UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS-ARAGUA

PARTICIPACION DE UNA PROTEINA HOMOLOGA A EF-1α EN LA INICIACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

JUANA LEDIA TRIANA ALONSO

MARACAY, Junio, 1998

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS-ARAGUA

PARTICIPACION DE UNA PROTEINA HOMOLOGA A EF-1α EN LA INICIACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo presentado al Honorable Consejo de la Facultad de Ciencias de la Salud para ascender a la categoría de Profesor Asociado en el Escalafón del Personal Docente y de Investigación de la Universidad de Carabobo.

JUANA LEDIA TRIANA ALONSO

MARACAY, Junio, 1998

- ***A Samuel y Gabriel***
- ***A Fernando***

AGRADECIMIENTOS

- ✓ *A la Lic. Ana Celia Ferreras por los momentos de júbilo en la realización conjunta de los experimentos.*

- ✓ *Al Dr. Heriberto Correia por las sugerencias e ideas durante la ejecución del trabajo.*

- ✓ *Al Dr. Edmundo Cayama por su valiosa colaboración en el desarrollo de algunos de los experimentos.*

- ✓ *A los Técnicos Antonio Yépez y María de Rivero por su ayuda en la obtención de los cultivos y preparación del material.*

- ✓ *A los Investigadores del BIOMED y a los Profesores del Departamento de Física, Química y Matemáticas por la colaboración brindada.*

- ✓ *A la Dra. Flor Herrera por su apoyo, sugerencias e ideas en la realización del trabajo, y por brindarme la opurtunidad de trabajar en el Laboratorio de Síntesis de Proteínas del BIOMED.*

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE SINTESIS DE PROTEINAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO NUCLEO ARAGUA.

EL TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO DE DESARROLLO CIENTIFICO HUMANISTICO Y TECNOLOGICO (CODECIHT, PROYECTO N° FCS-003-86).

RESUMEN

PARTICIPACION DE UNA PRO V [OMOLOGA A EF-1α EN LA INICIACION DE LA SINTESIS DE I AS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Autor: Juana I a Alonso

Maracay, Junio, 1998

El RNPm de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** aislado de los polisomas, tiene asociados a tres polipéptidos principales de 72, 60 y 50 KDa. El polipéptido de 72 KDa es la proteína asociada a la cola de poli (A) en la región 3' terminal del ARNm llamada PABP, y es importante en la formación del complejo de iniciación 80S ya que anti-PABP inhibe la formación de este complejo. El polipéptido de 50 KDa (50RNPm) se detecta en el complejo de preiniciación 48S, en el complejo de iniciación 80S, y es indispensable para su formación ya que anti-50RNPm inhibe a ambos complejos. Esta proteína asociada al RNPm es homóloga al factor de elongación EF-1α de la síntesis proteica, ya que un anticuerpo aislado contra este polipéptido (anti-50RNPm) reacciona con EF-1α purificado, y anti-EF-1α reconoce a 50RNPm. Ambos polipéptidos se encuentran relacionados estructuralmente, aunque no son completamente equivalentes, al mostrar un patrón peptídico similar a tiempos cortos de incubación con la proteasa Licina-C, y algunas diferencias a tiempos largos de incubación. La relación estructural entre EF-1α y 50RNPm también se demuestra cuando anti-50RNPm inhibe la síntesis de polifenilalanina dependiente de poli (U) al igual que lo hace anti-EF-1α. Igualmente, anti-EF-1α inhibe a los complejos de iniciación de manera similar a anti-50RNPm. Por otro lado, el factor de elongación EF-1α purificado es capaz de recuperar la síntesis de proteínas dependiente de RNPm, la síntesis de polifenilalanina dependiente de poli (U) inhibidas con ambos anticuerpos (anti-EEF-1α y anti-50RNPm), y los complejos de iniciación de la síntesis proteica.

ABSTRACT

vi

INVOLVEMENT OF mRNP PROT RUCTURALLY RELATED TO THE TRANSLATIONAL ELONGATION FACTOR EF-1 IN THE INITIATION PROTEIN SYNTHESIS OF *Saccharomyces cerevisiae*

Autor: Juana Ledia Triana
Maracay, Junio, 1998

A yeast 50 KDa mRNA-binding protein (50mRNP) is found selectively associated with the 48S and 80S initiation complexes. This protein is structurally related to the translational elongation factor EF-1α. The protein reacts with antidodies directed against EF-1α and similarly, EF-1α recognizes antibodies against the 50mRNP protein. This evidences that they share at least an epitope which allows a similar antigenic behavior. In addition, both proteins show similar cleavage upon treatment with the endoproteinase Lys-C. A murine antibody raised against 50mRNP inhibits both 48S and 80S initiation complex formation. The inhibitory effect is relieved by preincubating anti-50mRNP with EF-1α. Antibody to EF-1α manifests a similaar inhibitory pattern for the formation of 48S and 80S complexes. These date strongly suggest that 50mRNP is an EF-1α-like polypeptide essential for the formation of the above complexes.

INDICE
vii

PAGINA

1.0.INTRODUCCION.....**2**
1.1. SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES.....**2**
1.1.1. INICIACION.....**2**
***1.1.1.1. Disociación de ribosomas*.....5**
***1.1.1.2.Formación del complejo ternario y del complejo de preiniciación..43S*.....6**
***1.1.1.3. Activación del ARNm y formación del complejo depreiniciación.48S*.....8**
***1.1.1.4. Formación del complejo de iniciación 80S*..... .....19**
1.1.2. ELONGACION EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE EUCARIOTES.....**20**
***1.1.2.1. Enlace del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma*.....22**
***1.1.2.2. Formación del enlace peptídico*.....24**
***1.1.2.3. Translocación y salida del ARNt deacilado*.....24**
1.1.3. TERMINACION EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE EUCARIOTES.....**25**
1.2. COMPLEJOS FORMADOS POR ARNm Y PROTEINAS.....**26**
***1.2.1. Complejos RNPms libres citoplasmáticos o Informosomas*.....29**
***1.2.2. Complejos RNPms polisomales*.....31**
***1.2.2.1. Proteína de 70-78 KDa en los RNPms polisomales*.....32**
***1.2.2.2. Proteína de 50-60 KDa en el RNPm polisomal*.....37**
1.3. REGULACION TRADUCCIONAL DE MENSAJEROS ESPECIFICOS.....**39**
***1.3.1. Control traduccional por interacción de proteínas en la región 5' no traducible del ARNm*.....40**
***1.3.2. Regulación traduccional por secuencias específicas en la región.3' terminal no traducible del ARNm independientes de cambios en.la poliadenilación*.....42**
***1.3.3. Regulación en la traducción por cambios en la poliadenilación del ARNm*.....44**
***1.3.4. Regulación por ARNs pequeños*.....46**
2.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....**48**
3.0. OBJETIVOS.....**51**
4.0. MATERIALES Y METODOS.....**53**
4.1. ESQUEMA METODOLOGICO.....**53**
4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....**54**
***4.2.1. Cultivo de Saccharomyces cerevisiae*.....54**

INDICE

PAGINA

4.2.2. Preparación del extracto de levadura libre de polisomas S-100'.....55
4.2.3. Preparación del RNPm total polisomal de levadura.....56
4.2.4. Marcaje del RNPm total polisomal con ^{3}H Uracilo.....57
4.2.5. Marcaje de las proteínas asociadas al RNPm polisomal con ^{125}I.....57
4.2.6. Preparación del RNPm poli $(A)^{+}$.....58
4.2.7. Ensayo para la determinación de la síntesis de proteínas dependiente.... de RNPm poli $(A)^{+}$ exógeno.....59
4.2.8. Ensayo para la determinación de la síntesis de polifenilaalanina dependiente de poli (U).....60
4.2.9. Ensayo de formación del complejo de preiniciación 48S.....60
4.2.10. Ensayo de formación del complejo de iniciación 80S.....61
4.2.11. Gradientes de sacarosa.....61
4.2.12. Preparación de EF-1α.....62
4.2.13. Preparación de anti-EF-1α, anti-50RNPm y anti-PABP.....62
4.2.14. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas.asociadas al RNPm polisomal.....63
4.2.15. Ensayos.de inmunotransferencia.....64
4.2.16. Ensayo .de proteólisis.....66
5.0.RESULTADOS.....68
5.1. Detección de las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^{+}$ polisomal.....68
5.2. Participación de los polipéptidos asociados al RNPm poli $(A)^{+}$ en los.complejos de iniciación.....70
5.3. Reacción de anti-50RNPm con el RNPm poli $(A)^{+}$ y el sistema libre de. células.....70
5.4. Inhibición de la síntesis de proteínas por anti-50RNPm y anti-PABP.....71
5.5. Inhibición de los complejos de iniciación por anti-50RNPm y anti-PABP.....72
5.6. Características del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^{+}$.....75
5.7. Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por anti-50RNPm.....76
5.8. Inhibbición de los complejos de iniciación por anti-EF-1α.....77

INDICE

PAGINA

***5.9. Recuperación de la síntesis de proteínas y síntesis de polifenilalanina por EF-1α*.....77**
***5.10. Recuperación de los complejos de iniciación por EF-1α*.....78**
6.0. DISCUSION.....**81**
7.0. CONCLUSIONES.....**91**
8.0. BIBLIOGRAFIA.....**93**
9.0. ABREVIATURAS.....**108**
10.0. TABLAS Y FIGURAS.....**110**

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

x **PAGINA**

TABLA I. FACTORES DE INICIACIÓN EN LA TRADUCCIÓN DE EUCARIOTES.....**4**
TABLA 1.EFECTO DE ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP SOBRE LA TRADUCCION DE RNPm POLI $(A)^+$ EN EL SISTEMA LIBRE DE CELULA.....**110**
TABLA 2. EFECTO DE ANTI-50RNPm SOBRE LA TRADUCCION DE POLI (U) EN EL SISTEMA LIBRE DE Células.....**111**
FIGURA I. INICIACIÓN EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE EUCARIOTES.....**3**
FIGURA II. DESDOBLAMIENTO DEL ARNm EN LA REGIÓN 5´ TERMINAL POR EL COMPLEJO eIF-4F.....**14**
FIGURA III. MECANISMO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN 48S.....**15**
FIGURA IV. MODELO PARA LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN 48S.....**17**
FIGURA 1. DETECCION DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm.....**112**
FIGURA 2. PARTICIPACION DE ^{125}I 50RNPm EN LOS COMPLEJOS DE INICIACION.....**113**
FIGURA 3. REACCION DE ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP CON LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm POLI $(A)^+$ Y CON EL SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS.....**114**
FIGURA 4. GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA INHIBICION DE LOS COMPLEJOS DE INICIACION POR ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP.....**115**
FIGURA 5. INHIBICION DE LOS COMPLEJOS DE INICIACION POR ANTI-50RNPm.....**116**
FIGURA 6. EFECTO DE ANTI-PABP SOBRE LOS COMPLEJOS DE PREINICIACION 48S Y DE INICIACION 80S.....**117**
FIGURA 7. REACCION DE EF-1α Y LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm POLI $(A)^+$ CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm.....**118**
FIGURA 8. PROTEOLISIS DE EF-1α Y 50RNPm.....**119**
FIGURA 9. INHIBICION DEL COMPLEJO DE INICIACION 80S POR ANTI-EF-1α.....**120**
FIGURA 10. RECUPERACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS POREF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm.....**121**
FIGURA 11. RECUPERACION DE LA SINTESIS DE POLIFENILALANINA POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm Y ANTI-EF-1α.....**122**

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

PAGINA

FIGURA 12. RECUPERACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 80S POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm.....**123**

FIGURA 13. GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA RECUPERACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 80S POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm.....**124**

FIGURA 14. RECUPERACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm.....**125**

FIGURA 15.GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA RECUPERACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm.....**126**

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1.1. SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES

1.1.1. INICIACION

La síntesis de proteínas es uno de los principales procesos celulares en la expresión fenotípica de la información genética. Se lleva a cabo por medio de una secuencia de reacciones en las cuales participan un gran número de componentes, tales como: ribosomas, ácido ribonucleíco mensajero (ARNm), ácido ribonucleíco de transferencia (ARNt) y múltiples factores proteicos.

La secuencia de reacciones en el proceso han sido clasificadas en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. La iniciación es el paso limitante de la velocidad en la síntesis de proteínas, y es considerada como la etapa esencial en el modelo de regulación a nivel de la traducción. Esta etapa comprende la unión del ARNm al ribosoma hasta formar un complejo de iniciación funcional que pueda traducir el mensaje genético en una proteína específica.

El mecanismo general que se ha planteado para la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes se muestra en la Figura I, y está basado principalmente en los datos acumulados de los estudios realizasdos *in vitro* con sistemas traduccionales reconstituídos y factores purificados. En la Tabla I se hace un resumen de los principales factores proteicos caracterizasdos hasta el momento, e involucrados en este proceso de iniciación. Los diferentes pasos considerados hasta el presente y representados en la Figura I son los siguientes:

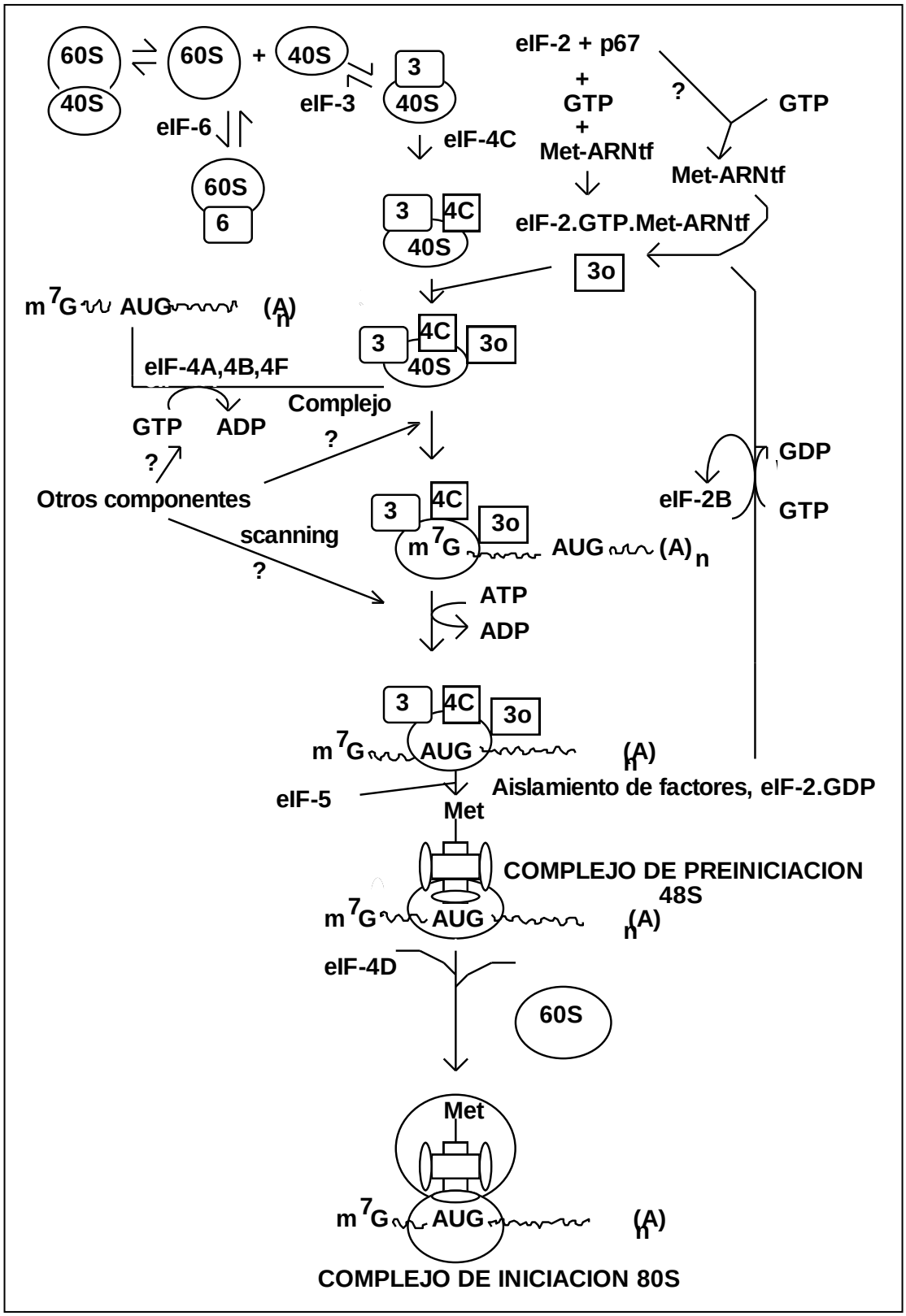


FIGURA I: INICIACION EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE EUCARIOTES

Nombre	*Mr(KDa)*	*Actividad*	*Cambios*	*Conocidos*	*Comentarios*
eIF-1	15	Pleiotrópico		NO	
eIF-2	36,38,55	Enlace del Met-ARNtf dependiente de GTP	36 y 38 PO_4	36, 38, 55	Mayor sitio de regulación
eIF-2A	65	Enlace del Met-ARNtf dependiente de AUG		NO	Funcional solo en presencia de AUG
eIF-2B, GEF	26, 39,58, 67 82	Intercambiador de nucleótidos de Guanina en el eIF-2	67 y 82 PO_4	26, 39, 58, 67, 82	
eIF-3	35, 36, 40, 44 47, 66, 115, 170	Disociación de subunidades ribosomales	35, 44, 47, 66, 115-PO_4	170	
eIF-4A	45	ATPasa dependiente de ARN		SI	Isozima
eIF-4B	80	Estimula la actividad de eIF-4A y eIF-4F	PO_4	SI	
eIF-4C	16	Disociación-Asociación de ribosomas		SI	Alelos/Isozima
eIF-4D	17	Estimula el primer enlace peptídico	Hiposina	SI	Isozima
eIF-4F	24, 45, 220	Reconocimiento de la estructura del cap en el ARNm	24 y 220-PO_4	24, 45,220	Mayor sitio de regulación.
iso-eIF-4F	28, 80	Reconocimiento de la estructura del cap en el ARNm		SI	Sólo en plantas
eIF-5	150 60	Asociación de subunidades	PO_4	NO SI	
eIF-6	25	Disociaación de subunidades		NO	
Otros Componentes					
SSL1	52	Desdoblamiento de la estructura de lazo en el ARNm		SI	
SSL2	95	Desdoblamiento de la estructura de lazo en el ARNm		SI	Motivos de Helicasa
La antígeno	52	Requerida para la óptima traducción del ARNm de poliovirus		SI	Iniciación Interna
PTB (proteína cola-pirimidinas)	57	Para óptima traducción de ARNm de EMCV		SI	Iniciación Interna
p67		Bloquea la fosforilación de eIF-2α	CHO	SI	

TABLA I: FACTORES DE INICIACION EN LA TRADUCCION DE EUCARIOTES

1.1.1.1. Disociación de ribosomas:

El ribosoma 80S (formado por las dos subunidades 40S y 60S) se disocia para dar origen a un conjunto de subunidades ribosomales 40S y 60S, las cuales van a participar en el proceso de iniciación. Los factores proteicos que interactuan con las subunidades ribosomales para producir su disociación son: el eIF-3 y eIF-4C con la subunidad 40S y el eIF-6 con la subunidad 60S.

En las células de eucariotes se detecta una fracción de las subunidades ribosomales 60S y 40S en estado libre, e interactuando con un cierto número de proteínas no ribosomales (Hirsch y col., 1973; Thompson y col., 1977). La mayor proporción de estas subunidades están unidas formando el ribosoma 80S, y su separación es un paso esencial para el posterior enlace del ARNm.

El eIF-3 es un complejo proteico de alto peso molecular formado por 7-11 polipéptidos. Se ha aislado de la subunidad ribosomal 40S nativa, y después de purificado es capaz de enlazarse a esta subunidad, también purificada, para formar una partícula que sedimenta entre 43S y 46S. Este complejo más pesado que la subunidad 40S está bloqueado para unirse a la 60S. Por análisis realizados mediante fijación química, el eIF-3 está enlazado covalentemente al ácido ribonucleíco ribosomal (ARNr) 18S mediante la subunidad de 66 KDa, y también a proteínas ribosomales (Thomas y Arnstein, 1984). El enlace parece estar en la interfase ribosomal, y en una posición adyacente al sitio donde reaccionarán posteriormente el eIF-2, ARNm y la subunidad 60S. La interacción del eIF-3 con la 40S es un requisito indispensable para las siguientes reacciones de esta subunidad con el ARNm y otros factores de iniciación.

El factor eIF-4C se ha reportado como un complemento del eIF-3 en la disociación del ribosoma (Thomas y Spermulli, 1980). Se ha detectado que estimula

la traducción del ARNm y la formación de intermediarios de iniciación en la presencia de otros factores.

