1371, 1979.
- 94) Paterson, B.M.; Rosenberg, M.: *Nature* 279, 692-696, 1979.
- 95) Lodish, H.F.S.; Rose, J.K.: *J.Biol.Chem.* 252, 1181-1188, 1977.
- 96) Hickey, E.D.; Weber, L.A.; Baglioni, C.: *Proc.Natl. Acad.Sci.* 73, 19-23, 1976.
- 97) Canaani, D.; Revel, M.; Groner, Y.: *FEBS Lett.* 64, 326-331, 1976.
- 98) Weber, L.A.; Hickey, E.D.; Nuss, D.L.; Baglioni, C.: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 74, 3254-3258, 1977.
- 99) Weber, L.A.; Hickey, E.D.; Baglioni, C.: *J.Biol.Chem.* 253, 178-183, 1978.
- 100) Chu, L-Y.; Rhoads, R.E.: *Biochemistry* 19, 184-191, 1980.
- 101) Rhoads, R.; Hellmann, G.M.; Remy, P.; Ebel, J-P.: *Biochemistry* 22, 6081-6088, 1983.
- 102) Jacobson, A.; Favreau, M.: *Nucleic Acids Res.* 11, 6353-6368, 1983.
- 103) Zeevi, M.; Nevins, J.R., Darnell, J.E.: *Cell* 26, 39-46, 1981.
- 104) Zeevi, M.; Nevins, J.R.; Darnell, J.E.: *Mol.Cell.Biol.* 2, 517-525, 1982.

- 105) Desphande, A.K., Chatterjee, B.; Roy, A.K.: J.Biol. Chem. 254, 8937-8942, 1979.
- 106) Palatnik, E.M.; Storti, R.V.; Capone, A.K.; Jacobson, A.: J.Mol.Biol. 141, 99-118, 1980.
- 107) Soria, M.; Huang, A.S.: J.Mol.Biol. 77, 449-456, 1973.
- 108) Doel, M.T.; Carey, N.H.: Cell 8, 51-58, 1976.
- 109) Palatnik, C.M.; Wilkins, C.; Jacobson, A.: Cell 36, 1017-1025, 1984.
- 110) Lodish, H.F., Nathan, D.G.: J.Biol.Chem. 247, 7822-7829, 1972.
- 111) Kelley, D.; Coleclough, C.; Perry, R.P.: Cell 39, 681-689, 1982.
- 112) Kitamura, N.; Semler, B.L.; Rothberg, P.G.; Larsen, G.R.; Adler, C.J.; Dorner, A.J.; Emini, E.A.; Hanecak, R.; Lee, J.J.; Van Der Werf, S.; Anderson, C.W.; Wimmer, E.: Nature 291, 547-553, 1981.
- 113) Kozak, M.: Curr.Top.Microbiol.Immunol. 93, 81-123, 1981.
- 114) Kozak, M.: Nucleic Acids Res. 9, 5233-5252, 1981.
- 115) Kozak, M.: Nature 308, 241-246, 1984.
- 116) Tahara, S.M.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J.: J.Biol.Chem. 258, 11350-11353, 1983.
- 117) Sonenberg, N.: Nucleic Acids Res. 9, 1643-1656, 1981.
- 118) Seal, S.N.; Schmidt, A.; Marcus, A.: Proc.Natl.Acad.

- Sci. U.S.A. 80, 6562-6565, 1983.
- 119) Tahara, S.M.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J.: J.Biol.Chem. 256, 7691-7694, 1981.
- 120) Sonenberg, N.; Morgan, M.A.; Merrick, W.C.; Shatkin, A.J.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75, 4843-4847, 1978.
- 121) Hansen, J.; Ehrenfeld, G.: J.Virol. 38, 438-445, 1981.
- 122) Anderson, W.F.; Bosch, L.; Cohn, W.E.; Lodish, H.F.; Merrick, W.C.; Weissbach, H.; Wittmann, H.G.; Wool, I.G. FEBS Lett. 76, 1-10, 1977.
- 123) Webb, N.R.; Chari, R.; De Pillis, G.; Kozarich, J.W.; Rhoads, R.E.: Biochem. 23, 177-181, 1984.
- 124) Lee, K.A.W.; Guertin, D.; Sonenberg, N.: J.Biol.Chem. 258, 707-710, 1983.
- 125) Sonenberg, N.; Guertin, D.; Cleveland, D.; Trachsel, H.: Cell 27, 563-572, 1981.
- 126) Hellman, G.M.; Chu, L-Y.; Rhoads, R.: J.Biol.Chem. 257, 4056-4062, 1982.
- 127) Sonenberg, N.; Rupprecht, K.M.; Hecht, S.M.; Shatkin, A.J.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76, 4345-4349, 1979.
- 128) Trachsel, H.; Sonenberg, N.; Shaktin, A.J.; Rose, J.K.; Leong, K.; Bergmann, J.E.; Gordon, J.; Baltimore, D.: Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 770-774, 1980.
- 129) Preobrazhensky, A.A.; Spirin, A.: Progr.Nucleic Acids Res. 21, 1-38, 1978.