El eIF-6 es un factor con un peso molecular alrededor de 25 KDa que previene la reasociación de las subunidades ribosomales por reacción con la 60S (Russell y Spermulli, 1980). Debido a su descubrimiento se cuestionó la función del eIF-3 en la disociación del ribosoma, y se sugirió que la actividad observada con el factor se debía a su contaminación con eIF-6. Sin embargo, no se han detectado cadenas polipeptídicas inferiores a 28 KDa en las preparaciones de eIF-3.

1.1.1.2. Formación del complejo ternario y del complejo de preiniciación 43S:

En este paso se produce la formación de un complejo ternario (eIF-2.GTP.Met-ARNf) constituído por el factor proteico de iniciación eIF-2, GTP y el ácido ribonucleico de transferencia iniciador para metionina (Met-ARNf). Este complejo se une, una vez formado, a la subunidad ribosomal 40S para dar origen el complejo de preiniciación 43S. En este proceso participan otros factores proteicos como el eIF-2B, al cual se le atribuye la función de intercambiar nucleótidos de guanina (GDP por GTP) en el complejo de eIF-2.GDP y permitir de esta forma su reciclaje (Trachesel y Staehelin, 1978).

El factor eIF-2 se ha purificado de una variedad de células y tiene un peso molecular nativo aldedor de 145 KDa. Está formado por tres subunidades denominadas α, β y γ (Ochoa, 1983). El eIF-2 asociado a GDP es la forma más estable de este factor en la célula. El complejo binario eIF-2.GDP es inactivo para formar el complejo ternario, y este hecho, se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas observada al agregar GDP a sistemas traduccionales acelulares.

Hay dos mecanismos que se han propuesto para la participación de eIF-2B o GEF en el intercambio del GDP enlazado a eIF-2 por GTP (Rowlansd y col., 1988; Dholakia y col., 1989). Una serie de estudios recientes parecen indicar que el modelo correcto es uno en el cual se forma un complejo cuaternario constituído por eIF-2.GDP.eIF-2B.GTP (Oldfield y Proud, 1992; Price y Proud, 1994). Sin embargo, la subunidad γ del eIF-2 es probablemente la responsable del enlace de GTP, ya que por secuencia de aminoácidos está relacionada con el factor de elongación EF-Tu de bacterias (Gaspar y col., 1994; Hanning y col., 1993). Por esta razón, hay opiniones de que el mecanismo vía un complejo ternario (eIF-2.GDP.eIF-2B) sería más razonable por analogía con el mecanismo de intercambio para el EF-Tu/EF-Ts en bacterias.

En algunos sistemas como el de reticulocitos se ha reportado a una proteína con un peso molecular alrededor de 67 KDa que aparentemente participa en la formación del complejo ternario. La función de esta proteína es prevenir la fosforilación de la subunidad α del factor eIF-2 por la quinasa HCR o PKR (Datta y col., 1988; Ray y col., 1993). Dicha fosforilación en la serina 51 de eIF-2α provoca una inhibición en la entrada de GTP para formar el complejo ternario. La formación y disponibilidad del complejo ternario en sistemas de reticulocitos puede verse afectada entonces por las siguientes reacciones: a) Activación de las proteínas quinasas específicas para eIF-2 con la proteína p67. b) Asociación de eIF-2 con la proteína p67 c) Regulación de la actividad de fosfatasa para remover el fosfato de la serina 51 de eIF-2α (Kimball y col., 1991).

Algunos estudios han involucrado al factor eIF-2 como un regulador en la síntesis de proteínas. Esta conclusión está basada en los experimentos realizados con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), donde se observó una traducción selectiva del ARN del virus (Centrella y Lucas-Lenard, 1982). La explicación a estos resultados fue la característica que poseen algunos ARN virales de tener secuencias que enlazan

al eIF-2, y dicha habilidad está relacionada para competir en la traducción con los ARNm celulares.

En el proceso de unión del complejo ternario a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo 43S, se han implicado a los factores eIF-1, eIF-2B eIF-3 y al factor eIF-2A. Este último funciona solamente de una manera dependiente del codón AUG sobre la subunidad ribosomal 40S. Sin embargo, el complejo ternario tiene la capacidad de enlazarse a la subunidad 40S lavada con alta concentración salina en ausencia de otros factores.

1.1.1.3. Activación del ARNm y formación del complejo de preiniciación 48S

El tercer paso es la activación del ARNm por los factores eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E y eIF-4γ en una reacción dependiente de ATP, y en la cual se obtiene el desdoblamiento de la estructura secundaria del ARNm cercana a la estructura denominada "cap" en la región 5' terminal (m^7G, 7-metilguanosina unido por un puente trifosfato al penúltimo nucleótido sobre el ARNm). El ARNm activado se enlaza a la subunidad ribosomal 40S en un proceso que es catalizado por varios factores de iniciación, y por proteínas y ARNr de la subunidad 40S. Seguidamente se produce el "scanning" o movimiento relativo del ribosoma sobre el ARNm desde la región 5' terminal hasta el primer codón AUG, ocurriendo entonces un apareamiento de bases con el anticodón del Met-ARNf. El complejo formado se denomina complejo de preiniciación 48S.

Los ADNc de los cuatro polipéptidos del grupo eIF-4 han sido clonados y secuenciados en una variedad de especies (Rhoads, 1993). También se puede aislar un complejo de alto peso molecular llamado eIF-4F formado por eIF-4A o p46, eIF-4E y eIF-4γ.

El factor eIF-4E es una proteína muy conservada con una masa aproximada de 25 KDa (Rhoads y col., 1991). Es el único factor del grupo eIF-4 que puede asociarse a la estructura del "cap" en la región 5' terminal del ARNm, y su actividad es controlada por fosforilación. Se aisla principalmente del lavado post-ribosomal (Webb y col., 1984) y aunque la gran parte de eIF-4E es encontrado en el citoplasma, se ha demostrado que una fracción de eIF-4E está localizada en el núcleo (Lejbkowicz y col., 1992) sugiriendo que también puede ejercer alguna función nuclear.

De todos los factores de iniciación, el eIF-4E es el que se encuentra en más baja concentración en la célula, y esto podría indicar una función limitante de la velocidad en la iniciación de la síntesis de proteínas (Rhoads y col., 1991). La sobreexpresión de eIF-4E en varios tipos de células causa cambios significativos en su crecimiento y morfología. En células He La CCL2 (De Benedetti y Rhoads, 1990), HBL100 (Rhoads y col., 1991), fibroblastos NIH-3T3 y Rat-2 (Lazaris-Karatzas y col., 1990) se observa una pérdida de inhibición por contacto, multinucleación y una habilidad para formar tumores, por lo que se concluye que eIF-4E tiene toda la actividad esperada de un producto oncogénico. Los dos posibles mecanismos que pueden explicar tales resultados son una aceleración general de la biosíntesis celular o la estimulación selectiva de proteínas que regulan el crecimiento. Cuando se aplica la técnica de ARN antisentido sobre eIF-4E ocurre una disminución de los niveles del factor en células He La CCL2, en la velocidad de crecimiento y en la traducción (De Benedetti y col., 1991).

El eIF-4E aislado de una variedad de células de mamíferos consiste en una mezcla del factor fosforilado y no fosforilado. El grado de fosforilación varía de 20% a 80% dependiendo del tipo de célula y condiciones de crecimiento (Rhoads, 1993). La posición de mayor fosforilación parece corresponder a la serina 53 (Rychlik y col., 1990), aunque también hay evidencias contrarias a este punto de vista (Kaufman y col., 1993). Todos los estudios realizados indican que la fosforilación de eIF-4E es

necesaria para su función efectiva en la traducción. A su vez, este proceso regula la síntesis de proteínas en la célula, ya que se ha demostrado que la forma fosforilada de eIF-4E tiene una mayor afinidad por análogos del "cap" y ARNm que la forma no fosforilada (Minich y col., 1994). La quinasa responsable para la fosforilación de eIF-4E no se conoce todavía. Ensayos *in vitro* han demostrado que el factor puede ser fosforilado por la Proteína Quinasa C (Rychlik y col., 1987).

El eIF-4A es un polipéptido simple con un peso molecular alrededor de 46 KDa (Edery y col., 1983). Presenta un dominio de enlace para ATP y tiene actividades de ATPasa y helicasa dependientes de ARN (Grifo y col., 1984). La mayor concentración de eIF-4A se encuentra en el sobrenadante post-ribosomal antes que asociado a los ribosomas (Thomas y col., 1979), y también se ha detectado en fracciones celulares conteniendo material del citoesqueleto (Howe y Hershey, 1984).

La actividad de ATPasa y desdoblamiento del ARN por eIF-4A son estimulados por una proteína con un peso molecular aproximado de 69 KDa llamada eIF-4B (Grifo y col., 1984). Los datos obtenidos de la fijación con luz ultravioleta (Pelletier y Sonenberg, 1985) y de espectroscopía por fluorescencia (Goss y col., 1987), sugieren que esta proteína tiene capacidad de enlazarse a ARN, y la secuencia aminoacídica de la proteína contiene efectivamente un dominio común de unión a ARN (Milburn y col., 1990). Se extrae del lavado salino ribosomal y también se ha encontrado al igual que eIF-4A en fracciones celulares que contienen material del citoesqueleto.

La sobreexpresión de eIF-4B en células He La produce una inhibición de cinco veces la velocidad de traducción, y este resultado es contrario a lo observado con el factor eIF-4E, eIF-4A y eIF-4γ (Milburn y col., 1990).

Se ha demostrado que eIF-4B se fosforila en múltiples sitios (Hershey, 1991), pero los datos no relacionan la actividad del factor *in vitro* a su estado de fosforilación. Sin embargo, la fosforilación de eIF-4B *in vivo* estimula la traducción, y su desfosforilación parcial ocurre bajo condiciones en las cuales se reprime la traducción por un choque térmico o eliminando nutrientes en el medio (Duncan y Hershey, 1984; Duncan y Hershey, 1985).

El factor puede ser fosforilado *in vitro* por AMPc dependiente de proteínas quinasas: Quinasa S6, Proteína-Quinasa C, Quinasa I activada por proteasas y Caseína-Quinasa II (Tuazon y col., 1989). Sin embarggo, se desconoce si alguna de estas quinasas funciona *in vivo*.

El factor eIF-4γ solamente ha sido extraído del lavado ribosomal formando complejos con otros polipéptidos del grupo eIF-4 (Sonenberg y col., 1979). En mamíferos la secuencia de la proteína corresponde a un polipéptido de 154 KDa (Yan y col., 1992), sin embargo, está formada por una mezcla heterogénea de formas, las cuales por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS tienen una masa molecular aparente entre 200 y 220 KDa. No se conoce aún cual es su función exacta en la iniciación de la síntesis de proteínas, pero es necesario para la traducción de ARNms con estructura secundaria y región del "cap" en la porción 5' terminal. Se ha demostrado que en muchas infecciones con poliovirus, la traducción de ARNms en las células huespedes es inhibida por una proteólisis selectiva de eIF-4γ ocasionada por productos virales (Etchison y col., 1982). También se ha demostrado que *in vivo* la expresión de eIF-4γ está coordinada con el nivel de eIF-4E.

La secuencia aminoacídica de eIF-4γ contiene un número de regiones que corresponden a secuencias de enlace para quinasas, incluyendo la Proteína Quinasa C y la Quinasa S6 con actividad mitogénica (Yan y col., 1992). La fosforilación de eIF-4γ en el complejo eIF-4F, aumenta su fijación al ARNm y su habilidad para estimular

la traducción en sistemas dependientes de eIF-4F, así como también cataliza la incorporación del ARNm dentro de los polisomas (Morley y col., 1991).

Los factores eIF-4E, eIF-4A y eIF-4B son extraídos principalmente como polipéptidos libres, pero cuando se realizan los lavados ribosomales de polisomas de mamíferos con 0.5 M KCl se obtiene un complejo de alto peso molecular llamado CBP II y formado por eIF-4E, eIF-4A, eIF-4B y eIF-4γ (Tahara y col., 1981).

El factor eIF-4B puede separarse del complejo CBP II con altas concentraciones de sal y el complejo restante llamado eIF-4F o eIF-4 queda formado por eIF-4E, eIF-4A y eIF-4γ en una razón estequiométrica de 1:1:1 (Grifo y col., 1983). En algunos esquemas alternativos de purificación se ha obtenido un complejo conteniendo solamente a eIF-4γ y eIF-4E. Este complejo se extrae por cromatografía del eIF-4F sobre fosfocelulosa, y ello sugiere una mayor afinidad de eIF-4A por la resina que por eIF-4E y eIF-4γ (Ray y col., 1985). También se ha detectado en células ascíticas de tumor de Ehrlich que eIF-4F contiene muy poco eIF-4A en comparación con las cantidades similares de eIF-4E y eIF-4γ (Lamphear y Panniers, 1990). Es importante señalar que el complejo eIF(iso)-4F en plantas (Browning y col., 1987) y eIF-4F en levadura consiste solamente de eIF-4E y eIF-4γ (Goyer y col., 1989).

Se ha demostrado que el factor eIF-4A en el complejo eIF-4F es una mezcla de dos formas, el eIF-4AI y el eIF-4AII (Conroy y col., 1990), y se puede intercambiar con el eIF-4A libre, bién sea como factores aislados, o en lisados de reticulocitos (Yoder y col., 1993). Para aumentar la velocidad del reciclaje se necesita ATP y ARNm.

Se han evaluado las funciones de diferentes secuencias en eIF-4A por mutagénesis dirigida (Pause y Sonenberg, 1992), y se identificaron algunas mutantes que se utilizaron para interpretar varios sitios funcionales. también se realizaron

ensayos agregando el factor eIF-4A mutado en una proporción del 10-20 % del eIF-4A total a lisados de reticulocitos, obteniendose una inhibición en la síntesis de proteínas entre 70-90 %. Sin embargo, la actividad de helicasa de eIF-4A fue inhibida en una cantidad proporcional al eIF-4A mutado que se agregaba en los ensayos (Pause y col., 1994). Por otra parte, la inactivación de eIF-4F con FSBA (Fluorosulfonilbenzoiladenosina) nunca proporciona un sistema más activo al agregar eIF-4A, sin embargo, el tratamiento de eIF-4A con FSBA origina un sistema inhibido en la iniciación de la síntesis de proteínas (Anthony y Merrick, 1992).

Los resultados anteriores en el sistema de reticulocitos llevaron a plantear un mecanismo por el cual el factor eIF-4A se enlaza al ARNm a través del complejo eIF-4F y en presencia de eIF-4B (Figura II). En este mecanismo el eIF-4A asociado al complejo eIF-4F enlaza ATP, y dicho complejo se une a la estructura del "cap" en la región 5' terminal del ARNm. En la presencia de eIF-4B ocurre la hidrólisis de ATP y la sálida de eIF-4E y eIF-4γ, así como la incorporación de eIF-4A y eIF-4B sobre el mensajero. De esta forma se producen múltiples reciclajes de eIF-4F y la asociación de varias moléculas de eIF-4A y eIF-4B en la región 5' terminal del ARNm, ocasionando el desdoblamiento de su estructura secundaria en esta zona para facilitar la posterior entrada de la subunidad ribosomal 40S.

En la Figura III se representa uno de los esquemas sobre la formación del complejo de preiniciación 48S durante la etapa de iniciación en la síntesis de proteínas, y que está de acuerdo con los resultados experimentales mencionados anteriormente. Después que ocurre el desdoblamiento de la estructura secundaria del ARNm en la región 5' terminal, tal como se describió en la Figura II, se produce su enlace a la subunidad ribosomal 43S por una interacción de las proteínas asociadas sobre el ARNm con dicha subunidad. Seguidamente, aunque no hay datos que así lo comprueben, los factores eIF-4A y eIF-4B pueden seguir asociados sobre la estructura

del ARNm o reciclar, y continuar funcionando como promotores del desdoblamiento

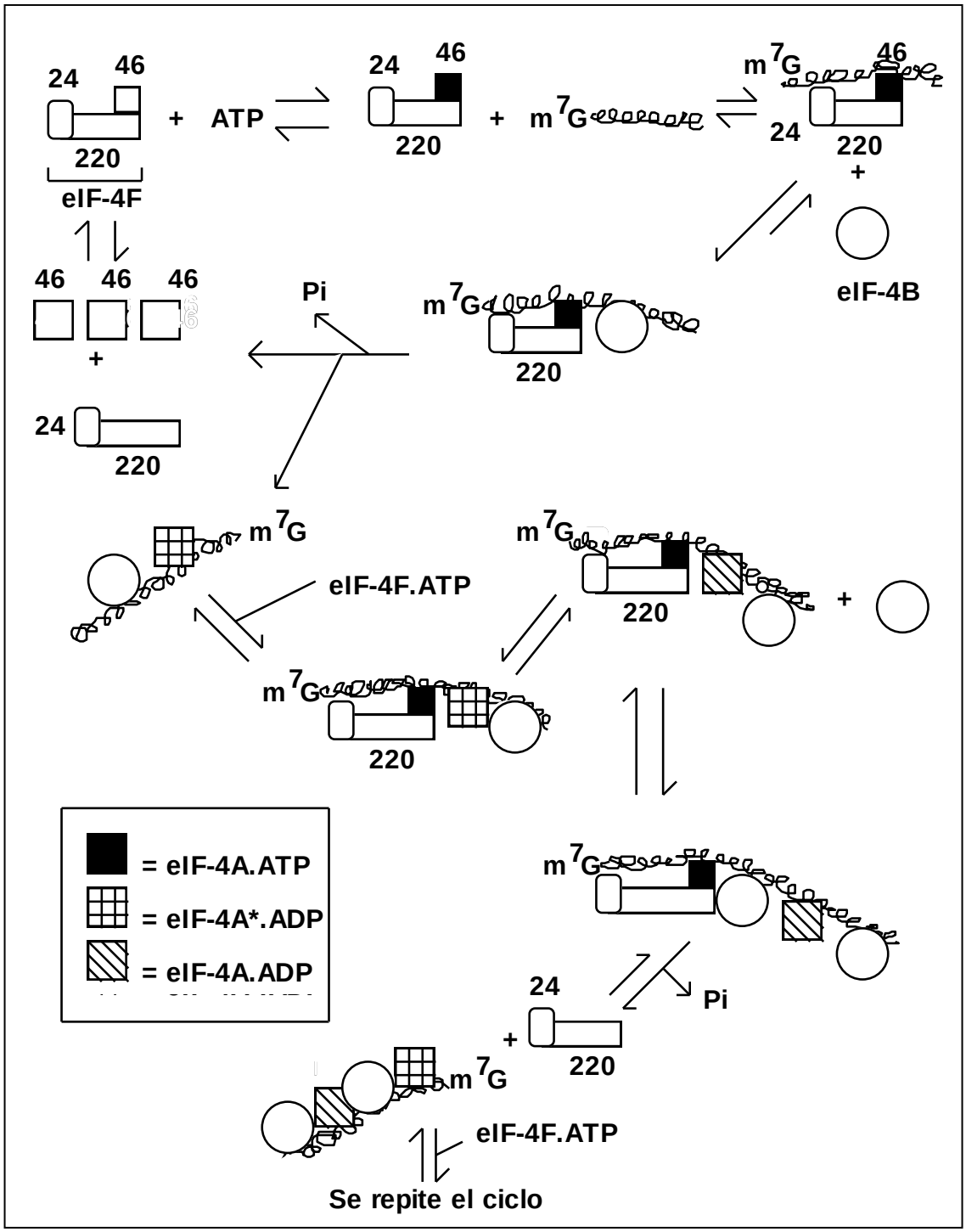


FIGURA II: DESDOBLAMIENTO DEL ARNm EN LA REGION 5' TERMINAL POR EL COMPLEJO eIF-4F

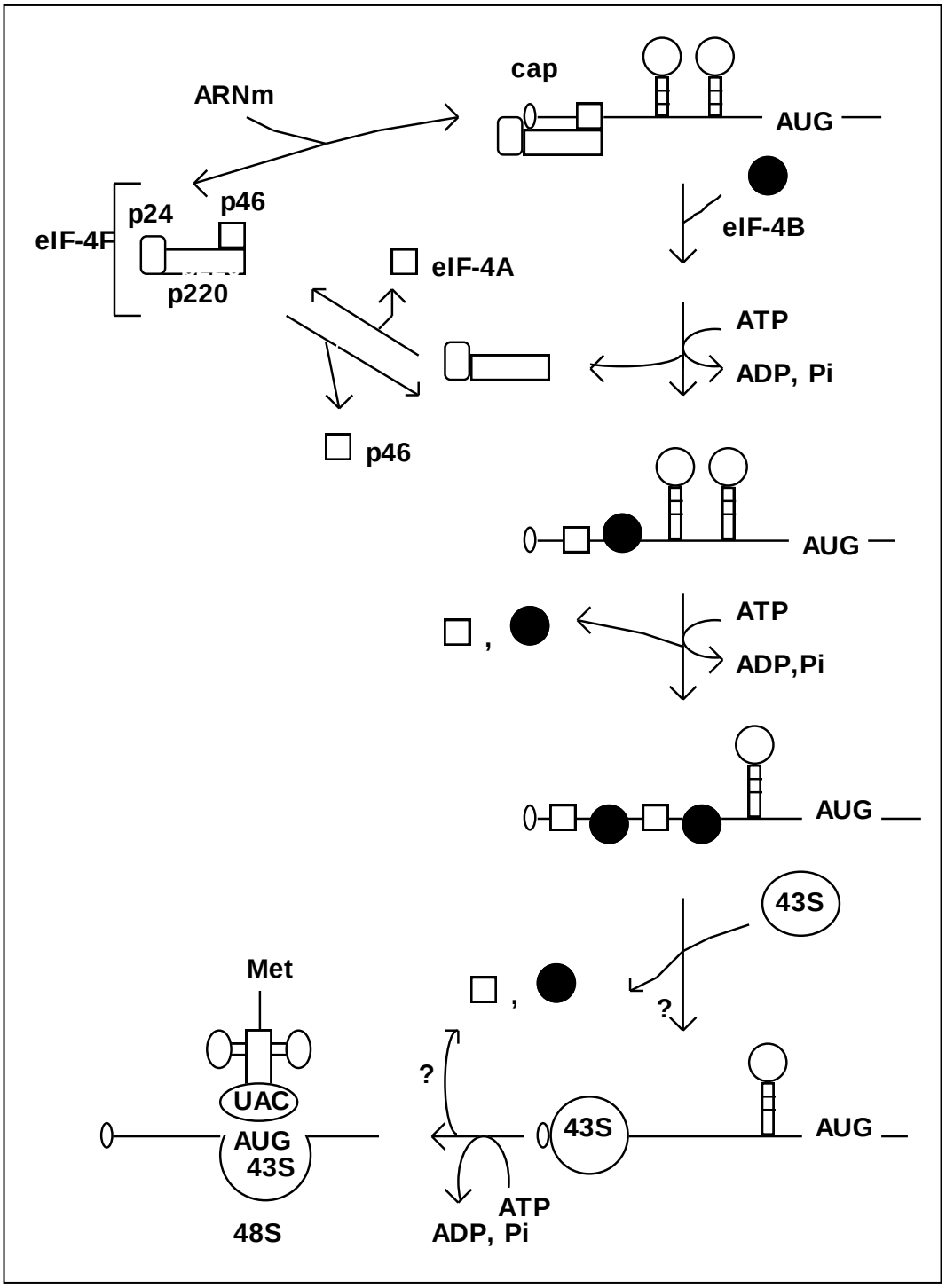


FIGURA III: MECANISMO DE FORMACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S

de la estructura secundaria cerca del codón de iniciación AUG, a su vez, la hidrólisis de ATP en este proceso, sería el motor para el movimiento de la subunidad 43S hasta dicho codón de iniciación, y de esta manera colocar al Met-ARNf iniciador en dicha posición por una interacción codón-anticodón.

Este modelo tiene algunas críticas ya que no explica la distribución subcelular encontrada de eIF-4E y eIF-4γ sobre el complejo de preiniciación 43S (Sonenberg y col., 1979). El modelo plantea la formación del complejo eIF-4F antes del enlace del ARNm al ribosoma, y por lo tanto debería existir la forma soluble de dicho complejo en las fracciones post-ribosomales. Sin embargo, el complejo siempre se ha encontrado en los lavados ribosomales con alta concentración salina (Joshi y col., 1994; Meerovitch y col., 1989).

Tomando en consideración los resultados experimentales sobre la distribución de eIF-4E y eIF-4γ sobre los complejos de iniciación (Sonenberg y col., 1979), y el cambio de afinidad de eIF-4E por la estructura del "cap" sobre el ARNm de acuerdo a su estado de fosforilación (Hiremath y col., 1989), se propuso otro mecanismo para la formación del complejo de preiniciación 48S que se esquematiza en la Figura IV. El factor eIF-4E interactua con el "cap" sobre el ARNm priori al enlace de cada componente al ribosoma. A su vez, el factor eIF-4γ está presente sobre el complejo de iniciación 43S y facilita un sitio de enlace para el complejo eIF-4E.ARNm. La forma fosforilada de eIF-4E tiene mayor afinidad por el ARNm que la no fosforilada, y este evento debe tener un efecto proporcional sobre la velocidad de la síntesis de proteínas representando probablemente el paso regulatorio en la iniciación. El modelo no representa la participación de eIF-4A y eIF-4B, pero plantea que el desdoblamiento del ARNm ocurre después que este se ha enlazado a la subunidad ribosomal 40S, debido al aumento de la actividad de helicasa de eIF-4A cuando están presentes ARNm, eIF-4B y eIF-4γ.

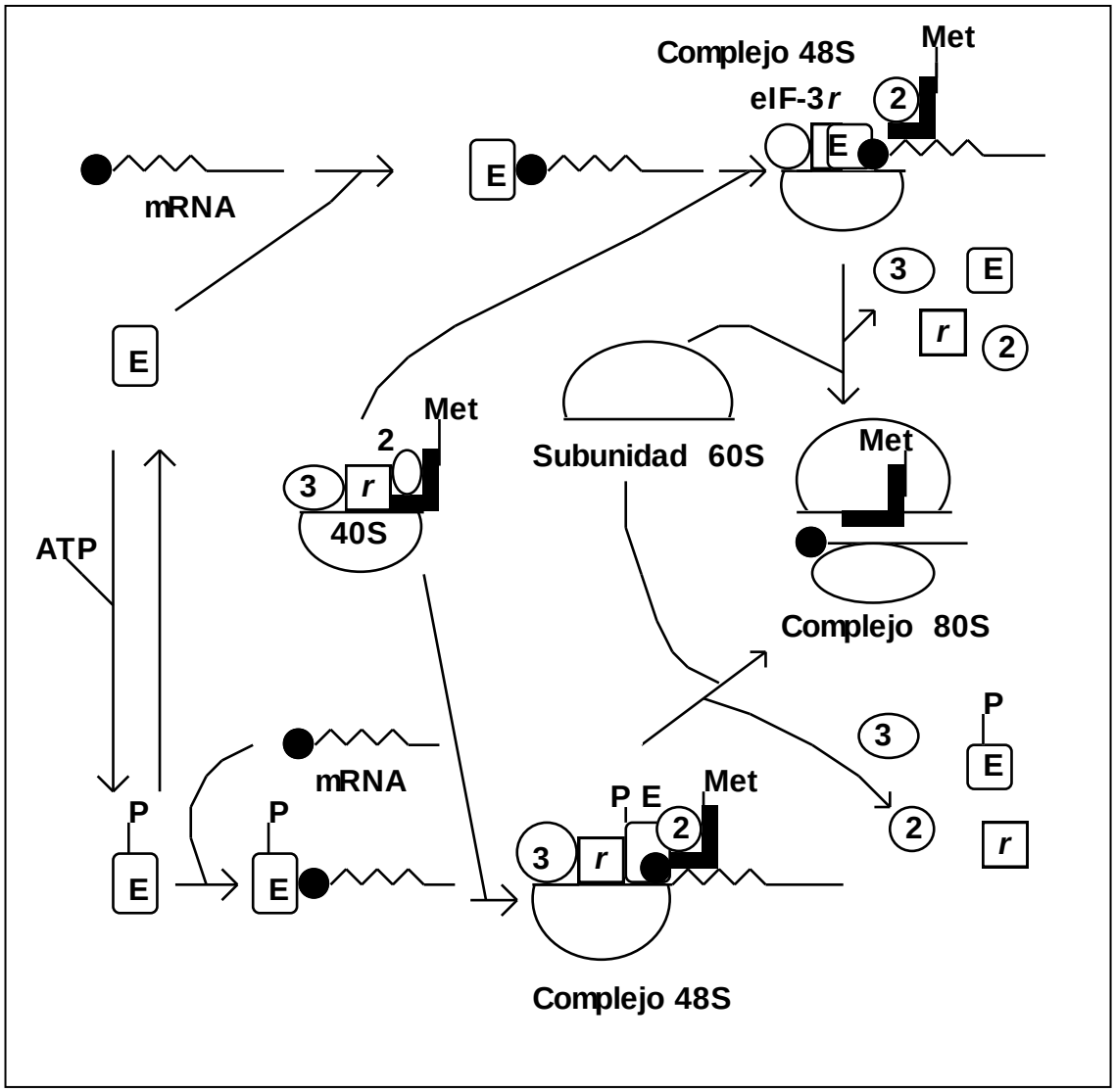


FIGURA IV: MODELO PARA LA FORMACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S

El concepto de una actividad de helicasa que se encuentra enlazada al ribosoma sugiere el simultáneo desdoblamiento de la estructura secundaria del ARNm, y el movimiento a través de la subunidad ribosomal para alcanzar el codón AUG con un contexto favorable (Kozak, 1989). Los polipéptidos eIF-4E y eIF-4γ permanecen asociados al complejo 48S acumulado en la presencia de GTP no hidrolizable (GMPPNP), y probablemente eIF-4F también permanece como un componente de este complejo hasta que se complete el movimiento de la subunidad ribosomal o "scanning" hasta el codón de iniciación. Una vez completado este proceso se produce la liberación de los factores, y la unión de la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S. El eIF-4F disociado puede tener dos posibilidades: el complejo puede permanecer asociado y ser empleado para un nuevo ciclo de iniciación o puede separarse dentro de los polipéptidos que lo constituyen. Los niveles de los componentes de eIF-4F, la distribución de eIF-4E fosforilado y no fosforilado en eIF-4F y el complejo 48S, y la localización experimental de eIF-4γ sugieren que la disociación del eIF-4F es muy probable, así como también la hipótesis de que el EIf-4E se recicla en la iniciación.

Este modelo también presenta inconvenientes debido a que experimentos sobre la localización de eIF-4E por inmunoensayos (Görlach y Hilse, 1986) y radiomarcaje (Hiremath y col., 1989) no han mostrado ninguna evidencia para la asociación de eIF-4E con el ARNm no polisomal en lisados de reticulocitos de conejo. Sin embargo, se especula que el complejo eIF-4E.ARNm es inestable a las fuerzas de centrifugación utilizadas en los procedimientos de extracción.

Se ha determinado también en algunos casos la participación de otros polipéptidos diferentes al grupo eIF-4 en la iniciación de la síntesis de proteínas. Utilizando un sistema de levadura y análisis genéticos, Gulyas y Donahue. demostraron que para traducir un ARNm con una estructura estable de lazo en la región 5' terminal no traducible, se requieren proteínas adicionales llamadas SSL1 y

SSL2 (Gulyas y Donahue, 1992). En sistemas libres de células cuando el ARNm carece de estructura secundaria en la región 5' no se requieren las dos proteínas para su traducción, de tal forma que no está claro si se necesitan para la traducción de múltiples ARNms, o solo para la traducción de ARNms con una estructura de lazo muy estable en la región 5' terminal.

También se ha determinado que una proteína de bajo peso molecular, probablemente eIF-1 o eIF-4C, estimulan la actividad de eIF-4A, eIF-4B y eIF-4F, pero no se conoce el mecanismo por el cual actuan.

En algunos casos existe otro tipo de mecanismo de unión del ARNm al ribosoma, llamado de iniciación interna. Este mecanismo es independiente del "cap" sobre el ARNm y de los factores del grupo eIF-4. No se conoce mucho de esta variante de unión del ARNm al ribosoma, pero se ha determinado la intervención de dos proteínas llamadas antígeno La y Proteína-polipirimidina. Estas proteínas de aparente origen nuclear se requieren para la traducción óptima de ARNms de poliovirus o virus EMC (Meerovitch y col., 1989).

En una publicación reciente se ha determinado que el factor 4F, específicamente la subunidad 4A y un dominio central de la subunidad 4G (γ), son suficientes para permitir una entrada interna en el virus de la encefalomiocarditis (Pestova y col., 1996).

1.1.1.4. Formación del complejo de iniciación 80S

En este paso el factor eIF-5 reacciona con el complejo 48S y cataliza la hidrólisis de GTP en el complejo ternario (eIF-2.GTP.Met-ARNf), produciendose la liberación de eIF-2.GDP y EIF-3 enlazados sobre la subunidad ribosomal 40S. Al mismo tiempo ocurre la separación de eIF-6 sobre la subunidad 60S. Con la

participación o estimulación del factor eIF-4D se produce el enlace de la subunidad 60S al complejo 48S para formar el complejo de iniciación 80S.

Cuando se realizan experimentos con análogos no hidrolizables de GTP se produce el enlace del Met-ARNf y ARNm a la subunidad 40S, pero se inhibe la liberación de los factores eIF-2 y eIF-3 y la posterior unión de la subunidad 60S (Safer y col., 1975). El resultado final en este proceso de iniciación de la síntesis de proteínas es la formación del complejo 80S funcional, que está listo para participar en las reacciones de elongación.

Dentro de este esquema general en la iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes, hay muchas incógnitas sobre el funcionamiento de algunos factores y la secuencia de reacciones. Por ejemplo no se conoce con exactitud si eIF-1, eIF-2A, eIF-4C y eIF-4D realmente son esenciales para la formación del complejo de iniciación 80S o solo aumentan su velocidad. Tampoco se tiene un conocimiento claro sobre los factores que permanecen asociados con los ribosomas después de la iniciación y como ocurre realmente el desdoblamiento del ARNm antes o después de su enlace al ribosoma.

1.1.2. ELONGACION EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE EUCARIOTES

En este paso de la síntesis de proteínas se plantean dos modelos: el modelo de los dos sitios (PA) que cada vez va teniendo menos vigencia, y el modelo de los tres sitios (EPA).

El modelo de los dos sitios se puede explicar de la siguiente forma: el complejo de iniciación 80S, formado por un ribosoma, Met-ARNtf y ARNm, tiene al Met-ARNtf iniciador enlazado al sitio ribosomal llamado "P" (donador), y su

anticodón está unido por apareamiento de bases con el codón iniciador AUG del ARNm. Durante la iniciación es seleccionado el codón AUG apropiado para ser traducido como metionina. El próximo codón del ARNm a ser traducido, que es el primer codón interno, está en una posición ribosomal abierta y adyacente al sitio "P", referido como sitio "A" (aceptor). El aminoacil-ARNt apropiado, que depende del codón disponible en el sitio "A", se enlaza en una reacción catalizada por un factor llamado EF-1, específico para elongación, que necesita GTP. Cuando los sitios "P" y "A" están llenos, se forma un enlace peptídico entre el residuo de metionina y el resto aminoacilo entrante, resultando un dipéptido unido a ARNt en el sitio A, mientras el sitio "P" queda con un ARNt deacilado que es retirado. El movimiento del próximo codón al sitio "A", necesita de un factor de translocación denominado EF-2 y GTP. Este factor cataliza el desplazamiento relativo del ribosoma y el ARNm. En este proceso, el peptidil-ARNt en el sitio "A"es translocado al sitio ribosomal "P" y un nuevo codón entra en el sitio "A". El ribosoma está listo entonces para comenzar de nuevo la serie de reacciones que envuelven el enlace del aminoacil-ARNt, formación del enlace peptídico y translocación. Este proceso se repite hasta descodificar todos los codones traducibles sobre el ARNm. El crecimiento de la cadena polipeptídica se lleva a cabo desde el residuo N-terminal en dirección al residuo C-terminal.

El modelo de los tres sitios describe un tercer sitio ribosomal denominado "E". Hay pruebas concretas en procariotes y levadura, aunque en eucariotes superiores no hay nada claro todavía (Triana y col., 1994; Nierhaus, 1990). Cuando ocurre la translocación, después de formarse el enlace peptídico, el ARNt deacilado en el sitio "P" pasa a un nuevo sitio denominado "E" (adyacente al sitio "P"), y el peptidil-ARNt en el sitio "A" pasa al sitio "P", entrando un nuevo codón al sitio "A". Cuando se enlaza el aminoacil-ARNt al sitio "A" ocurre la salida del ARNt deacilado del sitio "E", aparentemente por una cooperatividad alostérica negativa entre los dos sitios. El mecanismo por el cual el ARNt deacilado sale del sitio "E" ribosomal no está claro. Hay algunas evidencias como se mencionó anteriormente de un efecto alostérico entre

el sitio "E" y el sitio "A" , mediante el cual la salida del ARNt deacilado del sitio ribosomal "E" ocurre solamente cuando entra el aminoacil-ARNt correcto en el sitio "A" según el codón específicado sobre el ARNm. Esto garantiza un mecanismo de fidelidad en el traducción (Rheinberger, 1991).

En levadura existe un tercer factor de elongación llamado EF-3 (Dasmahapatra y Chakraburtty, 1981a). Los estudios con EF-3 purificado revelan que es un simple polipéptido con un peso molecular de 125 KDa. El factor tiene fuertes actividades de ATPasa y GTPasa, y un anticuerpo monoclonal contra este factor muestra que es esencial para la traducción de ARNm natural y es requerido en cada ciclo de elongación (Hutchison y col., 1984). Este factor aparentemente está involucrado en la salida del ARNt deacilado del sitio "E" y la entrada del aminoacil-ARNt al sitio "A" durante la elongación según estudios realizados recientemente (Uritani y Miyazaki, 1988; Triana y col., 1994, Triana y col., 1995; Graham y Mick, 1993).

1.1.2.1. Enlace del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma

El factor que interviene en el enlace del aminoacil-ARNt en la cadena de elongación es el EF-1. Este factor se ha aislado de distintas especies y su actividad se ha detectado en complejos de alto peso molecular, entre 500-1000 KDa. El mayor componente de EF-1 es un polipéptido de 50-60 KDa, el cual es referido como EF-1α o EF-1_L en eucariotes, y como EF-Tu en procariotes (Chakraburtty y Saha, 1986; Slobin y Moller, 1976; Seal y col., 1983). Otro componente designado como EF-1β o EF-Ts de 30 KDa, está asociado a EF-1α y juega un papel importante en la reacciones catalizadas por EF-1. Otro componente es EF-1γ (Mr= 47-55 KDa), encontrado en un complejo con EF-1β.

El enlace del aminoacil-ARNt a la partícula ribosomal durante la elongación de la cadena polipeptídica en eucariotes, requiere de la formación de un complejo ternario entre el aminoacil-ARNt, GTP y el factor de enlace EF-1. La subunidad que participa en el complejo ternario es EF-1α, formando primero un complejo binario con GTP (Slobin y Moller, 1976). El mecanismo de acción de EF-1α es similar al del factor de iniciación eIF-2 y al factor de elongación en procariotes referido como EF-Tu.

El complejo binario EF-1α.GTP reacciona con el aminoacil-ARNt para formar el complejo ternario, el cual dirige al aminoacil-ARNt hacia el ribosoma, luego el GTP se hidroliza, se forma EF-1α.GDP y el factor es retirado del ribosoma.

La función de EF-1β parece ser análoga a la del factor eIF-2B (GEF), intercambiador de nucleótidos de guanina en el eIF-2 durante la etapa de iniciación, y al factor procariote EF-Ts, sin embargo, existen dudas al respecto ya que la alta concentración de GTP en las células eucariotas no amerita tener un factor con dicha función. En todo caso, este factor EF-1β, probablemente cataliza el reciclaje de GDP/GTP sobre EF-1α. En este mecanismo EF-1β reaccionaría con EF-1α.GDP produciendo el desplazamiento de GDP y formando el complejo binario EF-1α.EF-1β ; el GTP remplazaría luego al EF-1β, resultando la formación del complejo binario EF-1α.GTP que podría reaccionar entonces con un aminoacil-ARNt.

Cuando se utilizan análogos de GTP no hidrolizables en lugar de GTP, puede ocurrir el enlace del aminoacil-ARNt al ribosoma, en un proceso catalizado por EF-1 α, pero el próximo paso de elongación, que es la formación del enlace peptídico, resulta bloqueado. Estos resultados indican que el enlace del aminoacil-ARNt al sitio "A" del ribosoma no necesita de la hidrólisis de GTP; pero debe ocurrir un paso intermedio que si necesita de la hidrólisis del nucleótido. Este paso intermedio se ha

relacionado con el alcance de la posición apropiada del aminoacil-ARNt en el sitio "A" para permitir la formación del enlace peptídico.

Los resultados obtenidos acerca de la posibilidad de la salida del EF-1α del ribosoma, cuando la reacción es llevada a cabo con análogos no hidrolizables de GTP, sugieren la alternativa de que el enlace peptídico no puede ocurrir hasta que el EF-1α es retirado del ribosoma por la hidrólisis de GTP.

1.1.2.2. Formación del enlace peptídico

Cuando el aminoacil-ARNt ha sido enlazado en la posición adecuada del ribosoma (sitio "A"), adyacente al peptidil-ARNt o al Met-ARNtf iniciador (en el caso del primer ciclo de elongación) en el sitio "P", ocurre una reacción sobre el ribosoma catalizada por la enzima peptidiltransferasa. Se produce la ruptura del enlace éster entre el residuo peptidil y el ARNt presente en el sitio "P" del ribosoma. El grupo amino del residuo aminoacil del ARNt ubicado en el sitio "A", reacciona con el grupo carboxilo del residuo peptidil formando el enlace peptídico. Esta reacción no requiere de algún factor soluble no ribosomal.