- 130) Setyono, B.; Greenberg, J.R.; Cell 24, 775-783, 1981.
- 131) Standart, N.; Vincent, A.; Scherrer, K.: FEBS Lett. 135, 56-60, 1981.
- 132) De Herdt, E.; Thoen, C.; Van Hove, L.; Roggen, R.; Piot, E.; Slegers, H.: Eur.J.Biochem. 139, 155-162, 1984.
- 133) Maundrell, K.; Maxwell, E.; Puvion, E.; Scherrer, K.: Exp.Cell Res. 136, 435-445, 1981.
- 134) De Herdt, E.; Marbaix, G.; Tencer, R.; Slegers, H.: Eur.J.Biochem. 132, 623-627, 1983.
- 135) Moffett, R.; Webb, T.: Biochem. 20, 3253-3262, 1981.
- 136) Kozak, M.: Cell 22, 459-467, 1980.
- 137) Morgan, M.; Shatkin, A.: Biochem. 19, 5960-5966, 1980.
- 138) Kozak, M.: Cell 15, 1109-1123, 1978.
- 139) Kozak, M.; Shatkin, A.: J.Biol.Chem. 253, 6568-6577, 1978.
- 140) Andersen, K.: Eur.J.Biochem. 96, 109-118, 1979.
- 141) Lauer, S.; Burks, E.; Irvin, J.; Ravel, J.: J.Biol. Chem. 259, 1664-1648, 1984.
- 142) Slobin, L.: J.Biol.Chem. 258, 4895-4900, 1983,
- 143) Weissbach, H.; Ochoa, S.: Ann.Rev.Biochem. 45, 191-216, 1976.
- 144) Iglewsky, W.; Lee, H.: Eur.J.Biochem. 134, 237-240, 1983.

- 145) Van Ness, B.; Howard, J.; Bodley, J.: J.Biol.Chem. 255, 10710-10716, 1980.
- 146) Caskey, C.: Trends Biochem.Sci. 5, 234-237, 1980.
- 147) Ochoa, S.; De Haro, C.: Ann.Rev.Biochem. 48, 549-580, 1979.
- 148) Farrel, P.; Balkow, K.; Hunt, T.; Jackson, R.; Trachsel, H.: Cell 11, 187-200, 1977.
- 149) Zardaneta, G.; Ramer, G.; Hardesty, B.: Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 79, 3158-3161, 1982.
- 150) De Benedetti, A.; Baglioni, C.: J.Biol.Chem. 258, 14556-14562, 1983.
- 151) Kerr, I.M.; Brown, R.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75, 256-260, 1978.
- 152) Clemens, M.; Williams, B.: Cell 13, 565-572, 1978.
- 153) Grosfeld, H.; Ochoa, S.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77, 6526-6530, 1980.
- 154) Franco, R.; Roberts, K.; Martelo, O.: Arch.Biochem. Biophys. 214, 186-191, 1982.
- 155) Kumagai, H.; Kato, H.; Igarashi, K., Hirose, S.: J. Biochem. 94, 71-77, 1983.
- 156) Little, B.; Whittingham, L.: Biochim.Biophys.Acta 655, 251-255, 1981.
- 157) Aoki, Y.; Mizuno, D.; Goto, S.: J.Biochem. 90, 737-748, 1981.