La formación del enlace peptídico usando subunidades 60S purificadas, indican que el centro activo de la peptidiltransferasa, se encuentra ubicado en esta subunidad, aunque en el ribosoma 80S la subunidad pequeña puede influir en la formación del centro catalítico.

1.1.2.3. Translocación y salida del ARNt deacilado

El resultado de la reacción de la peptidiltransferasa genera un ribosoma con el sitio "P" ocupado por un ARNt deacilado, y un peptidil-ARNt ocupando el sitio "A". Para que el nuevo codón sobre el ARNm pueda ser traducido, este debe ocupar la

posición "A", y permitir asi la entrada del próximo aminoacil-ARNt. conjuntamente con este movimiento del nuevo codón del ARNm, el peptidil-ARNt y el codón traducido deben trasladarse a la posición "P". Esta reacción de translocación involucra el movimiento del ribosoma y/o ARNm en relación uno a otro por un triplete sobre el ARNm en dirección 5' a 3'. La reacción es catalizada por EF-2 y GTP (Skogerson y Moldave,1968). Durante este proceso o después , el ARNt deacilado es retirado del sitio "P" en el modelo de los dos sitios, o del sitio "E" en el modelo de los tres sitios, el GTP es hidrolizado a GDP más Pi y al finalizar la translocación el EF-2 es separado del ribosoma. El factor EF-2 es un polipéptido con un peso molecular entre 100-110 KDa, y contiene un número de grupos sulfidrilos que son esenciales para su actividad`. El mecanismo de acción del factor envuelve la formación de dos complejos intermediarios. El primero es un complejo binario con GTP y el segundo es un complejo ternario conteniendo el factor, GTP y el ribosoma. Estos complejos pueden formarse con análogos no hidrolizables de GTP, indicando que su hidrólisis no es esencial para el enlace del EF-2 al ribosoma, sino que dicha reacción debe ocurrir en algún paso posterior. Una posibilidad sería que la hidrólisis de GTP es requerida solamente para la separación y reciclaje del EF-2, y la translocación puede llevarse a cabo con el EF-2 enlazado al ribosoma en ausencia de hidrólisis. Seguidamente a la translocación, el EF-2.GDP es retirado del ribosoma, reaccionando luego con GTP libre para regenerar el complejo activo EF-2.GTP. La otra posibilidad sería el uso de la energía de hidrólisis de GTP para que se lleve a cabo el proceso de translocación.

1.1.3. TERMINACION EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE EUCARIOTES

Cuando han sido traducidos todos los codones en el ARNm, la formación del último enlace peptídico resulta en un polipeptidil-ARNt enlazado al sitio ribosomal "A". La translocación con EF-2 y GTP llevan al polipeptidil-ARNt y su codón complementario en el ARNm al sitio "P", entrando un codón de terminación al sitio

"A", que puede ser UAA, UAG o UGA. En la presencia de GTP, un factor (RF) se enlaza al sitio "A"y cataliza la reacción de terminación, la cual envuelve la hidrólisis del enlace éster entre el polipeptidil y el ARNt, la hidrólisis de GTP y la separación del ribosoma de: la cadena completa del polipéptido, el ARNt deacilado y el ARNm.

Aunque en procariotes se han identificado tres factores de terminación, y hay especificidad respecto a los codones reconocidos por estos factores, solamente un factor ha sido investigado en los sistemas de eucariotes. El peso molecular del factor RF en reticulocitos es de 110 KDa, y está compuesto por dos subunidades idénticas de 55 KDa (Konecki y col., 1977). El enlace del RF al ribosoma requiere de GTP, pero este proceso no necesita de la hidrólisis del nucleótido, ya que la reacción de enlace puede ocurrir también con análogos de GTP no hidrolizables. Aparentemente la hidrólisis de GTP es requerida para la disociación del factor RF del ribosoma.

Anticuerpos que inhiben a la peptidiltransferasa igualmente inhiben la reacción de terminación, sugiriendo que la actividad que normalmente es responsable de la formación del enlace peptídico en la cadena de elongación, etá también participando de alguna forma en la reacción de terminación. Cuando los sitios "P" y "A" ribosomales están ocupados por el sustrato apropiado, es decir, el sitio "P" por el peptidil-ARNt y el sitio "A" por RF, la peptidiltransferasa, probablemente, cataliza la hidrólisis del enlace éster entre el polipeptidil y el ARNt resultando la separación del polipéptido del ARNt y el ribosoma.

1.2. COMPLEJOS FORMADOS POR ARNm Y PROTEINAS

Los ARNms de células eucariotas son monocistrónicos, es decir, cada cadena de polinucleótidos codifica para una proteína. Tienen un simple codón de iniciación, el AUG, y tres posibles codones de terminación, el UAA, UAG y UGA como se mencionó anteriormente. El producto primario de la traducción de estos mensajeros

es un simple polipéptido, el cual puede sufrir considerables procesos post-traduccionales.

Los ARNms celulares contienen regiones no traducibles en los extremos 5' y 3', aproximadamente de 140 a 150 nucleótidos. La traducción es iniciada en el primer AUG de la región 5' terminal, y en ambas regiones ocurren modificaciones post-transcripcionales como la adición de la estructura del "cap" en el extremo 5' y la secuencia de adeninas en la cola o extremo 3' terminal (cola de poli (A)). Después de esta serie de modificaciones el ARNm debe atravezar la membrana nuclear y viajar hasta el citoplasma para unirse a los ribosomas y sintetizar una determinada proteína.

Una vez conocido este mecanismo general en la década de 1960, se pensó que el ARNm se encontraba libre, es decir, no asociado a proteínas. Sin embargo, surgió el problema de comprender como el ARNm era protegido de la degradación por nucleasas en su trayectoria desde la cromatina hasta los polirribosomas, y sobre todo en células como los eritroblastos, ricas en estas enzimas. Al mismo tiempo, se determinó en células eucarioticas la existencia de distintas especies de ARNms con diferentes vidas medias, que llevaron a la conlusión sobre la existencia de algún tipo de mecanismo que le confería estabilidad a estos ARNms celulares. Por una analogía con las partículas ribosomales, que ya era conocido, estaban formadas por ácido ribonucleico y proteínas, se planteó la hipótesis sobre una posible asociación del ARNm con proteínas específicas formando complejos que fueron denominados RNPms. Las proteínas en los complejos a su vez fueron relacionadas con la estabilidad, transporte y regulación traduccional del ARNm. La interacción de estas proteínas con el ARNm se planteaba a nivel de las regiones no traducibles en ambos extremos y comunes en la mayoría de los mensajeros.

Entre 1960-1970 todas las líneas de trabajo estuvieron dirigídas a demostrar la existencia de los complejos RNPms en la célula. Los experimentos consistieron

basicamente en separar las fracciones nuclear y citoplasmática, y efectuar luego purificaciones a través de gradientes de CsCl y sacarosa. Los complejos RNPms aislados eran disociados por lavados con EDTA o alta concentración salina. Empleando estos procedimientos Spirin y col. demostraron por primera vez en 1966 la existencia de los complejos formados por ARNm y proteínas en células de eucariotes (Spirin y col., 1966). Se detectaron varios tipos de complejos en las diferentes fracciones subcelulares, y fueron clasificados en complejos heterogéneos nucleares (RNPmhns) localizados en el núcleo, y dos clases de complejos en el citoplasma, uno asociado a los ribosomas denominado RNPm polisomal, y que representa al ARNm activo en la traducción, y el otro se encuentra libre en el citoplasma, y es denominado RNPm libre citoplasmático o Informosoma, representando al ARNm inactivo en la traducción.

Las pruebas que demostraban la existencia de ARNm en los complejos RNPms no eran concluyentes ya que no habian sistemas traduccionales eficientes *in vitro*. En base a esto se realizaron una cantidad de trabajos, cuyos datos experimentales sugerian que los complejos RNPms no eran otra cosa que interacciones inespecíficas entre el ARNm y proteínas, causadas por los procedimientos de extracción (Girard y Baltimore, 1966). También se demostró en otras investigaciones las asociaciones inespecíficas de algunas de las proteínas presentes en los complejos RNPms, sin embargo, había otro grupo de proteínas que evidentemente eran específicas ya que resistian a los procedimientos de extracción desnaturalizantes con urea, EDTA, SDS-fenol y no eran desplazadas en ensayos de competencia con otros tipos de ARNs.

En 1970 Sporh y col. (Sporh y col., 1970) demostraron definitivamente que los complejos RNPms en las células de eucariotes eran una realidad biológica antes que simples interacciones al azahar. Ellos realizaron ensayos cinéticos *in vivo* sobre la incorporación del ARNm al citoplasma en células He La, utilizando actinomicina D

para inhibir la síntesis de ARNr y marcaje del ARNm con ^{3}H Uridina. Con estos experimentos se comprobó que el ARNm se acumula en el citoplasma como RNPm libre y que posteriormente se incorpora a los polisomas para ser traducido. Los complejos RNPms citoplasmáticos fueron también visualizados por microscopía electrónica. Estos resultados fueron apoyados en otro estudio cinético realizado en células L de ratón (Swatantra y col., 1979).

Entre 1970-1980 todos los trabajos estuvieron practicamente dirigidos a la identificación de las proteínas asociadas en los complejos RNPms en diferentes tipos de células, y ello con la finalidad de establecer si existian proteínas que permanecian asociadas en los tres tipos de complejos, o si algunas de ellas eran excluídas o incorporadas en un determinado momento durante la trayectoría del ARNm del núcleo al citoplasma. Se emplearon en los análisis técnicas de marcaje con ^{125} I y ^{35}S-metionina, fijación con luz ultravioleta, y purificación de los complejos RNPms por columnas de oligo (dT)-celulosa.

Los complejos que han sido objeto de mayor estudio son los citoplasmáticos ya que se encuentran relacionados directamente con la regulación traduccional. También se han analizado con especial interés las proteínas citoplasmáticas libres con afinidad por ARN.

1.2.1. Complejos RNPms libres citoplasmáticos o Informosomas

Este tipo de complejo representa al ARNm no asociado a los ribosomas, es decir, traduccionalmente inactivo. Se extrae de la fracción post-ribosomal y en algunos casos se purifica a través de gradientes de sacarosa entre 20-80S. Tiene una proporción del 20% en el ARNm total, y en algunas células el 30-40%. Como se mencionó anteriormente, se le ha señalado como el precursor del ARPm polisomal y asus proteínas asociadas, o algunas de ellas, como elementos reguladores de mensajes específicos a nivel post-transcripcional.

Los sistemas más utilizados para el estudio de este tipo de complejos han sido: células ascíticas de Ehrlich, reticulocitos de conejo, eritroblastos de pato y oocitos de ***Xenopus laevis***. Los polipéptidos obtenidos en los complejos dependen del tipo de célula y del procedimiento de extracción. Los resultados más interesantes se han obtenido en eritroblastos de pato y oocitos de ***Xenopus laevis***.

En eritroblastos de pato se extrajó una partícula RNPm de globina que sedimenta en 20S, y es inactiva en la traducción. Cuando se aplicó un procedimiento desnaturalizante sobre las proteínas, el ARNm fue activo en la síntesis de globina en sistemas *in vitro* de reticulocitos y germén de trigo (Civelli y col., 1980).

En el sistema donde se ha obtenido mayor información sobre los complejos RNPms libres citoplasmáticos es el de oocitos de ***Xenopus laevis***. Durante la oogénesis se sintetizan y acumulan ARNs poli $(A)^+$ llamados "conjunto de mensajeros maternales" y representan el 95% del ARN poli (A) total. Estos ARNms se caracterizan porque no son polisomales y se encuentran traduccionalmente inhibidos. La activación de los mensajeros ocurre en la etapa siguiente a la fertilización y es controlada por varios mecanismos incluyendo la disponibilidad de factores de iniciación y de cambios en la adenilación. La estructura primaria del conjunto de mensajeros no cambia y se ha pensado que ciertas proteínas enlazadas en los RNPms son inhibidoras de la traducción.

Aprovechando esta característica del oocito de ***Xenopus laevis***, se han introducido ARNms heterólogos dentro del oocito y se ha observado que estos son incapaces de traducirlos, además de la acumulación de los mensajeros como RNPms no traducibles (Richter y Smith, 1981). La explicación a tales resultados sería la presencia en el oocito de ciertas proteínas específicas capaces de regular el sitio de traducción de la mayoría o de algunos tipos de ARNms. Se detectaron a un grupo de proteínas que decrecen a medida que la oogénesis progresa y que son inhibidoras de

la traducción (Richter y Smith, 1984). Dentro de este grupo de proteínas hay dos principales con pesos moleculares de 54 y 60 KDa. Estos polipéptidos son quinasas y se autofosforilan. La proteína de 60 KDa está unida a la cola de poli (A) y controla su actividad por fosforilación. La forma fosforilada se enlaza fuertemente a ARNm e inhibe la traducción, y su desfosforilación está correlacionada con la incorporación del ARNm en los polisomas (Kick y col., 1987). La asociación se esta proteína parece ser específica para un determinado grupo de mensajeros. Las dos proteínas han sido secuenciadas y son idénticas a las proteínas de la "caja Y" de ***Xenopus laevis*** llamadas FRGY2 y FRGY1 (Murray y col., 1992; Tafuri, 1993). Las proteínas de la "caja Y" son proteínas altamente conservadas en eucariotes y procariotes, y tienen la particularidad de enlazarse tanto a secuencias de ARN como de ADN para controlar la actividad transcripcional de promotores (Wolffe, 1994; Sommerville, 1996).

La proteína de 60 KDa (FRGY2) se encuentra en la etapa temprana del oocito, y la proteína de 54 KDa (FRGY1) aumenta su concentración a medida que avanza la oogénesis. Se propone que los dos polipéptidos estimulan la transcripción por la activación de promotores específicos, pero cuando la concentración de ARNm es alta, FRGY1 y FRGY2, se unen a secuencias específicas de su estructura para dar lugar a ARNms inhibidos, produciendo al mismo tiempo, una inhibición de la transcripción por secuestro de FRGY2 y FRGY1.

1.2.2. Complejos RNPms polisomales

Se obtienen de la fracción polisomal y representan al ARNm activo en la traducción. Se extraen por tratamiento de los polisomas con puromicina, EDTA o altas concentraciones de sal, y se purifican en general a través de gradientes de sacarosa.

Las proteínas detectadas en estos complejos varian según el procedimiento de extracción, pero se han obtenido a dos polipéptidos que parecen comunes a todo tipo de células, y a la mayoría de los ARNms. Estas proteínas tienen un peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de 70-78 KDa y 50-60 Kda (Schochetman y Perry, 1972)

1.2.2.1. Proteína de 70-78 KDa en los RNPms polisomales

Esta proteína se encuentra asociada a la secuencia 3' terminal del ARNm (cola de poli (A)) y se le denomina poli (A)-binding-protein (PABP). Es la proteína más caracterizada en los RNPms de diferentes células. La cola de poli (A) en el ARNm es resistente a la degradación por las ribonucleasas A y T1. La incubación del ARNm con estas enzimas que dejan intacta la cola de poli (A), y posterior purificación por columnas de oligo (dT)-celulosa, permitió la identificación de este polipéptido asociado a la secuencia 3' terminal del ARNm (Cchwartz y Darnell, 1976).

Es una proteína muy conservada en todas las especies de eucariotes, y se encuentra a razón de una molécula de PABP por 25 restos de adeninas. La mínima logitud para el enlace de PABP es de doce nucleótidos.

Desde el descubrimiento de la cola de poli (A) sobre el ARNm hace más de 25 años (Edmonds y Caramela, 1969; Lim y Nanellakis, 1970), se han realizado numerosos experimentos para examinar su síntesis y función. El mecanismo de poliadenilación está bastante claro, no así su función. La cola de poli (A) se agrega en la región 3' terminal del ARNm transcripto en el núcleo, y con la intervención de un complejo multiproteico y la enzima polimerasa II (Moore y Sharp, 1984). La longitud de la cola alcanza un valor aproximado de 260 nucleótidos en humanos y 90 en ***Saccharomyces cerevisiae*** (Brawerman, 1981). Existen dos formas de PABP

codificadas por el mismo gen, una forma nuclear y otra citoplasmática (Sachs y col., 1986), y el complejo poli (A).PABP representa la forma funcional de la cola de poli (A) del ARNm en la célula.

La estructura primaria de PABP tiene cuatro dominios repetidos de 90 aminoácidos, y tanto la secuencia como la organización de estos dominios son muy conservados en diferentes especies (Merrill y col., 1987). Uno de estos dominios es el sitio de enlace para poli (A), y los otros dominios son utilizados para un mecanismo de intercambio entre diferentes colas. Análisis de las deleciones en el gen de PABP1 muestran que solo es necesaria una parte de un simple dominio para la viabilidad de la célula. Esto permitió la localización del sitio de enlace del ARN a una porción del polipéptido de 66 aminoácidos (Sachs y col., 1987).

A principios de 1980 se plantearon varias hipótesis para la función del complejo poli(A).PABP. Las dos hipóteis principales se referian a su participación en el transporte y estabilidad del ARNm. La hipótesis menos probable era considerar su intervención en la traducción.

La función del complejo poli (A).PABP en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma no está clara. Hay estudios con ARNms bacterianos que demuestran que son transportados en oocitos de ***Xenopus laevis*** solamente cuando están poliadenilados (Wickens y Stepheson, 1984). Sin embargo, este trabajo no excluye la posibilidad que el ARNm poli $(A)^-$ haya sido transportado y rápidamente degradado en el citoplasma. Hay otros estudios que establecen que el ARNm poli $(A)^-$ no es normalmente transportado fuera del núcleo, basandose que todo el ARNm que es transportado está poliadenilado, incluyendo el ARNm poli $(A)^-$ de las histonas sintetizado fuera de la fase S del ciclo celular. Por otra parte, el ARNm poli $(A)^-$ que es encontrado en el citoplasma se deriva del ARNm poli $(A)^+$ (Krowczynska y col., 1985). Sin embargo, en experimentos realizados con el reactivo 3'

deoxiadenosina, que es un inhibidor de la poliadenilación, llegaron a la conclusión que la cola de poli (A) no es requerida para el transporte *in vivo* del ARNm (Zeevi y col., 1982). Una vez que el ARNm ha sido transportado al citoplasma, la longitud de la cola nuclear disminuye, obteniendose una distribución que puede ser característica para cada tipo de ARNm. La velocidad de acortamiento de la cola de poli (A) puede ser más rápida que la velocidad de degradación del ARNm citoplasmático (Krowczynska y col., 1985), y cada mensajero contiene la información para este proceso (Brawerman, 1981).

La intervención del complejo poli (A).PABP en la estabilidad del ARNm también representa un área bastante conflictiva. En 1976 Nudel demostró que el incremento en la velocidad de degradación del ARNm de globina en oocitos de ***Xenopus laevis***, estaba relacionada con la eliminación de la cola de poli (A) (Nudel y col., 1976). Sin embargo, experimentos similares utilizando ARNm de interferon, no encontraron diferencias en su estabilidad después de la deanilación (Sehgal y col., 1978).

La degradación del mensajero ocurre después de la remoción de su cola según análisis realizados *in vivo*. La reacción de acortamiento de la cola para la posterior degradación, es diferente a la reacción de acortamiento que ocurre para el ARNm recién transportado del núcleo al citoplasma. Para dicha degradación está implicada una secuencia rica en adeninas y uracilo en la región 3' terminal no traducible, así como también, es necesario que el ARNm haya sido traducido (Wilson y Triesman, 1988; Mercer y Wake, 1985).

Se han hecho ensayos *in vitro* con los extractos polisomales, y se encontró que el poli(A) estabiliza al ARNm solamente cuando está presente PABP (Bernstein y col., 1989). Estas conclusiones predecian que una deficiencia de PABP *in vivo* llevaría a una inestabilidad del ARNm, y a un acortamiento en la longitud de su cola.

Sin embargo, la eliminación de PABP por inactivación del promotor o por mutaciones sensitivas a la temperatura en ***Saccharomyces cerevisiae*** provocan una inhibición en el acortamiento de la cola de poli (A) *in vivo* (Sachs y Davis, 1989). Recientemente se ha purificado una ribonucleasa (PAN) que tiene como sustrato al complejo poli (A).PABP. Las deleciones en el gen de esta nucleasa provocan una inhibición en la iniciación de la traducción y alteraciones en la longitud de la cola de poli (A) (Sachs y Deardorff, 1992). Aparentemente , PABP está implicada entonces en el mecanismo de acortamiento de la cola de poli (A) *in vivo*, y los resultados obtenidos *in vitro* deben ser una consecuencia de la protección que ofrece PABP a la degradación de la cola de poli (A) por nucleasas inespecíficas presentes en los sistemas acelulares.

La participación del complejo poli (A).PABP en la traducción, se ha demostrado con bastante claridad a partir de 1989 con experimentos realizados *in vivo*, sin embargo, el mecanismo por el cual poli (A).PABP actua a nivel de la iniciación de la síntesis de proteínas no se conoce todavía. Hay numerosos datos que demuestran que muchos ARNms poli $(A)^-$ son traducidos eficientemente *in vivo* y que la síntesis de proteínas *in vitro* puede ser independiente de la presencia de la cola de poli (A) sobre el ARNm, aunque se ha reportado más eficiencia traduccional cuando es añadida dicha secuencia de adeninas (Brawerman, 1981).

La primera prueba de que poli (A).PABP participa en la síntesis de proteínas se obtuvo 1983, cuando se demostró que la adición de poli $(A)^+$ sintético inhibia selectivamente la traducción del ARNm poli $(A)^+$ pero no la de ARNm poli $(A)^-$ en sistemas de reticulocitos. Más tarde Grossi y col encontraron que el efecto inhibitorio podía ser anulado cuando a los sistemas se les añadia un exceso de PABP (Grossi y col., 1988).

En levadura se han construído mutaciones en PAB1 (pab1-F363L) sensitivas a la temperatura, sustituyendo una leucina por una fenilalanina en un residuo del tercer dominio conservado de la proteína (F364L PAB) (Sachs y col., 1987), y no muestra cambios de enlace comparada con la proteína normal (F364 PAB). Estas mutaciones en PAB1, y la habilidad para tener al gen de PABP de la cepa silvestre bajo el control de un promotor heterólogo inducible, permitieron examinar *in vivo* las consecuencias de la eliminación de PABP en la célula. La deficiencia de PABP produce una inhibición en la iniciación de la síntesis de proteínas y en el acortamiento de la cola de poli (A). En el análisis de las mutantes se observó una disminución de polisomas y acumulación de monorribosomas inactivos. También se aislaron mutantes extragénicas sensitivas al frío que suprimen las deleciones sobre el gen de PAB1. El análisis de estas mutantes demostró alteraciones en la subunidad ribosomal 60S, especificamente en la proteína L46, y también en el gen que codifica para una helicasa envuelta en la maduración del ARNr 25S de esta subunidad (Sachs y col., 1989). Con estos resultados se sugirió que la cola de poli (A) en el ARNm podría estar relacionada por algún mecanismo con la subunidad 60S durante la iniciación de la síntesis de proteínas.

Jacobson y Munroe en 1990 (Jacobson y Monroe, 1990) utilizando la transcripción *in vitro*, construyeron un conjunto de ARNms de β-globina y del virus de la estomatitis vesicular con diferencias en la estructura del "cap" y la cola de poli (A). Los mensajeros que mostraron mayor actividad en su incorporación a los polisomas en un sistema de reticulocitos fueron los que poseían "cap" y cola de poli (A), los carentes de "cap" y poli (A) fueron los menos activos, y los que poseían cualquiera de las dos estructuras mostraron una actividad parecida. También encontraron que el poli (A) sintético estimulaba a los mensajeros que tenian estructura del "cap" pero eran poli $(A)^-$, lo que sugería que el poli (A) podía actuar en trans por interacción con la región 5'. A su vez, demostraron que la cola de poli (A)

intervenía en la formación del complejo de iniciación 80S pero no en el complejo de preiniciación 48S.

Con estos resultados se propone que el complejo poli (A).PABP participa en la formación del complejo de iniciación 80S por una interacción con la zona rica en adeninas presente en la región 5' terminal del ARNm. Los dos extremos 5' y 3' del ARNm deben mantenerse próximos con la participación de las proteínas asociadas en estas zonas. En el paso de iniciación de la síntesis de proteínas la subunidad 40S interactua con la región 5' terminal del ARNm, y la subunidad 60S con el complejo poli (A).PABP en la región 3' terminal, que a su vez tiene interacción con la región 5', de esta forma las dos subunidades se mantienen próximas para formar más rápido y con mayor eficiencia el complejo de iniciación 80S. Por lo tanto la región 3' terminal del ARNm es importante en el proceso de reiniciación de la síntesis de proteínas.

1.2.2.2. Proteína de 50-60 KDa en el RNPm polisomal

Los polipéptidos entre 50-60 KDa encontrados en los RNPms polisomales de diferentes células no han sido plenamente identificados, y tampoco se conoce si son proteínas conservadas entre las diferentes especies , y si son comunes a la mayoría de los mensajeros.

En la década de 1970 se comenzó a plantear que un polipéptido de 48 KDa presente en los RNPms de células He La favorecía su unión a la subunidad ribosomal 40S. Al mismo tiempo, este polipéptido no se encontraba en los RNPms libres, su incorporación a este tipo de complejos representaba la activación del ARNm para la traducción. Dicha incorporación podría estar relacionada con un proceso de fosforilación-desfosforilación del polipéptido (Liautard, 1977).

Minich y col. han reportado una proteína de 50 KDa (p50) asociada a los RNPms libres y polisomales de reticulocitos de conejo, que puede ser activadora o inhibidora de la traducción según la razón molar en que se encuentre. La actividad del polipéptido asociado al ARNm está controlada por otro(s) factor(s) presente(s) en los lavados ribosomales (Minich y col., 1989). El polipéptido sufre fosforilación y fue secuenciado, determinandose que pertenece a la familia de los factores transcripcionales de la caja "Y" (Evdokimova y col., 1995; Evdokimova y col., 1998). En un trabajo reciente se demostró que p50 , al igual que A_1 RNPhn, autoantígeno La y la proteína-polipirimidinas (PTB o RNPhn I), inhiben la traducción de ARNms sin "cap" cuya iniciación se realiza por una entrada interna del ribosoma. Los mensajeros con "cap" son igualmente inhibidos, si se obliga a una reacción vía interna por la eliminación de los factores eIF-4F, eIF-4E, eIF-4A y eIF-4B que interactuan con "cap" , y son los responsables para una entrada normal del ribosoma por la región 5' terminal de los mensajeros que tienen dicha estructura. Con estos resultados se propone que dichas proteínas favorecen la fidelidad de la iniciación, y previenen que el ribosoma se coloque por una entrada interna sobre el mensajero, en una posición que no corresponda al sitio correcto de iniciación (Y-Svitkin y col., 1996).

En un trabajo realizado en el laboratorio en 1988 (Herrera y col., 1988), nosotros detectamos a un polipéptido de un peso molecular alrededor de 50 KDa asociado al ARNm polisomal de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***. Este polipéptido está fuertemente unido al ARNm ya que permanece aún después de extracción en condiciones desnaturalizantes con fenol-cloroformo-SDS. Se determinó que es indispensable para la formación del complejo de preiniciación 48S, ya que su degradación con proteasas inhibe a dicho complejo.

Entre 1976-1978 se realizaron algunos trabajos en reticulocitos de conejo, que reportaban a una proteína de 49 KDa con alta afinidad por columnas de ARN-sefarosa, y que fue identificada como el factor de elongación EF-1α. Se llegó a

plantear para aquel momento que este polipéptido era el mismo que se encontraba en los RNPms y promovía su enlace al ribosoma. Sin embargo, no se estableció ninguna relación entre los diferentes trabajos (Liautard y col., 1976; Ovchinnikov y col., 1978a; Ovchinnikov y Spirin, 1978b).

En 1987 Greenberg y col. (Greenberg y Slobin, 1987) encontraron al factor de elongación EF-1α asociado a los RNPms polisomales y libres citoplasmáticos de reticulocitos de conejo por fijación con luz ultravioleta. Estos investigadores argumentaron una posible contaminación en los RNPms polisomales con dicho factor, pero no le encontraron explicación a su presencia en los RNPms no polisomales. También detectaron a un polipéptido de más de 60 KDa que tenía reacción cruzada con un anticuerpo dirigido contra el factor de elongación EF-1α. En un trabajo posterior (Slobin y Greenberg, 1988) estos investigadores secuenciaron al polipéptido de 60 KDa y determinaron que era la Sintetasa de Serina. Utilizando edeína en los medios de cultivo detectaron una acumulación de esta sintetasa en el complejo de preiniciación 48S, y concluyeron que posiblemente este polipéptido participaba en la iniciación de la síntesis de proteínas.

1.3. REGULACION TRADUCCIONAL DE MENSAJEROS ESPECIFICOS

En las células de eucariotes, a parte de ixistir un mecanismo de control traduccional por proteínas comunes a la mayoría de los mensajeros, existen una cantidad de ejemplos donde la regulación se lleva a cabo por mecanismos expeciales, y con la intervención de proteínas específicas asociadas a determinados tipos de mensajeros. Estos mecanismos de control pueden incluir secuencias en las regiones 3' y 5' no traducibles del ARNm que implican por sí mismas un determinante regulatorio, o la intervención de proteínas que interactuan con estas regiones, o ambos mecanismos a la vez..

Hay ejemplos de regulación a nivel de la región 5' terminal o 3' terminal no traducibles, y en todos los casos donde intervienen proteínas parecen actuar como inhibidoras de la iniciación en la síntesis de proteínas. Los únicos casos de activación de la traducción por interacción de proteínas con estas regiones es la iniciación interna de los ARNs de picornavirus, específicamente el enlace de determinadas proteínas con la región 5' no traducible (Kaminnski y col., 1994).

1.3.1. Control traduccional por interacción de proteínas en la región 5' terminal no traducible del ARNm

El primer ejemplo lo constituye el ARNm de ferritina, cuya traducción *in vivo* es estimulada por hemina o hierro, e inhibida por quelantes del metal (Klausner y col., 1993). En dicha regulación está involucrado un motivo en forma de lazo conocido como IRE en la región 5' no traducible.

Se han descubierto también a otros dos ARNms de mamíferos con la misma secuencia de IRE en la región 5' terminal no traducible. Uno de ellos es el mensajero de δ-aminolevulinato sintetasa, y el otro de la mitocondrial *cis*-acotinasa (Dandekar y col., 1992). La proteína específica que se enlaza en la región del IRE es conocida como IRF (factor regulatorio del hierro), tiene un peso de 100 KDa, y se ha determinado que es la proteína citoplasmática *cis*-aconitasa (Kennedy y col., 1992). El polipéptido IRF purificado de placenta, u obtenido por un método recombinante en bacterias tiene actividad de *cis*-aconitasa, y dicha actividad está relacionada inversamente a la actividad de enlace a la secuencia IRE. Cuando la concentración de hierro es alta se piensa que la proteína forma un complejo 4Fe-4S, y posee una actividad alta de aconitasa pero una baja afinidad de enlace a RNA. Cuando la

concentración de hierro es baja, el complejo pasa a 3Fe-4S, y esta forma de la proteína tiene baja actividad de aconitasa pero alta afinidad de enlace al ARN. Para que la regulación sea eficiente por este mecanismo, es necesario que la secuencia IRE se encuentre cerca de la estructura del "cap" en la región 5' terminal, a una distancia de 40 nucleótidos (Melefors y Hentze, 1993).

En ***Drosophila*** se encuentran siete proteínas homólogas en espermatocitos que son reguladas por una secuencia en la región 5' terminal no traducible de los mensajeros. La secuencia corresponde a doce nucleótidos localizados a 28 nucleótidos de la región del "cap" (Schafer y col., 1990). Las proteínas que se enlazan a estas secuencias fueron identificadas por fijación con luz ultravioleta, pero no hay pruebas directas sobre su función inhibitoria en la traducción de los mensajeros. La localización de los motivos regulatorios cerca del "cap" aparentemente son para evitar alguna interacción inicial y estable con la subunidad ribosomal 40S. Cuando los motivos regulatorios están localizados a cierta distancia del "cap" , la subunidad 40S con participación de los factores eIF-4 podrían desdoblar la estructura secundaria de lazo, y desplazar a las proteínas inhibidoras en esta posición llegando hasta el codón de iniciación AUG. Sin embargo, si la afinidad de enlace de las proteínas inhibidoras por el ARN es grande, la regulación del mensajero puede ocurrir aún con dicha secuencia colocada a cierta distancia del "cap". Un ejemplo de este tipo lo constituye el ARNm de PABP, el cual tiene una secuencia de adeninas en la región 5' terminal no traducible a una distancia no cercana al "cap". El polipéptido que tiene una alta afinidad por adeninas, y que se encuentra enlazado en la cola de poli (A) en la región 3' terminal de la mayoría de los mensajeros eucariotes, se enlaza a la secuencia de adeninas en la región 5' terminal de su propio mensajero para inhibir su traducción (Grange y col., 1987).

Otro ejemplo de autorregulación es el ARNm de timidilata sintetasa. La enzima se enlaza en un segmento de 35 nucleótidos alrededor del codón de iniciación

AUG, con un sitio de enlace en la región codificante, y a 94 nucleótidos de la región del "cap". La secuencia regulatoria está distante del "cap" y también la afinidad de enlace de la enzima es baja, así como su tamaño, por lo que se podría pensar que la regulación no es efectiva. Sin embargo, la región 5' terminal no traducible tiene un alto contenido de G y C que le confieren una elevada estructura secundaria, y esto podría explicar la excepción de la regla sobre la posición de la secuencia regulatoria cerca del "cap" (Chu y col., 1993b).

Igualmente, la proteína dihidrofolato reductasa inhibe la traducción de su propio ARNm *ïn vitro* por interacción con una secuencia específica situada a 37 nucleótidos del "cap" (Chu y col., 1993a).

La traducción de los ARNms de las proteínas ribosomales en vertebrados es también controlada por secuencias en la región 5' terminal no traducible. Todos los mensajeros tienen una C después del "cap" seguida por una carrera de 7-13 residuos de pirimidinas. Estas secuencias son también encontradas en otros ARNms incluyendo el factor de elongación EF-1α (Loreni y col., 1993). La regulación no se lleva a cabo si los residuos de pirimidinas se colocan en la mitad de la región 5' no traducible. Hay dos tendencias para explicar el mecanismo de regulación de las proteínas ribosomales. Una de ellas postula la existencia de un factor inhibitorio que se enlaza a la secuencias de pirimidinas. La otra teoría plantea que la traducción de las proteínas ribosomales es regulada por la concentración del factor eIF-4F o eIF-3, de acuerdo a los resultados obtenidos en reticulocitos (Hammond y col., 1991).

1.3.2. Regulación traduccional por secuencias específicas en la región 3' terminal no traducible del ARNm independientes de cambios en la poliadenilación

Un ejemplo de tal regulación es el ARNm que codifica para la proteína 15-lipoxigenasa de eritrocitos (LOX), cuya función principal es la degradación de

mitocondrias en la maduración de reticulocitos a eritrocitos. El mensajero se acumula como no traducible justo hasta la etapa de maduración. La regulación se encuentra a nivel de la región 3' terminal no traducible, y es responsable una secuencia consenso que se repite de $C_4RGC_3UCUUC_4AAG$. Por fijación con luz ultravioleta, se determinó en reticulocitos que una proteína de 48 KDa se enlaza a estas secuencias e inhibe la producción de LOX (Ostareck-Lederer y col., 1994).

Igual regulación traduccional ocurre durante la espermatogénesis en ratón. Se ha encontrado un motivo de 62 nucleótidos en el extremo 3' terminal no traducible del ARNm para la protamina-1 que está implicado en el mecanismo. Por fijación con luz ultravioleta se ha detectado a una proteína de 18 KDa que interactua con esta secuencia, y dicho polipéptido agregado en lisados de reticulocitos inhibe la traducción de ARNms, que contienen las secuencias regulatorias equivalentes a los ARNms de protaminas en la región 3' terminal (Kwon y Hecht, 1993).

En oocitos de ***Xenopus laevis*** también hay regulación a nivel de la región 3' terminal de los ARNms "maternales". Los mensajeros para la ribonucleotida-reductasa (RR) y ciclina A y B, pueden activarse para la traducción *in vitro* al agregar en los ensayos una secuencia antisentido de la región 3' terminal no traducible de estos mensajeros. Se ha identificado a un polipéptido de 82 KDa que interactua con el segmento regulatorio y que controla su actividad por fosforilación (Standart, 1992).

Hay varios modelos para explicar la regulación por la intervención de la región 3' terminal no traducible. Uno de ellos postula que el enlace de una proteína específica en la región 3' terminal no traducible, bloquea también a la estructura del "cap", por una interacción de dicha proteína con ambas regiones, 3' y 5' terminales del ARNm.

Otro modelo es similar al anterior pero la interacción entre la estructura del "cap" y la región 3' terminal se lleva a cabo a través de proteínas diferentes situadas en ambas regiones.

La tercera alternativa postula que el enlace de proteínas específicas en la región 3' terminal no traducible, actuan como una señal de nucleación para el enlace de otras proteínas sobre el ARNm que lo llevan a formar partículas RNPms inhibidas traduccionalmente. Las proteínas con mayor posibilidad para formar estas estructuras serían las llamadas de la caja "Y" , identificadas como mayores componentes en los RNPms de oocitos de ***Xenopus laevis***. Con este modelo debe ocurrir alguna modificación en la proteína específica enlazada en la región 3' terminal (fosforilación/desfosforilación), la cual cambia su afinidad por el ARNm, y provoca su disociación y la ruptura del complejo RNPm haciendolo disponible para la traducción.

1.3.3. Regulación en la traducción por cambios en la poliadenilación del ARNm

Cada caso de activación en la traducción de ARNms maternales viene acoplado *in vivo* con la poliadenilación. El alargamiento de la cola de poli (A) requiere dos tipos de motivos en la región 3' terminal no traducible: la señal de poliadenilación nuclear AAUAAA, y un motivo rico en uracilo conocido como ECP (elemento citoplasmático de poliadenilación) o ECA (elemento de control de adenilación).

Cuando se inyectan en el oocito de ***Xenopus laevis*** transcriptos primarios con la región 3' terminal bloqueada con un residuo de cordecipin (3'-deoxiadenosina) que inhibe la poliadenilación, estos mensajeros no son activos en la traducción durante la etapa de maduración (McGrew y col., 1989). En caso contrario,es decir, la inyección

de transcriptos poliadenilados resulta en una traducción prematura en el oocito (Vassalli y col., 1989).

Por otro lado, también se ha observado que la inyección de transcriptos poliadenilados *in vitro,* no resulta en una traducción prematura en el embrión, en su lugar ocurre la activación de la traducción en el tiempo esperado y acoplada a un alargamiento extensivo de la cola de poli (A) (Simon y col., 1992). Es dificil establecer hasta los momentos cual proceso es el responsable para la activacción de la traducción, si el largo de la cola o el mecanismo de adicción de adeninas. Se debe considerar que durante el alargamiento de la cola de poli (A) varias proteínas se encuentran enlazadas en la región 3' terminal no traducible, incluyendo a la enzima poli (A)-polimerasa, y es posible que este proceso sea una señal para la activación de la traducción. Un ejemplo lo constituye los resultados encontrados en levadura, donde no es la cola por sí misma, sino el complejo poli (A).PABP el que influye en la traducción. En este sentido, es significativo que en oocitos de ***Xenopus laevis*** hay un bajo nivel de PABP (Zelus y col., 1989).

Por lo demás, se está planteando un sinergismo positivo entre la cola de poli (A) y la región 5' del "cap" , de acuerdo a los experimentos de transferencia de ARN usando cistrones reporteros estandar en una variedad de células (Gallie, 1991).

Hay dos mecanismo posibles sobre la interacción de proteínas específicas con la región 3' terminal no traducible, y el control de la poliadenilación y/o la iniciación de la traducción:

a) Las proteínas pueden actuar como inhibidoras cuando se enlazan a la región 3' terminal del ARNm, bloqueando la iniciación de la traducción o la poliadenilación por interacción con los motivos CPE y/o AAUAAA. Una posible modificación de las

proteínas por una vía de fosforilación/desfosforilación, puede disminuir su afinidad por el ARNm y activar la traducción, y/o la poliadenilación, o ambas.

b) El enlace de las proteínas a la región 3' terminal no traducible en un determinado estado de fosforilación promueven la activación de la traducción, y/o la poliadenilación, o ambos. Hay algunos ejemplos de proteínas que se enlazan a estas secuencias del ARNm no traducibles, como es el caso de un polipéptido de 58 KDa en oocitos de ***Xenopus laevis***, el cual se fija a la región CPE del ARNm de B4, y una proteína de 85 KDa en oocitos de ratón que se fija a la secuencia ACE del ARNm de tPA. La secuencia de ADNc para el polipéptido de 58 KDa muestra que contiene un motivo de enlace para ARN, y una secuencia consenso cdc^2 de fosforilación para quinasas (Paris y col., 1991; Kackson, 1993).