- 158) Okazaki, H.; Ittel, M.; Niedergang, C.; Mandel, P.:
Biochim.Biophys.Acta 391, 84-95, 1975.
- 159) Gileadi, O.; Loberboum, H.; Groot, N.; Hochberg, A.:
Mol.Biol.Rep. 9, 241-244, 1984.
- 160) Ray, B.; Brendler, T.; Adya, S.; Daniels-McQueen, S.;
Miller, J.; Hershey, J.; Grifo, J.; Merrick, W.C.;
Trach, R.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 80, 663-667,
1982.
- 161) Rosenthal, E.; Hunt, T.; Ruderman, J.: Cell 20,
487-494, 1980.
- 162) Rosenthal, E.; Brandhorst, B.; Ruderman, J.: Dev.Biol.
91, 215-220, 1982.
- 163) Alton, T.; Lodish, C.: Cell 12, 301-310, 1977.
- 164) Ballinger, D.; Pardue, M.: Cell 33, 103-114, 1983.
- 165) Daniels-McQueen, S.; Morgan-Detjen, B.; Grifo, J.;
Merrick, W.C.; Trach, R.: J.Biol.Chem. 258, 7195-7199,
1983.
- 166) Kabat, D.; Chappell, M.: J.Biol.Chem. 252, 2684-2690,
1977.
- 167) Berns, A.; Salden, M.; Bogdawovsky, D.; Raymondjean,
M.; Schapira, G.; Bloemandal, H.: Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 72, 714-718, 1975.
- 168) De Herdt, E., Slegers, H., Piot, E.; Kondo, M.: Nucleic
Acids Res. 7, 1363-1373, 1979.

- 169) Northemann, W.; Schmelzer, E.; Heinrich, P.: Eur.J. Biochem. 112, 451-459, 1980.
- 170) Kennedy, D.S.; Siegel, E.; Heywood, S.: FEBS Lett. 90, 209-214, 1978.
- 171) Winkler, M.; Lashbrook, C.; Hershey, J.; Mukherjee, A.; Sarkar, S.: J.Biol.Chem. 258, 15141-15145, 1983.
- 172) Sarkar, S.; Mukherjee, A.; Guha, L.: J.Biol.Chem. 256, 5077-5086, 1981.
- 173) Baglioni, C.: Cell 17, 255-264, 1979.
- 174) Lengyel, P.: Ann.Rev.Biochem. 51, 251-282, 1982.
- 175) Kimchi, A.; Shure, H.; Revel, M.: Eur.J.Biochem. 114, 5-10, 1981.
- 176) Abraham, A.; Phil, A.: Trends Biochem.Sci. 6, 106-107, 1981.
- 177) Heby, O.; Marton, L.J.; Zardi, L.; Russell, D.; Baserga, R.: Exp.Cell Res. 90, 8-14, 1975.
- 178) Jänne, J.; Pösö, H.; Raina, A.: Biochim.Biophys.Acta 473, 241-293, 1978.
- 179) Sunkara, P.; Rao, P.: Adv.Polyam.Res. 3, 347-356, 1981.
- 180) Kay, J.; Lindsay, J.: Biochem.J. 132, 791-796, 1973.
- 181) Mamont, P.; Danzin, C.: Adv.Polyam.Res. 3, 123-135, 1981.
- 182) Bachrach, U.; Menashe, M.; Faber, J.; Desser, H.; Seiler, N.: Adv.Polyam.Res. 3, 259-274, 1981.

- 183) McCann, P.P.; Tardif, C.; Duchesne, M.; Mamont, P.S.:
Biochem.Biophys.Res.Commun. 76, 893-899, 1977.
- 184) Metcalf, B.W.; Bey, P.; Danzin, C.; Jung, M.J.; Casara,
P.; Vevvert, J.: J.Am.Chem.Soc. 100, 2551-2553, 1978.
- 185) Williams-Ashman, H.G.; Schenone, A.: Biochem.Biophys.
Res.Commun. 46, 288-295, 1972.
- 186) Pegg, A.G.: J.Biol.Chem. 253, 539-542, 1978.
- 187) Jänne, J.; Alhonen-Hongisto, L.; Seppänen, P.; Hölta,
E.: Adv. in Polyam.Res. 3, 85-95, 1981.
- 188) Cooper, H.L. en: "Drugs and Cell Cycle" (A.M.
Zimmerman; G.M. Padilla; I.L. Cameron) Academic Press,
New York: 137-194, 1973.
- 189) Ling, N.R.; Kay, J.E. en: "Lymphocyte Stimulation",
2da. Edición, Elsevier North/Holland - Amsterdam:
324-337, 1975.
- 190) Waithe, W.; Renaud, J.; Nadeau, P.; Pallota, D.:
Biochem. 22, 1778-1783, 1983.
- 191) Canton, H.; Boyle, E. en: "Differentiation of Normal
and Neoplastic Hematopoietic Cells", C.S.H.L. in Cell
Proliferation 5, 427-432, 1978.
- 192) Reinherz, E.L.; Schlossman, S.: Cell 19, 821-827, 1980.
- 193) Cooper, H.L.: Methods in Enzymol. 32, 633-636, 1976.
- 194) Greaves, M.F.; Bauminger, S.: Nature New Biol. 235,
67-70, 1972.

- 195) Novogrodsky, A.; Rubin, A.; Stenzel, K.H. en: "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function", M.R. Quastel, Academic Press Inc., New York: 11-25, 1975.
- 196) Stenzel, K.H.; Rubin, A.L.; Novogrodsky, A. en: "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function", M.R. Quastel, Academic Press Inc., New York: 149-154, 1975.
- 197) Larsson, E-L.; Coutinho, A.: Nature 280, 239-241, 1979.
- 198) Gillis, S.; Mizel, S.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78, 1133-1137, 1981.
- 199) Koretzky, G.A.; Daniele, R.P.; Greene, W.C.; Nowell, P.C.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 80, 3444-3447, 1983.
- 200) Udey, M.C.; Parker, W.C.: Fed.Proc. 39, 3159-3161, 1980.
- 201) Ravid, A.; Rubin, A.; Novogrodsky, A.; Stenzel, K.H.: Exp. Cell Res. 145, 239-244, 1983.
- 202) Segel, G.B.; Simon, W.; Lichtman, M. en: "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function", M.R. Quastel, Academic Press Inc., New York: 63-72, 1975.
- 203) Freedman, M.H. en: "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function", M.R. Quastel, Academic Press Inc., New York: 49-61, 1975.
- 204) Hesketh, T.R.; Bavetta, G., Smith, A.; Metcalfe, J.C.: Biochem.J. 214, 575-599, 1983.
- 205) O'Flynn, K.; Lynch, D.C.; Tatham, P.: Biochem.J. 129,

- 661-666, 1984.
- 206) Gerson, D.F.; Kiefer, H.; Eufe, W.: Science 216, 1009-1010, 1982.
- 207) Höltta, E.; Jänne, J.; Hovi, T.: Biochem.J. 178, 109-117, 1979.
- 208) Wettenhall, R.E.H.; London, D.R.: Biochim.Biophys.Acta 349, 214-225, 1974.
- 209) Degen, J.L., Neubauer, M.G.; Friezner-Degen, S.J.; Seyfried, C.E.; Morris, D.R.: J.Biol.Chem. 258, 12153-12162, 1983.
- 210) Fillingame, R.H.; Morris, D.R.: Biochem.J. 12, 4479-4487, 1973.
- 211) Burrone, O.R.; Algranati, I.D.: Mol.Cell Biochem. 16, 105-110, 1977.
- 212) Kay, J.E.; Wallace, D.M.; Benzie, C.R.; Jagus, R. en: "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function", M.R. Quastel, Academic Press Inc., New York: 107-114, 1975.
- 213) Kecskemthy, N.; Schäffer, K.: Eur.J.Biochem. 126, 573-582, 1982.
- 214) Key, J.E., Benzie, C.R.; Dicker, P.; Lindahl-Kiessling, K.: FEBS Lett. 91, 40-44, 1978.
- 215) Burrone, O.R.; Algranati, I.D.: FEBS Lett. 102, 91-94, 1979.