1.3.4. Regulación traduccional por ARNs pequeños

Un ejemplo lo constituye el desarrollo de ***C-elegans*** que requiere la actividad del gen *lin*-14 en un período determinado y su posterior inhibición. La regulación se lleva a cabo por la expresión del gen *lin*-4, el cual no codifica para una proteína sino para dos ARNs cortos, con una secuencia común en la región 5', una de 61 nucleótidos y otra más abundante de 22 nucleótidos, la cual es parcialmente complementaria a siete motivos repetidos con la parte 3' terminal no traducible de *lin*-14. El apareamiento de bases provoca la inhibición de la expresión de *lin*-14. No se conoce si el mecanismo de inhibición es por la inhibición del transporte del ARNm, o de la traducción, o por cambios en la poliadenilación (Evans y col., 1992).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El control traduccional y la oncogénesis son dos tópicos que han venido relacionandose en los últimos años. La idea de que ambos están interconectados ha surgido por experimentos en los cuales se ha demostrado que modulando la actividad de factores de iniciación en la síntesis de proteínas se pueden obtener fenotipos oncogénicos. Por esta razón es importante comprender los mecanismos de control en la velocidad de la síntesis de proteínas en la célula, incluyendo para ello: la actividad de los factores proteicos que participan en el proceso, la actividad de los complejos formados por dichos factores, y el orden de formación de los diferentes intermediarios constituídos por ribosomas, ARNm, ARNt y los factores proteicos.

La existencia de los complejos RNPms en eucariotes superiores indica un mecanismo de control traduccional expecializado, y específico para muchos ARNms celulares. Las proteínas que se encuentran asociadas a estos complejos juegan un

papel muy importante en dicha regulación, y su caracterización, asi como el estudio de sus funciones a resultado bastante complicado.

La mayoría de los análisis sobre las proteínas con gran afinidad por ARNm se han realizado en eucariotes superiores, encontrandose muy poca información acerca de la estructura y función de los complejos RNPms en eucariotes inferiores como las levaduras. El conocimiento sobre la función de dichos complejos en estos microorganismos proporcionaría un modelo muy útil para el posterior estudio en eucariotes superiores, como es el caso del sistema de placenta humana que se está desarrollando actualmente en el laboratorio.

Nosotros hemos venido trabajando hace algún tiempo con los complejos RNPms de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, y se han detectado a tres polipéptidos principales con pesos moleculares alrededor de 50, 60 y 72 KDa asociados al ARNm polisomal (Herrera y col., 1988). Los polipéptidos mencionados son importantes en la formación de los complejos de iniciación de la síntesis de proteínas, ya que su degradación con proteasas inhibe la formación de dichos complejos. En este trabajo se pretende caracterizar y analizar las funciones de las proteínas detectadas en el ARNm de la levadura, y su posible relación con algunos de los factores traduccionales ya descritos. Para ello, se utiliza un sistema acelular que sintetiza proteínas *in vitro* dependiente de ARNm exógeno, y en el cual se pueden obtener los diferentes complejos intermediarios en la síntesis de proteínas. El sistema acelular proviene de una mutante de ***Saccharomyces cerevisiae*** resistente al antibiótico edeína (Herrera y col., 1986; Herrera y col., 1984a; Herrera y col., 1984b). Los ribosomas de esta mutante tienen una alta afinidad por el ARNm, y dicha característica la convierte en un modelo muy útil para el estudio sobre la interacción de los complejos RNPms con el ribosoma.

OBJETIVOS

3.0. OBJETIVOS

GENERALES

b) Caracterización de las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ polisomal de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***.

b) Determinar la posible función de las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ de la levadura en la síntesis de proteínas.

ESPECÍFICOS

a) Caracterización de las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ polisomal de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por marcaje con ^{125} I y purificación a través de columnas de oligo (Dt)-celulosa.

b) Establecer la posible relación entre las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ con factores traduccionales ya descritos por inmunoreacciones y mapas peptídicos.

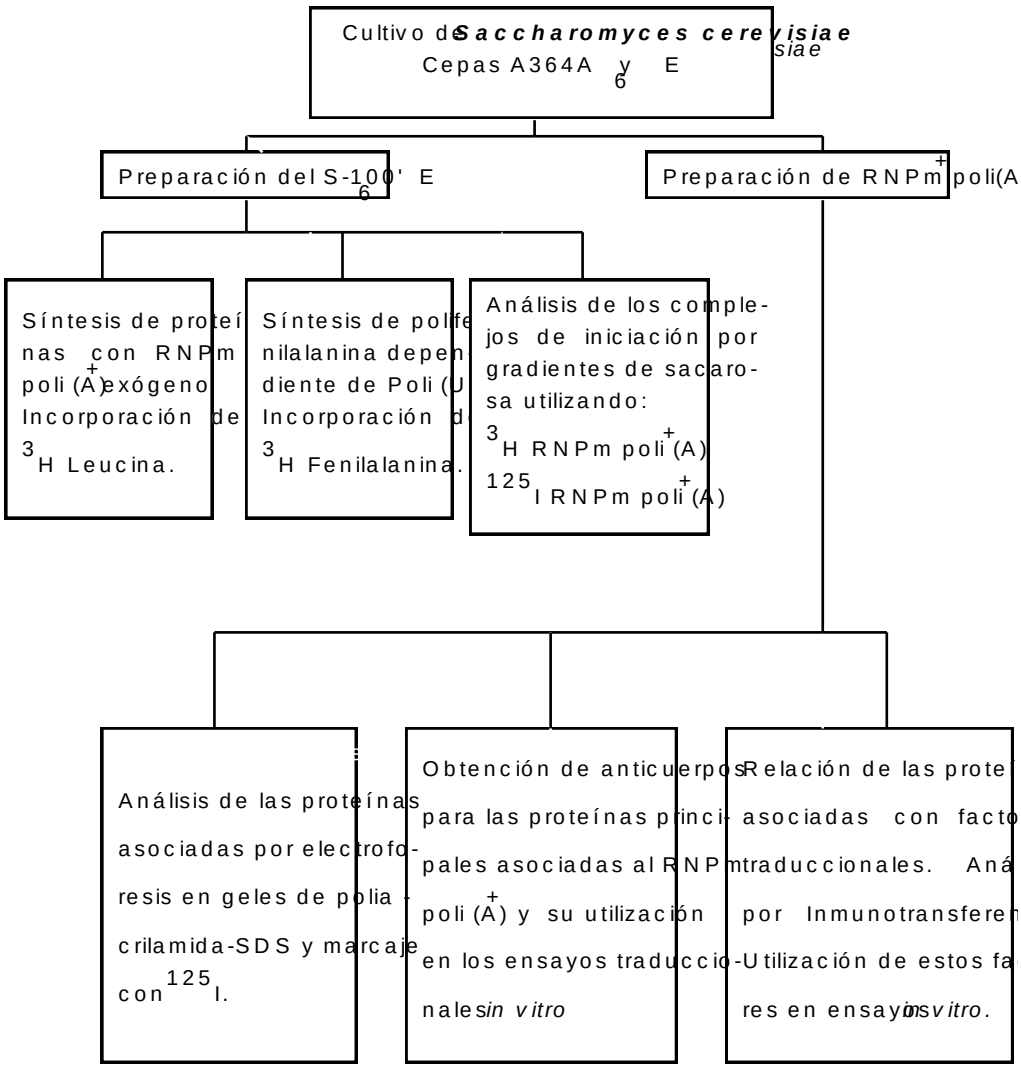
c) Determinar la posible participación de los polipéptidos asociados al RNPm poli (A)+ en la síntesis de proteínas, utilizando anticuerpos contra estas proteínas en ensayos *in vitro* con mensajero natural y sintético.

d) Determinar la posible función de los polipéptidos asociados al RNPm poli $(A)^+$ en la iniciación de la síntesis de proteínas, por análisis a través de gradiente sacarosa de los complejos de preiniciación 48S y de iniciación 80S.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.0. MATERIALES Y METODOS

4.1. ESQUEMA METODOLOGICO



4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. Cultivo de Saccharomyces cerevisiae

Para la realización del trabajo se utilizaron la cepas de ***Saccharomyces cerevisiae*** (levadura) designadas A364A (cepa silvestre) y E_6 (una mutante a la edeína aislada por McLaughlin y col., Dpto. de Biología Molecular de la Universidad de California en Irvine, U.S.A.).

Las levaduras de las cepas silvestre y mutante, se crecieron aeróbicamente a 24 °C en medio líquido YM-1 y en un baño de incubación con agitación marca New Pruns-Wick, utilizando una velocidad de 230 rpm por 18 a 20 horas hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.8-1.0 unidades a 660 nm (fase logarítmica de crecimiento) (Hartwell, 1976).

Inicialmente las células sembradas en placa o congeladas a -70 °C (inóculo original), se precrecieron en YM-1 y se siguió su crecimiento hasta alcanzar fase estacionaria. Posteriormente, a partir de este cultivo se procedió a sembrar a razón de 3 ml de inóculo por litro de YM-1 y se siguió su crecimiento hasta 0.8 unidades de DO a 660 nm. Las células fueron recogidas por centrifugación del medio de cultivo a 3000xg por 5 min. a 4 °C en una centrifuga Beckman modelo J2-21 utilizando un rotor JA-10.

Estas células fueron utilizadas para la preparación del extracto de levadura S-100', capaz de sintetizar proteínas *in vitro* y la obtención de los complejos RNPms polisomales.

El medio líquido YM-1 contiene por litro: 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de ácido succínico, 5 g de peptona, 3 g de hidróxido de sodio, 0.01 g de adenina, 0.01 g de uracilo, 10 g de glucosa y 3.5 g de bases nitrogenadas con aminoácidos.

4.2.2. Preparación del extracto de levadura libre de polisomas s-100'.

El extracto S-100' fue preparado siguiendo el método de Gasior y col. (Gasior y col., 1979). Las células se lavaron con agua estéril dos veces y seguidamente fueron resuspendidas en sorbitol 1.0 M a razón de 50 ml de sorbitol 1M/l de cultivo original, después se agregaron 0.4 ml de la enzima glusulasa (β-glucoronidasa, Sigma) por litro de cultivo original. La suspensión fue incubada 1 hora a 25 °C.

Los esferoplastos resultantes fueron recolectados por centrifugación (3000xg por 10 min.) lavandose simultáneamente por un gradiente formado con sorbitol 1.2 M a razón de 40 ml de sorbitol 1.2 M por litro de cultivo original. Seguidamente los esferoplastos fueron resuspendidos e incubados durante 90 min. a 25 °C en medio líquido YM-5 (1 l contiene: 1.0 g de extracto de levadura, 2.0 g de peptona, 10 g de ácido succínico, 6.0 g de bases nitrogenadas con aminoácidos, 0.01 g de adenina, 0.01 g de uracilo y 0.4 M de $MgSO_4$ para estabilización osmótica), utilizando 120 ml de YM-5 por litro de cultivo original. Luego los esferoplastos fueron recuperados por centrifugación a 3000xg durante 15 min. y resuspendidos en 0.5 ml de buffer A por l de cultivo original (Hepes-KOH 20 mM pH 7.4, acetato de potasio 0.1 M, acetato de magnesio 2 mM y Ditiotreitol 2 mM). La suspensión de esferoplastos se homogenizó en un homogenizador Dounce utilizando de 15 a 20 golpes.

El lisado fue centrifugado en un rotor JA-20 a 27000 g durante 15 min. a 4 °C y el sobrenadante (S-30) se centrifugó en un rotor 50Ti a 100000 g durante 30 min. a 4 °C en una ultracentrifuga Beckman modelo L8-70 (Beckman Instruments).

El sobrenadante libre de polisomas, el cual representa una preparación modificada del S-100 fue filtrado por una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada con buffer B (la composición es similar al buffer A, excepto por contener 20 % v/v de glicerol). Para calcular el tamaño de la columna fue mantenida la siguiente relación: V de muestra/V total = 6 %.

Luego se colectaron fracciones de 0.3 ml y se les determinó su densidad óptica (DO) a 260 nm en un espectrofotómetro Gilford modelo 250. Las fracciones con máxima absorción a esta longitud de onda fueron colectadas y congeladas a - 70 °C. Generalmente en todas las preparaciones partiendo de 6 l de cultivo original, se obtuvieron aproximadamente de 1.5 a 2 ml de S-100' con 25-35 DO/ml a 260 nm.

4.2.3. Preparación del RNPm total polisomal de levadura

Para la extracción del RNPm total polisomal, se utilizaron los polisomas sedimentados del lisado de levadura a 100000 g durante 30 min. (parte 4.2.2.), siguiendo el método de Gallis y col. (Gallis y col., 1975).

Los polisomas se resuspendieron en un buffer conteniendo: Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA, LiCl 0.1 M a una concentración final de 50 A260/ml. Seguidamente fue añadido SDS hasta 0.1 % y un volumen equivalente de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 50:50:1. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 40 min. Después de este procedimiento se extrajo la fase acuosa por centrifugación a 10000 r.p.m. durante 10 min. en un rotor JA-20.

Se realizó una segunda extracción de la fase acuosa con un volumen equivalente de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 50:50:1 utilizando el procedimiento anterior. Luego de la separación de la fase acuosa por centrifugación, fue añadido acetato de sodio a una concentración final de 0.2 M ajustando el pH a 5.2

y dos volumenes de etanol al 95 % a -20 °C. Se dejó precipitar durante 24 horas y el precipitado fue secado por corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Luego se lavó dos veces con estanol al 70 % y fue resuspendido en agua hasta una densidad óptica de 150-170 DO/ml a 260 nm y congelado en alícuotas a -70 °C.

4.2.4. Marcaje del RNPm total polisomal con ^{3}H Uracilo

El RNPm total polisomal fue extraído de la fracción polisomal según el procedimiento descrito en la parte 4.2.3. utilizando 6 l de cultivo original.

La marcación con ^{3}H Uracilo (Krystosek y col., 1975) se efectuó agregando el isótopo (36.6 Ci/mmol) en la condición de 1 mCi/ g de células y 20 g de células/l de medio mínimo de recuperación de los esferoplastos YM-5 preparado de la siguiente forma: 1.2 g de ácido succínico, 0.8 g de bases nitrogenadas con aminoácidos, 0.72 g NaOH, 0.0012 g de adenina, 0.4 M de sulfato de magnesio, 1.2 g de glucosa, 0.0012 g de triptófano, 0.0024 g de metionina e histidina en un volumen final de 120 ml.

La incubación de los esferoplastos con ^{3}H Uracilo en el YM-5 se llevó a cabo durante 90 min. a 25 °C y luego se siguió el procedimiento normal de extracción descrito en la parte 4.2.3.. Se obtuvo el RNPm total polisomal ($1.1.10^{6}$ c.p.m./A_{260}) y el RNPm poli $(A)^{+}$ por purificación a través de columnas de oligo (dT) -celulosa (4.2.6.) ($4.64 .10^{5}$c.p.m./A_{260}).

4.2.5. Marcaje de las proteínas asociadas al RNPm polisomal con ^{125}I

El RNPm extraído de 6 l de cultivo original (4.2.3.) fue resuspendido en un ml de un buffer de fosfato de sodio pH 7.6 hasta aproximadamente 70 DO/A_{260} (Fraker

y col., 1978). Luego se colocó en un tubo de vidrio (10 mm de altura x 12 mm de diámetro) impregnado con 200 μl de Iodogen (Sigma) en cloroformo (2 mg de Iodogen/ml de cloroformo). Antes de colocar el RNPm polisomal se dejó secar bién el cloroformo y después el tubo fue lavado con el buffer de fosfato para eliminar restos de Iodogen aheridos a las paredes del tubo. Después de este proceso se agregaron 6 μl de ^{125}I (0.1 mCi/μl) y la reacción se llevó a cabo por 10 min. en un baño de agua fría entre 2-4 °C. Transcurrido este tiempo, el ^{125}I RNPm polisomal fue removido a otro tubo para detener la reacción; y luego se realizó la precipitación con etanol siguiendo el procedimiento usual (4.2.3.). La concentración final del RNPm polisomal fue 7.2 μg/μl (2500 c.p.m./μg). Posteriormente se efectuó la purificación a través de columnas de oligo (dT)-celulosa (4.2.6.) para obtener el RNPm poli $(A)^+$ (1100 c.p.m./μg).

4.2.6. Preparación del RNPm poli $(A)^+$

El método empleado fue el de Aviv y Leder (Aviv y Leder, 1972). El RNPm polisomal a razón de 10 mg/ml de oligo (dT)-celulosa fue calentado durante 10 min. a 40 °C en LiCl 0.5 M, y luego se colocó en una columna de oligo (dT)-celulosa previamente tratada con hidróxido de sodio 0.1 M, lavada con agua y equilibrada con un buffer conteniendo: 0.5 M LiCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA y 0.1 % SDS. Se recolectó el RNPm poli $(A)^-$ no retenido en la columna y se unió al volumen de lavado con el buffer anterior (1 ml de buffer/10 mg de RNPm polisomal colocado sobre la columna). El RNPm poli $(A)^-$ se cargó sobre la columna dos veces más repitiendo el proceso de lavado.

La columna se lavó luego con un buffer conteniendo: 0.15 M LiCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA y 0.1 % SDS a razón de 4 ml de buffer de lavado/10 mg de RNPm polisomal colocado inicialmente sobre la columna. El RNPm poli $(A)^+$

retenido en la columna se eluyó con una solución conteniendo: 2 mM EDTA y 0.1 % SDS (1ml/10 mg de RNPm polisomal).

Las soluciones de RNPm poli $(A)^+$ y RNPm poli $(A)^-$ se ajustaron a 0.2 M acetato de sodio-ácido acético pH 5.2, y se precipitaron con dos volumenes de etanol al 95 % a -20 °C durante tres días. Los precipitados se secaron por corriente de nitrógeno y se resuspendieron en agua hasta 70 DO/A_{260} para el RNPm poli $(A)^+$ y 160 DO/A_{260} para el RNPm poli $(A)^-$.

4.2.7. Ensayo para la determinación de la síntesis de proteínas dependiente de RNPm poli $(A)^+$ exógeno

El extracto de levadura S-100' (111 μg de proteínas) fue incubado con 7 μg de RNPm poli $(A)^+$ en un buffer conteniendo: 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 210 mM acetato de potasio, 3 mM acetato de magnesio, 3 mM ditiotreitol, 10 % glicerol 40 μ M de cada aminoácido más ^3H leucina (1.7 μM, 6 nCi/picomol), 0.5 mM ATP, 0.1 mM GTP, 20 mM fosfato de creatina y 10 μg de creatina fosfoquinasa (EC 2.7.3.2) en un volumen total de 50 μl. La mezcla de reacción fue incubada 40 min. a 25 °C. La síntesis de proteínas fue seguida por la incorporación de ^3H leucina en los polipéptidos sintetizados. Al final del período de incubación fue agregado 1 ml de ácido tricloroacético al 10 % v/v y luego se calentó a 90 °C por 20 min. (método de TCA en caliente).

Los precipitados fueron recogidos en filtros de fibra de vidrio (GFA-Whatman) y lavados con TCA al 5 % v/v. Después de secados los filtros, la radiactividad fue contada en un contador de centelleo líquido modelo Beckman.

En algunos ensayos, el S-100' más el RNPm poli $(A)^+$ fueron incubados 40 min. a 25 °C con diferentes cantidades (0-28 μg) de cada suero (anti-EF-1α, anti-50RNPm, SNIR,SNIC) en un volumen de 28 μl en buffer A. Luego se siguió el procedimiento normal de síntesis de proteínas. En otros experimentos, EF-1α fue preincubado con 20 μg de anti-EF-1α, 12 μg de anti-50RNPm, 20 μg de SNIC y 12 μ g de SNIR. Después de esta preincubación se continuó con las dos incubaciones descritas anteriormente.

4.2.8. Ensayo para la determinación de la síntesis de polifenilalanina dependiente de poli (U)

Las condiciones de reacción fueron las mismas que para el ensayo de síntesis de proteínas con mensajero natural, pero con las siguientes modificaciones: 13 mM de acetato de magnesio, 4 μg de poli (U) en lugar de RNPm y 1.5 μM de ^{3}H fenilalanina (5 nCi/picomol) en lugar de ^{3}H leucina.

4.2.9. Ensayo de formación del complejo de preiniciación 48S

111 μg de proteínas en el extracto de levadura S-100' fueron incubados por 15 min. a 20 °C en un volumen de 50 μl con los siguientes componentes: 40 μM de cada aminoácido, 7 μg de ^{3}H RNPm poli $(A)^+$ o ^{125}I RNPm poli $(A)^+$ y 12 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana (Amersham). En algunos experimentos, el S-100' y RNPm poli $(A)^+$ fueron preincubados con diferentes cantidades de sueros (anti-EF-1α, anti-50RNPm, anti-PABP, SNIC y SNIR) , bajo las condiciones descritas para el ensayo de síntesis de proteínas (4.2.7.). En otros análisis, cada suero fue preincubado con diferentes cantidades de EF-1α (0-1.2 μg) bajo condiciones similares a las específicadas en el ensayo de síntesis de proteínas.

Después de las incubaciones las muestras fueron fraccionadas a través de 12 ml de un gradiente de sacarosa 5-30 % como se explica en la parte experimental 4.2.11.

4.2.10. Ensayo de formación del complejo de iniciación 80S

La formación del complejo de iniciación 80S se realizó de la misma manera que para el complejo de preiniciación 48S, solo que la mezcla de reacción incluye además 0.5 mM ATP, 0.1 mM GTP, 20 mM de fosfato de creatina y 10 μg de creatina fosfoquinasa. Para inhibir el paso de elongación se agregó cicloheximida a una concentración final de 1.25 mM. Al final de la incubación las mezclas de reacción fueron analizadas a través de gradientes de sacarosa (4.2.11).

4.2.11. Gradientes de sacarosa

Las mezclas de los ensayos de formación de los complejos de preiniciación 48S (4.2.9.) y de iniciación 80S (4.2.10.) fueron analizados a través de gradientes líneales de sacarosa (12 ml) 5-30 %, los cuales se prepararon en un mezclador automático de gradientes LKB. El buffer para la elaboración del gradiente contiene: Tris-Cl 20 mM pH 7.5, acetato de potasio 70 mM, acetato de magnesio 3 mM y ditiotreitol 1 mM. Las centrifugaciones de los gradientes se llevaron a cabo en un rotor SW40 durante 4 horas y media a 39800 r.p.m. a 4 °C. Luego fueron analizados en forma automática en un analizador de gradientes ISCO UA-5 utilizando un filtro a 254 nm. Se recogieron fracciones de 0.4 ml para realizar el contaje de radiactividad (^{3}H y ^{125}I) en un contador de centelleo líquido modelo Beckman (las fracciones se completaron a 4 ml con acuasol para el contaje). En algunos ensayos las fracciones fueron usadas para realizar electroforesis (4.2.14.).

4.2.12. Preparación de EF-1α

El factor EF-1α fue preparado y donado gentilmente por el laboratorio de la Dr Kalpana Chakraburtty del Departamento de Bioquímica del Colegio de Medicina de Wisconsin, U.S.A. según los protocolos publicados (Skorgerson, 1979; Dasmahapatra y col., 1981b).

4.2.13. Preparación de anti-EF-1α, anti-50RNPm y anti-PABP

El suero anti-EF-1α fue obtenido también en el laboratorio de la Dr. Chakraburtty. Los conejos fueron inyectados con 100 μg de EF-1α purificado mezclado con adjuvante completo. Cada dos semanas y dos veces fueron administradas inyecciones subcutáneas con 50 μg de EF-1α. Los titulos de anticuerpo en el suero fueron determinados por el ensayo estandar de Ouchterlony (Ouchterlony, 1954), y el suero fue purificado por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía por DEAE-celulosa.

El suero anti-50RNPm fue obtenido en ratón utilizando el siguiente procedimiento: se cortó la porción del gel que contenía a 50RNPm (≈ 1.5 μg) y se homogenizó en un buffer 0.1 M de fosfato de sodio pH 7.5 (Ouchterlony, 1954, Kobayashi y col., 1985). Luego se preparó una emulsión con 9 v/v de adjuvante completo de Freund's. Se inyectó aproximadamente 0,1 ml de esta emulsión intraperitonealmente en tres ratones de un cultivo IVIC derivados de ratones albinos suizos. Se continuaron las inyecciones con igual dosis de antígeno y 9 v/v de adjuvante incompleto de Freunds cada 10 días durante dos meses. Los ratones fueron sacrificados a la semana de la última inyección para obtener el suero. También se obtuvó suero no inmune como control.

El suero policlonal anti-PABP aislado en conejo fue donado gentilmente por el Dr. Dreyfuss de la Universidad de North Western, Evanston Illinois, Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular, U. S. A. (Adams y col., 1986)

4.2.14. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas asociadas al RNPm polisomal

Las proteínas asociadas al RNPm polisomal y RNPm poli $(A)^+$, fueron aisladas por incubación con ribonucleasas a 37 °C durante 120 min. La reacción con las ribonucleasas se llevó a cabo en un buffer conteniendo: 85 μg de ribonucleasa A, 0.05 mg/ml de nucleasa micrococal, 10 mM Tris-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 3 mM cloruro de magnesio, 7 mM 2-βmercaptoetanol y 0.1 mM de PMSF. Un volumen de esta mezcla de incubación se mezcló con dos volumenes de buffer disociante para electroforesis (62.5 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 10 % 2-βmercaptoetanol, 10 % glicerol y 0.005 % de azul de bromofenol como marcador (Laemmli, 1970).

Finalmente las proteínas se analizaron por geles de poliacrilamida-SDS preparados de la siguiente forma: 12.5 % poliacrilamida, 0.1 % SDS, 0.1 % bis-acrilamida, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, persulfato 0.6 mg/ml y Temed (3 μg/ml).

Se utilizó un gel de enpaquetamiento constituído por: 4 % poliacrilamida, 0.03 % bis-acrilamida, 0.063 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, persulfato 3 mg/ml y Temed 4 μl/ml.

El buffer de corrida contiene: 0.025 M de Tris pH 8.8 ajustado con NaOH, 0.2 M de glicina y 3.5 mM de SDS.

Las proteínas se separaron en el gel por la aplicación de una diferencia de potencial de 180 Vol. durante 2-3 horas. Para visualizar las proteínas, los geles conteniendo las ^{125}I proteínas asociadas al RNPm polisomal se secaron en un secador de geles al vacío a 70 °C durante una hora y luego se expusieron sobre una película Kodak toda la noche y durante dos a tres semanas para visualizar bandas menores. Las películas fueron reveladas con revelador y fijador marca Kodak.

Para realizar el análisis electroforético de las diferentes fracciones de los gradientes con el^{125}I RNPm poli $(A)^+$, en los ensayos de formación de los complejos 48S y 80S, a cada fracción de 0.4 ml se le agregó agua hasta completar un volumen de 2 ml y acetato de sodio-ácido acético pH 5.2 hasta una concentración de 0.2 M. Luego se añadieron dos volumenes de etanol y se precipitó a - 20 °C durante tres días. Los precipitados fueron secados por corriente de nitrógeno, y resuspendidos en buffer para incubación con las ribonucleasas como se especificó anteriormente.

4.2.15. Ensayos de inmunotransferencia

Se realizaron ensayos de inmunotransferencia de: S-100', factor de elongación EF-1α y de las proteínas asociadas al RNPm polisomal. El método utilizado fue el de Blake y col. (Blake y col., 1984).

Después de finalizar la corrida electroforética según la técnica descrita en 4.2.14., se procedió a remojar el gel y el papel de nitrocelulosa durante una hora en el buffer de transferencia conteniendo: Tris 25 mM pH 8.3 ± 1, glicina 192 mM y metanol al 20 %.

El gel se colocó luego sobre el papel PVDF (Millipore) y ambos se prensaron entre dos esponjas conteniendo en su parte interna dos piezas de papel de filtro

Whatman. Posteriormente el gel empacado se sumergió dentro de la cámara que contiene el buffer de transferencia, y se sometió durante 120 min. a una diferencia de potencial de 12 Vol. En este proceso se debe tener la precaución de que el papel PVDF quede dirigido hacia el polo negativo.

Una vez finalizada la transferencia, el papel de nitrocelulosa se colocó en buffer de bloqueo con agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente. El buffer contiene: 5 % leche descremada, 0.9 % NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.4, 0.5 g/l de $MgCl_2$ y 0.1 % de azida.

Los papeles,conteniendo los diferentes antígenos se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente en una concentración de 0.5 μg/μl en un volumen de 0.5 ml del siguiente buffer: 0.9 % NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0.5 g/l de $MgCl_2$ y 1 % de leche descremada.

Después de la incubación los papeles fueron lavados en un buffer a) conteniendo: 25 mM tris pH 7.6 y 150 mM NaCl, y en un segundo buffer b) equivalente pero con 0.05 % Triton X-100. Los lavados fueron realizados durante 5 min. a temperatura ambiente y en el siguiente orden: a), b), b) y a).

Después de los lavados los papeles fueron incubados durante 3 horas a temperatura ambiente con ^{125}I Proteína A (0.7 μg/ml, 6.9 μCi/ml), en 2 ml de un buffer conteniendo 25 mM Tris pH 7.6 y 150 mM NaCl. Se repitió luego el mismo lavado anterior. Después de secar los papeles, estos fueron expuestos en una película Kodak toda la noche, y durante dos semanas para visualizar bandas menores. Las películas fueron reveladas con Revelador y Fijador Kodak.

4.2.16. Ensayo de proteólisis

Las proteínas marcadas con ^{125}I del RNPm poli $(A)^+$ y ^{125}I-EF-1α, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (12.5 % - 0.1 %) con un espesor de 1 mm según el procedimiento descrito en 4.2.14. Los geles se expusieron húmedos sobre una películas kodak durante toda la noche. Después de revelar la película se superpuso sobre el gel para ubicar la posición de 50RNPm y EF-1α. Se cortó el gel en las posiciones correspondientes y se colocaron en 0.5 ml de un buffer que contenía: 20 mM Tris pH 7.7, 1 mM EDTA y la endoproteinasa Licina-C (Proteasa-serina purificada de ***Pseudomonas aeruginosa***, EC 3.4.21.50) en una razón enzima/sustrato de 1:25 p/p. La incubación se llevó a cabo por 2.5 y 7 horas a 35 °C (Elliot y Cohen, 1986).

Después de las incubaciones las muestras fueron hechas 4 % SDS, 12 % glicerol p/v 50 mM Tris pH 6.8, 2 % 2-βmercaptoetanol v/v y 0.01 % serva blue G, y se colocaron en un segundo gel de 2 mm de espesor (Schaggen y Vonjagow, 1987). El gel es un sistema discontinuo formado por un gel de empaquetamiento, un gel espaciador y un gel de corrida. La composición de cada uno de los geles es la siguiente: a) Gel de empaquetamiento: 3.8 % acrilamida, 0.12 % bisacrilamida, 0.77 M Tris pH 8.45 y 0.1 % SDS. b) Gel espaciador: 10 % acrilamida, 0.3 % bisacrilamida, 1 M Tris pH 8.45 y 0.1 % SDS. c) Gel de corrida: 16 % acrilamida, 0.5 % bisacrilamida, 1 M Tris pH 8.45, 0.1 % SDS y 12 % glicerol.

La electroforesis se llevó a cabo durante 16 horas a 58 miliamper y utilizando dos buffres de corrida: a) Buffer del cátodo: Tris 0.1 M pH 8.25, Tricine 0.1 M y 0.1 % SDS. b) Buffer del ánodo: Tris 0.2 M pH 8.9. Después de finalizada la

electroforesis los geles fueron expuestos húmedos durante toda la noche, semanas para visualizar las bandas menores.

RESULTADOS

5.0. RESULTADOS

5.1. Detección de las proteínas asociadas al RNPm poli (A)$^+$ polisomal

En una publicación anterior (Herrera y col., 1988), nosotros detectamos por marcaje con ^{125}I a tres polipéptidos principales asociados al RNPm total polisomal de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** con pesos moleculares aproximados de 72, 60 y 50 KDa. Por un estudio a través de gradientes líneales de sacarosa y utilizando el sistema libre de células de la cepa mutante resistente a la edeína se detectó la participación de estos polipéptidos en los complejos de preiniciación 48S y de iniciación 80S. Por otra parte, también se determinó que la degradación de los polipéptidos con proteasas inhibia la formación del complejo de preiniciación 48S.

Con el fín de realizar un estudio más detallado sobre este grupo de proteínas asociadas al RNPm polisomal de la levadura, y su detección e importancia dentro de los complejos de preiniciación 48S y de iniciación 80S, se procedió a extraer al RNPm total de los polisomas con SDS-fenol-cloroformo (4.2.3.). Después de la aplicación de este procedimiento desnaturalizante se detectaron aún cierta cantidad de proteínas asociadas por marcaje con ^{125}I (4.2.5.).

El RNPm aislado de esta forma se purificó a través de una columna de oligo (dT)-celulosa y las proteínas asociadas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS después de la incubación con nucleasas (4.2.14.) (Figura 1). La autorradiografía y densitometría de la electroforesis en el proceso de purificación, revela la presencia de tres polipéptidos principales asociados al RNPm poli(A)$^+$ con pesos moleculares aproximados de 72, 60 y 50 kDa (Figura 1C). El

RNPm total (Figura 1A) presenta además de los tres polipéptidos principales asociados al RNPm poli $(A)^+$, un grupo de bandas mayores a 94 KDa. En el RNPm poli $(A)^-$ (Figura 1B) se observa una reducción importante de los polipéptidos que migran con el RNPm poli $(A)^+$, permaneciendo asociadas las bandas mayores a 94 KDa que se detectan también en el RNPm total.

En los canales del RNPm total y el RNPm poli $(A)^-$ hay una gran cantidad de material acumulada en el tope, que es característico en las electroforesis de proteínas con una alta afinidad por ARN después de las incubaciones con nucleasas, debido posiblemente a las interacciones de los polipéptidos con fragmentos de ARN de considerable tamaño que no penetran en el gel, en este caso, con la gran cantidad de oligos del ARNr.

En la densitometría de las autorradiografías se señalan los porcentajes de los polipéptidos principales en los diferentes ARN. El polipéptido de 50 KDa tiene una proporción de 33 %, 16 % y 46 % en el RNPm total, RNPm poli $(A)^-$ y RNPm poli $(A)^+$ respectivamente. El polipéptido de 72 KDa en el mismo orden tiene un porcentaje de 22 %, 15 % y 35 %. El polipéptido de 60 KDa se encuentra en un 8 % en el RNPm total, no se detecta en el RNPm poli $(A)^-$ y representa un 15 % en el RNPm poli $(A)^+$.

El polipéptido de 50 KDa aparentemente es el más resistente al procedimiento desnaturalizante empleado, ya que su proporción varía de 46 % a 75 % en el RNPm poli $(A)^+$ en la misma fase de crecimiento de las células.

Adams y col. en un estudio realizado en la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** también detectaron a tres polipéptidos principales con pesos moleculares de 72, 60 y 50 KDa asociados al RNPm poli $(A)^+$ por fijación con luz ultravioleta (Adams y col., 1986).

5.2. Participación de los polipéptidos asociados al RNPm poli (A)$^+$ en los complejos de iniciación

El RNPm poli (A)$^+$ se hizó reaccionar con el sistema libre de células de la mutante resistente a la edeína en condiciones de formación del complejo de preiniciación 48S (4.2.9) y de iniciación 80S (4.2.10.). Después de fraccionar las mezclas de reacción a través de gradientes líneales de sacarosa (4.2.11.), se precipitaron con etanol las fracciones correspondientes a los complejos de preiniciación 48S (Figura 2A), y de iniciación 80S (Figura 2B). Se observa claramente como los polipéptidos asociados al RNPm poli(A)$^+$ participan en ambos complejos debido a la presencia de la radiactividad ^{125}I en dichas zonas.

Las ^{125}I proteínas presentes en los complejos fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (4.2.14.), y las autorradiografías y densitometrías respectivas se muestran en la Figura 2D y 2E. Las densitometrías de las autorradiografías revelan que el polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$ en una relación de 46 % (Figura 2C), permanece en los complejos aumentando su proporción a 83 % en el complejo de preiniciación 48S (Figura 2D), y a 90 % en el complejo de iniciación 80S (Figura 2E). El polipéptido de 72 KDa que presenta el 35 % en el RNPm poli (A)$^+$ (Figura 2C) baja a 5 % en el complejo de preiniciación 48S (Figura 2D), y a 2 % en el complejo de iniciación 80S (Figura 2E). El polipéptido de 60 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$ en un porcentaje de 15 % (Figura 2C) no se detecta en los complejos de iniciación (Figura 2D y 2E)

5.3. Reacción de anti-50RNPm con el RNPm poli (A)$^+$ y el sistema libre de células

Para tratar de analizar la posible función del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^+$ en la formación de los complejos de iniciación, se obtuvo un anticuerpo policlonal específico (anti-50RNPm) aislado en ratón por inmunización con el polipéptido extraído del gel (4.2.13.). Los ensayos de inmunotransferencia se muestran en la Figura 3. Después de las respectivas electroforesis (4.2.14.), las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$mostradas en la Figura 1C y del sistema libre de células (S-100') (Figura 3a), fueron transferidas al papel PVDF (Millipore) para ser sometidas a la reacción con los sueros.

En la Figura 3 canal 1 se observa como el suero aislado en ratón (anti-50RNPm) reacciona con el polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm, y con el S-100' en la zona de 50 KDa (figura 3, canal 2), indicando que este polipéptido posiblemente se encuentre también libre en el citosol. El suero no inmune de ratón no muestra reacción con las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ (Figura 3, canal 3), ni con el sistema libre de células (Figura 3, canal 4).

El polipéptido de 72 KDa unido al RNPm poli $(A)^+$ fue identificado como la proteína asociada a la cola de poli (A) en la región 3' terminal del ARNm (PABP), ya que este polipéptido mostró reacción con un anticuerpo policlonal específico aislado en conejo por Dreyffus y col. contra esta proteína de ***Saccharomyces cerevisiae*** (Figura 3, canal 5) (Adam y col., 1986). Este anticuerpo también reacciona en 72 KDa con el sistema libre de células (Figura 3, canal 6). El suero no inmune de conejo no reacciona con las proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ (Figura3, canal 7), ni con el sistema libre de células (Figura 3, canal 8).

5.4 Inhibición de la síntesis de proteínas por anti-50RNPm y anti-PABP

En diferentes trabajos se ha determinado que PABP participa en la síntesis de proteínas de ***Saccharomyces cerevisiae*** como se explicó anteriormente (Jacobson y Monroe, 1990; Sachs y Davis, 1989). Sin embargo, no hay información sobre la participación en este evento de otros polipéptidos asociados al RNPm de la levadura. Para estudiar la posible función del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^+$ en la síntesis proteica, se analizó el efecto de anti-50RNPm en ensayos *in vitro*. Dichos ensayos se realizaron utilizando el sistema libre de células de la mutante resistente a la edeína y dependientes del RNPm poli $(A)^+$ (4.2.7.). También se analizó paralelamente el efecto de anti-PABP.

Los resultados obtenidos (Tabla 1) demuestran que anti-50RNPm inhibe la síntesis de proteínas a medida que la concentración de suero aumenta en el ensayo, manteniendose una actividad remanente sobre el control desde 63 % para 4 μg de suero hasta un 29 % para 16 μg de suero. No hay una mayor inhibición al aumentar la cantidad de suero hasta 28 μg, observandose una actividad remanente en la síntesis de proteínas de 25-30 % sobre el control. Con el suero no inmune de ratón (SNIR) se mantiene una actividad desde 98 % hasta 73 % para el mismo rango de suero (desde 4 μg hasta 28 μg).

El suero anti-PABP aislado en conejo igualmente inhibe la síntesis de proteínas hasta un 70 % con 16 μg, mientras que la misma cantidad de suero no inmune (SNIC) solo inhibe aproximadamente un 11 % (Tabla 1). Este efecto obtenido con anti-PABP está de acuerdo con los resultados reportados para sistemas *in vitro* altamente eficientes (Jacobson y Monroe, 1990; Sachs y Davis, 1989; Sachs y Deardorff, 1992).

5.5. Inhibición de los complejos de iniciación por anti-50RNPm y anti-PABP

Para obtener una información más precisa sobre la función en la síntesis de proteínas del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm, se procedió a analizar los complejos de preiniciación 48S y de iniciación 80S a través de gradientes lineales de sacarosa, (4.2.11.) utilizando los sueros inmunes (anti-50RNPm y anti-PABP) y detectando al RNPm poli $(A)^+$ por marcaje con ^3H Uracilo (4.2.4.).

La formación del complejo de preiniciación 48S utilizando el sistema libre de células de la mutante resistente a la edeína, se llevó a cabo sin el uso de inhibidores específicos para este complejo, ya que es una característica de esta cepa (como se ha reportado en publicaciones anteriores) (Herrera y col., 1988) acumular gran cantidad de este complejo en comparación con la cepa silvestre bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

La Figura 4A→E muestra el fraccionamiento de las mezclas de reacción a través de gradientes de sacarosa para el complejo de preiniciación 48S, en la presencia o ausencia de las cantidades de sueros inmunes y no inmunes indicadas. La línea contínua señala el perfil de absorbancia ribosomal en el sistema libre de células, y la línea punteada la radiactividad de ^3H Uracilo, es decir, la ubicación del RNPm poli $(A)^+$ en las diferentes zonas del gradiente.

En la Figura 4A se observa la máxima formación del complejo de preiniciación 48S con una cantidad óptima de RNPm poli $(A)^+$, y representada por la radiactividad ^3H en esta zona. La cantidad óptima de RNPm poli $(A)^+$ corresponde a saturar el sistema con 3-6 picomoles de RNPm poli $(A)^+$/picomol de ribosomas en el S-100'. Aproximadamente la incorporación del RNPm poli $(A)^+$ para formar el complejo, tomando en consideración la heterogeneidad de pesos moleculares del RNPm poli $(A)^+$ entre 14S-9S (1.1-0.7 Kb) es de 0.3-0.5 picomoles de RNPm poli $(A)^+$/ picomol de ribosomas en el sistema libre de células.