- 216) Wettenhall, R.E.; Slobbe, A.: *Biochim.Biophys.Acta* 563, 400-412, 1979.
- 217) Wu, R.S.; Tsai, J.; Bonner, W.M.: *Cell* 31, 367-374, 1982.
- 218) Wu, R.S., Tsai, J.; Bonner, W.M.: *Biochem.* 22, 3868-3873, 1983.
- 219) Shiba, T.; Mizote, H.; Kaneko, T.; Nakajima, T.; Kaki-moto, Y.; Sano, I.: *Biochim.Biophys.Acta* 244, 523-531, 1971.
- 220) Park, M.H.; Cooper, H.L.; Folk, J.E.: *J.Biol.Chem.* 257, 7217-7222, 1982.
- 221) Cooper, H.L., Park, M.H.; Folk, J.E.: *Cell* 29, 791-797, 1982.
- 222) Cooper, H.L., Park, M.H.; Safer, B.; Braverman, R.: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 80, 1854-1857, 1983.
- 223) Hauser, H.; Knippers, R.; Schäffer, K.: *Exp.Cell Res.* 111, 175-184, 1978.
- 224) Jagus, R.; Kay, J.E.: *Eur.J.Biochem.* 100, 503-510, 1979.
- 225) Grunet, B.; Schäffer, K.: *Exp. Cell Res.* 140, 137-147, 1982.
- 226) Wallace, D.M.; Kay, J.E.: *Bios.Sci.Rep.* 1, 539-545, 1981.
- 227) Berger, S.L.; Birkenmeier, C.S.: *Biochim.Biophys.Acta*

562, 80-91, 1971.

- 228) McCairs, E.; Fahey, D.; Muscat, G.; Rowe, P.: Mol.Cell. Biochem. 56, 165-175, 1983.
- 229) Baserga, R.: Exp.Cell Res. 151, 1-5, 1984.
- 230) Mercer, W.E.; Avignolo, C.; Galanti, N.; Rose, K.; Hyland, J.; Jacob, S.; Baserga, R.: Exp.Cell Res. 150, 118-130, 1984.
- 231) Neckers, C.K., Cossman, J.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 80, 3494-3498, 1983.
- 232) Clemmons, D.R.; Van Wyk, J.J.; Pledger, W.J.: Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77, 6644-6648, 1977.
- 233) Algranati, I.D.; Goldemberg, S.H.: Trends Biochem.Sci. 2, 272-274, 1977.
- 234) Fridlender, B.R.; Medrano, E.E.; Mordoh, J.: Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 71, 1128-1132, 1974.
- 235) Roberts, B.E.; Patterson, B.M.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 70, 2330-2334, 1973.
- 236) Abraham, A.R.; Kolseth, S.; Phil, A.: Eur.J.Biochem. 24, 383-388, 1982.
- 237) Ramsey, S.C.; Steele, W.: Anal.Biochem. 92, 305-313, 1979.
- 238) Blobel, G.; Polter, V.R.: J.Mol.Biol. 28, 539-542, 1967.
- 239) Arlinghaus, R.B.; Ascione, R. en: "Protein Biosynthesis

- in Non-Bacterial Systems" (Ed. J.A. Last, A.I. Laskin), Marcel Dekker, New York: 52-53, 1972.
- 240) Fedoroff, N.V.; Zinder, N.D.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 68, 1838-1843, 1971.
- 241) Burrone, O.R.: "Regulación de la síntesis de proteínas en linfocitos humanos." Tesis para optar al título de Doctor en Química, F.C.E.N., 1979.
- 242) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.R., Randall, R.J.: J.Biol.Chem. 193, 265-275, 1951.
- 243) Bernardi, G.; Giro, M.G.; Gaillard, C.: Biochim.Biophys.Acta 278, 409-420, 1972.
- 244) Nygard, O.; Westermann, P.; Nultin, T.: Biochim.Biophys.Acta 608, 196-200, 1980.
- 245) Nygard, O.; Westermann, P.: Biochim.Biophys.Acta 697, 263-269, 1982.
- 246) Anehus, S.; Pohjanpelto, P.; Baldetorp, B.; Langström, E.; Heby, O.: Mol.Cell.Biol. 4, 915-922, 1984.
- 247) Pleshkewych, A.; Maurer, T.C.; Porter, C.W.: Cancer Res. 43, 646-652, 1983.
- 248) Jänne, J.; Morris, D.R.: Biochem.J. 218, 947-951, 1984.