Al utilizar los diferentes sueros en las mezclas de reacción para formar el complejo de preiniciación 48S, hay una inhibición aproximada de 23 % sobre el control sin suero para la cantidad de suero no inmune de ratón indicada (16 μg) (Figura 4B), y de 7 % para el suero no inmune de conejo (12 μg) (Figura 4D). Cuando en las mezclas de reacción se coloca anti-50RNPm (Figura 4C) se observa una inhibición del complejo de preiniciación 48S de 65 % sobre el control sin suero. El uso de anti-PABP no inhibe el complejo de manera significativa (Figura 4E) (8-10 % sobre el control sin suero).

Para el análisis del complejo de iniciación 80S, se agregó cicloheximida a las mezclas de reacción para bloquear el ciclo de elongación. En la Figura 4F se observa la formación del complejo de iniciación 80S en la mezcla de reacción sin sueros. Aproximadamente el 50 % del complejo de preiniciación 48S (Figura 4A) pasa a formar el complejo de iniciación 80S cuando se agrega energía a las mezclas de reacción (Figura 4F).

Los sueros no inmunes de ratón (Figura 4H) y de conejo (Figura 4J) no causan un efecto inhibitorio apreciable sobre el complejo de iniciación 80S (10-15 % para el SNIR y 5-8 % para el SNIC). Los sueros inmunes anti-50RNPm (Figura 4I) y anti-PABP (Figura 4K), inhiben al complejo de iniciación 80S más de un 60 % sobre el control para la cantidad de sueros indicadas en los ensayos.

La inhibición del complejo de preiniciación 48S y de iniciación 80S en el análisis a través de gradientes de sacarosa, y para las diferentes concentraciones del suero anti-50RNPm utilizadas (4 μg a 28 μg) se muestra en la Figura 5A y 5B respectivamente. La máxima inhibición para ambos complejos es aproximadamente de un 65 % sobre el control sin suero para una cantidad de suero inmune de 16 μg en las mezclas de reacción. La inhibición se mantiene aproximadamente constante para cantidades mayores de suero hasta 28 μg. El suero no inmune de ratón tiene un

efecto inhibitorio alrededor del 20 %-25 % para concentraciones altas del suero (a partir de 13 μg).

Los resultados con anti-PABP se muestran en la Figura 6. No hay un efecto inhibitorio significativo en el complejo de preiniciación 48S para las diferentes concentraciones de suero utilizadas. El complejo de iniciación 80S sufre una inhibición de un 60 % para una concentración de suero en el ensayo de 12-16 μg, manteniendose constante esta inhibición para cantidades mayores del suero inmune.

5.6. Características del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$

a) Relación antigénica con el factor de elongación EF-1α:

Para tratar de caracterizar al polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$ y su posible relación con factores traduccionales ya descritos, se realizaron varios ensayos y se encontró una reacción del polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$ con un anticuerpo policlonal específico aislado en conejo para el factor de elongación EF-1α. La Figura 7 muestra los ensayos de inmunotransferencia con este factor purificado a más de 95 % por Chakrabrutty y col., y las proteínas asociadas al RNPm poli (A)$^+$. Después de las respectivas electroforesis, el factor EF-1α purificado (Figura 7a), las proteínas del S-100'(Figura 3a) y las proteínas asociadas al RNPm poli (A)$^+$ (Figura 1C) fueron transferidas al papel PVDF. El anticuerpo policlonal específico contra el factor de elongación EF-1α reacciona con EF-1α (Figura 7, canal 1), y con el S-100' en la zona de 50 KDa (Figura 7, canal 2). El suero anti-EF-1α también reconoce al polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli (A)$^+$ (Figura 7, canal 3), al igual que anti-50RNPm (Figura 3, canal 1). De manera similar anti-50RNPm reacciona con EF-1α (Figura 7, canal 4). El suero no inmune de conejo no reacciona con EF-1α, S-100' ni las proteínas asociadas al RNPm

(Figura 8, canales 5, 6 y 7), tampoco el suero no inmune de ratón tiene reacción con EF-1α (Figura 7, canal 8)

b) Proteólisis de EF-1α y 50 RNPm:

Como ambos polipéptidos están relacionados antigenicamente se realizó un estudio con la proteasa Lisina-C, la cual corta específicamente en el lado carboxílico de la lisina (Elliot y Cohen, 1986), con la finalidad de establecer una posible relación entre ellos al comparar sus mapas peptídicos. El procedimiento que se siguió se describe en la parte experimental (4.2.16.).

Las proteínas aisladas del gel tienen una pureza de 95 % para EF-1α (Figura 8A, a) y 98 % para 50RNPm (Figura 8, b). Cuando las incubaciones se realizaron en un tiempo de 2.5 horas, se obtuvo un patrón similar para ambos polipéptidos (Figura 8B, a_1 y b_1) con dos bandas principales alrededor de 31 KDa y 20 KDa. La densitometría de las autorradiografías muestra que los dos polipéptidos son fragmentados por la proteasa casi con la misma eficiencia: 29 % para el péptido de 31 KDa tanto para EF-1α (a_1) como 50RNPm (b_1), y 18 % y 20 % para el fragmento de 20 KDa de EF-1α (a_1) y 50RNPm (b_1) respectivamente. Sin embargo, cuando se aumentó el tiempo de incubación a 7 horas se observaron algunas diferencias. El factor EF-1α tiene una banda alrededor de 20 KDa y un grupo de bandas entre 24 KDa y 31 KDa que no se encuentran en 50RNPm.

5.7. Inhibición de la síntesis de polifenilalanina por anti-50RNPm

El anticuerpo policlonal específico aislado en conejo para el factor de elongación EF-1α bloquea la síntesis de proteínas dependiente de RNPm poli $(A)^+$ exógeno como es de esperarse (Tabla 2), hasta un 60 % para 20 μg de suero. Para una cantidad equivalente de suero no inmune de conejo solo hay una inhibición de un 3 %-5 % en la síntesis de proteínas. No se observa mayor inhibición al aumentar la cantidad de suero hasta 28 μg. De manera similar anti-EF-1α inhibe la síntesis de polifenilalanina dependiente del mensajero sintético poli (U) hasta un 62 % para 24 μ g de suero (Tabla 2), frente a un 7 % para el suero control no inmune. El anticuerpo policlonal de ratón (anti-50RNPm) que muestra reacción cruzada con EF-1α, igualmente inhibe la síntesis de polifenilalanina hasta un 75 % para 16 μg de suero, mientras que el suero control solo inhibe un 22 % (Tabla 2). La inhibición se mantiene más o menos constante para concentraciones de suero hasta 28 μg.

5.8. Inhibición de los complejos de iniciación por anti-EF-1α

Se estudió también la capacidad de anti-EF-1α para inhibir a los complejos de iniciación de la síntesis proteica, ya que este anticuerpo reconoce a 50RNPm. Los resultados del análisis después de fraccionar las mezclas de reacción a través de gradientes lineales de sacarosa se muestran en la Figura 9. El suero anti-EF-1α inhibe al complejo de iniciación 80S aproximadamente un 50 % con 14 μg, representando el control solo un 3 % de inhibición. Los resultados obtenidos con anti-EF-1α en la inhibición del complejo de preiniciación 48S fueron similares a los obtenidos para el complejo de iniciación 80S.

5.9. Recuperación de la síntesis de proteínas y síntesis de polifenilalanina por EF-1α

Puesto que ambos anticuerpos (anti-50RNPm y anti-EF-1α) muestran reacción con el factor EF-1α en los ensayos de inmunotransferencia, se probó la capacidad de recuperación de este factor en la síntesis de proteínas y síntesis de polifenilalanina inhibida con ambos sueros inmunes. Las Figuras 10 y 11 muestran que efectivamente la incubación previa de EF-1α con anti-50RNPm o anti-EF-1α respectivamente, permite la recuperación de la actividad entre 90-100 % para la traducción de RNPm poli $(A)^+$ exógeno (Figura 10) o mensajero sintético poli (U) (Figura 11), y con una cantidad de EF-1α alrededor de 0.6 μg para una inhibición con ambos anticuerpos aproximadamente de un 60 %. El aumento de actividad en ambos casos (Figuras 10 y 11) al agregar EF-1α a los ensayos inhibidos con los sueros inmunes, no se debe a una deficiencia de EF-1α en el sistema traduccional ya que el control (sin sueros) no muestra mayor estimulación al añadir cantidades crecientes del factor en las mezclas de reacción. Tampoco los ensayos realizados con los sueros no inmunes de ratón y conejo muestran una estimulación significativa al agregar EF-1α (Figuras 10 y 11).

5.10. Recuperación de los complejos de iniciación por EF-1α

De igual forma EF-1α es capaz de recuperar al complejo de iniciación 80S hasta aproximadamente un 90 % con 0.6 μg del factor en los sistemas inhibidos en un 50 %-60 % por anti-50RNPm (Figura 12A) y anti-EF-1α (Figura 12B). Al añadir cantidades crecientes de EF-1α a las mezclas de reacción control (sin sueros) y con los sueros no inmunes, se observa una pequeña disminución en la formación del complejo de iniciación 80S (Figura 12A y 12B).

En la Figura 13 se observa un ejemplo de los gradientes de sacarosa para una inhibición del complejo de iniciación de aproximadamente 60 % y 50 % con anti-50RNPm (16 μg) y anti-EF-1α (20 μg) respectivamente (Figura 13B y 13C), frente al control sin sueros (Figura 13A). Al realizar los ensayos preincubando la cantidad

indicada de sueros con 0.9 μg de EF-1α, se obtiene una recuperación del complejo de iniciación entre 80 %-90 % sobre el control sin sueros para anti-50RNPm (Figura 13B') y anti-EF-1α (Figura 13C'). El control sin sueros tiene una pequeña inhibición de 5 %-8 % al agregar EF-1α (Figura 13A').

La Figura 14 muestra la recuperación del complejo de preiniciación 48S por EF-1α en sistemas inhibidos con anti-50RNPm con una actividad remanente de un 30 %. La recuperación alcanza un valor alrededor de un 80 % sobre el control aproximadamente para 0.9 μg del factor. Las mezclas de reacción control (sin sueros) y con el suero no inmune no muestran estimulación en la formación del complejo al aumentar la cantidad de EF-1α en los ensayos. Los resultados obtenidos al agregar EF-1α en los ensayos de formación del complejo de preiniciación 48S inhibido con anti-EF-1α son equivalentes a los mostrados en la Figura 14 con anti-50RNPm.

La Figura 15 muestra un ejemplo de los gradientes de sacarosa para la recuperación del complejo de preiniciación 48S por EF-1α. En la Figura 15A se observa la máxima formación del complejo. Hay una inhibición del 20 % sobre el control con el suero no inmune de ratón (16 μg) (Figura 15B), y una inhibición de más del 65 % con el suero inmune anti-50RNPm (16 μg) (Figura 15C). La preincubación de los sueros con EF-1α (0.9 μg), provoca una recuperación del complejo de preiniciación 48S hasta un 80 % sobre el control sin suero, para el sistema inhibido con anti-50RNPm (Figura 15C). La incubación con EF-1α del sistema sin suero y con el suero no inmune de ratón, ocasiona una pequeña disminución de la actividad de formación del complejo hasta un 80 % sobre el control sin suero para el suero no inmune (Figura 15B'), y hasta un 95 % para el sistema sin suero (Figura 15A').

DISCUSIÓN

6.0. DISCUSION

En la Figura 1 se muestra que hay tres proteínas asociadas al RNPm poli $(A)^+$ con pesos moleculares alrededor de 72, 60 y 50 KDa. Estos polipéptidos migran con el RNPm poli $(A)^+$ después de la purificación por oligo (dT)-celulosa quedando una baja proporción en el RNPm poli $(A)^-$, indicando a su vez la mayor afinidad de estas proteínas por el RNPm poli $(A)^+$ que por el ARNr. El tipo de interacción es fuerte y altamente específica ya que los polipéptidos resisten a la extracción en condiciones desnaturalizantes con fenol-cloroformo-SDS. Aunque no se puede establecer una relación directa entre la concentración de proteína y la marca de ^{125}I, se puede inferir que el polipéptido de 50 KDa es aparentemente el más abundante y resistente a dicha extracción, manteniendose en un rango entre 46 % - 75 % en el RNPm poli $(A)^+$ en las diferentes preparaciones.

Los ensayos de inmunotransferencia (Figuras 3 y 7) demuestran que el polipéptido de 72 KDa es la proteína asociada a la secuencia de adeninas en la región 3' terminal del ARNm, puesto que reacciona con un anticuerpo policlonal específico aislado en conejo para esta proteína (Adam y col., 1986). A su vez, el polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^+$ está relacionado con el factor de elongación EF-1α de la síntesis de proteínas. Esta conclusión está basada en el hecho de que el anticuerpo aislado en ratón (anti-50RNPm) reacciona con el factor EF-1α purificado, y anti-EF-1α reconoce a 50RNPm. Estos resultados podrían indicar que el polipéptido

de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^+$ es EF-1α, ya que también hay coincidencia de pesos moleculares, o es una proteína homóloga a EF-1α con epítopes comunes.

La proteólisis controlada es una buena técnica para identificar a proteínas similares por comparación de sus mapas peptídicos. En la Figura 8 se observa un patrón proteolítico similar con dos bandas principales tanto para el factor EF-1α como para 50RNPm, cuando las incubaciones se realizan a tiempos cortos con la proteasa Licina-C. Ello indica que por lo menos tienen una posición de lisina equivalente y una relación de estructura. Sin embargo a tiempos mayores de incubación, las bandas de bajo peso molecular provenientes de las bandas de mayor peso molecular tienen algunas diferencias. Esto sugiere que la segunda hipótesis es la más acertada, es decir, la proteína de 50 KDa asociada al RNPm poli $(A)^+$ debe ser una proteína homóloga a EF-1α y estructuralmente relacionada.

En la literatura se ha reportado que hay dos polipéptidos principales asociados al ARNm aislado de los polisomas de diferentes células con pesos moleculares de 72-78 KDa y 50-60 KDa (Swatantra y col., 1979). Dreyffuss y col. (Adam y col., 1986) también detectaron en la fracción citoplasmática de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, a tres polipéptidos principales con pesos moleculares de 72, 60 y 50 KDa, y bandas menores entre 15-30 KDa. El método utilizado para estudiar los complejos RNPm fue la irradiación con luz ultravioleta y marcaje con ^{35}S-metionina.

La proteína de 72-78 KDa está caracterizada en diferentes células y corresponde al polipéptido asociado a la cola de poli (A) en la región 3' terminal del ARNm (PABP) (Adam y col., 1986; Minich y col., 1989). Sin embargo, el polipéptido de 50-60 KDa asociado al RNPm polisomal en diferentes células no ha sido identificado, y no se conoce si al igual que PABP es una proteína común en la mayoría de los mensajeros, o es diferente para cada clase de ellos.

En reticulocitos de conejo se ha reportado a un polipéptido de 50 KDa presente en los RNPms polisomales y libres citoplasmáticos, que aparentemente es una proteína reguladora de la traducción de acuerdo a la proporción en que se encuentre en el RNPm. En una relación proteína: ARNm de 2:1 activa la traducción de globina, y en una relación 4:1 la inhibe (Minich y col., 1989). Esta proteína fue caracterizada más tarde, y pertenece a la familia de los factores transcripcionales de la "caja Y", y se detectó también en los RNPms polisomales de hígado de rata y musculo de conejo (Evdokimova y col., 1995). En un trabajo reciente se demostró que esta proteína inhibe la traducción de ARNms sin "cap", cuya iniciación se lleva a cabo por una entrada interna del ribosoma, e igualmente inhibe la traducción de mensajeros con "cap", pero cuya iniciación es por una entrada interna del ribosoma debido a una deficiencia de los factores de iniciación eIF-4. Se propone entonces que esta proteína favorece la fidelidad de la iniciación en el mecanismo de entrada interna del ribosoma sobre el mensajero (Evdokimova y col., 1998).

Greenberg y Slobin (Greenberg y Slobin, 1987) reportaron la presencia del factor de elongación EF-1α, y una proteína de mayor peso molecular que tiene epítopes comunes con este factor, en los RNPms polisomales y libres citoplasmáticos de reticulocitos. La presencia de EF-1α en los RNPms polisomales la atribuyeron a una posible contaminación y a interacciones inespecíficas por la fijación con luz ultravioleta, pero no le encontraron explicación a su presencia en los RNPms libres. La proteína de mayor peso molecular y homóloga a EF-1α fue caracterizada como la sintetasa de serina (Slobin y Greenberg, 1988), y le atribuyeron una posible función en la iniciación de la síntesis de proteínas, al observar su acumulación en el complejo de preiniciación 48S en cultivos tratados con edeína (Miseta y col., 1991).

Nuestros resultados son similares a los de Greenberg y Slobin, en el sentido de que hemos detectado una proteína homóloga a EF-1α asociada a los RNPms polisomales, y que participa en la iniciación de la síntesis de proteínas. Sin embargo,

estos autores no han presentado un estudio completo y detallado sobre la participación de la Serina-sintetasa en el proceso traduccional. Nuestros resultados en la Figura 2 demuestran que el polipéptido de 50 KD homólogo a EF-1α, y asociado al RNPm poli $(A)^+$ de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, participa en la formación de los complejos de iniciación 48S y 80S de la síntesis proteica *in vitro*, y permanece asociado a dichos complejos después de su formación.

El polipéptido de 60 KDa no se detecta en dichos complejos indicando que no es indispensable para su formación, o que recicla una vez formados. En este sentido se ha reportado a un polipéptido de 60 KDa enlazado al ARNm inactivo traduccionalmente (Adam y col., 1986).

El polipéptido de 72 KDa (PABP) disminuye considerablemente en los complejos de iniciación (Figura 2). Sin embargo, anti-PABP inhibe la síntesis de proteínas (Tabla1), y al complejo de iniciación 80S, aunque no influye en el complejo de preiniciación 48S (Figuras 4 y 6). Estos resultados coinciden con los reportados por Jacobson y Munroe (jacobson y col., 1990). El hecho de no detectarse al polipéptido en el complejo de preiniciación 48S, pero si influir en el complejo 80S puede indicar una participación del polipéptido libre no marcado presente en el citosol (Figura 3 , canal 6). La proteína PABP no esta tan fuertemente enlazada a la cola de poli (A) sobre el ARNm y puede intercambiarse entre diferentes colas (Merrill y col., 1987; Sachs y col., 1987). Ello explicaría un recambio de ^{125}I-PABP sobre el mensajero por PABP libre en el citosol, y por esta razón no se detecta en los complejos. En las fracciones de los gradientes correspondientes al sobrenadante se observó gran cantidad de ^{125}I-PABP, lo que favorece a la hipótesis anterior. En este sentido, también hay que considerar los datos reportados sobre la degradación progresiva por nucleasas específicas que sufre el complejo poli (A).PABP una vez que el mensajero se incorpora al ribosoma (Sachs y Deardorff, 1992).

Los resultados demuestran que 50RNPm no solo participa en los complejos de iniciación, sino que a su vez es indispensable para su formación, puesto que anti-50RNPm inhibe la síntesis de proteínas (Tabla1) y a dichos complejos (Figuras 4 y 5).

La homología de 50RNPm con el factor de elongación EF-1α, se comprobó de una manera funcional cuando anti-50RNPm inhibe el proceso de elongación en la síntesis de polifenilalanina de manera similar a anti-EF-1α (Tabla 2), y anti-EF-1α inhibe al complejo de iniciación 80S (Figuras 9 y 12) al igual que lo hace anti-50RNPm. Por otra parte la relación estructural también se comprobó cuando EF-1α purificado es capaz de bloquear a ambos anticuerpos (anti-50RNPm y anti-EF-1α), y permitir de esta forma la recuperación de la síntesis de proteínas (Figura 10) y síntesis de polifenilalanina (Figura 11). También se observó como EF-1α recuperó al complejo de iniciación 80S inhibido con ambos anticuerpos (Figuras 12 y 13), y al complejo de preiniciación 48S inhibido con anti-50RNPm (Figuras 14 y 15).

La acumulación de todos estos datos sugieren que: el polipéptido de 50 KDa asociado al RNPm poli $(A)^+$ de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** es una proteína homóloga al factor de elongación EF-1α, e importante en la unión del mensajero al ribosoma durante la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas. Dicho polipéptido pasaría a formar parte de la muy conocida "Familia de EF-α" formada por una cantidad de proteínas similares al factor de elongación y que realizan otras funciones diferentes a la ejercida por EF-1α en la síntesis de proteínas.

El factor de elongación EF-1α es una proteína muy conservada en la escala evolutiva y deriva su nombre de su función en la traducción, caracterizada como la proteína que dirige el aminoacil-ARNt a su respectivo anticodón sobre el ARNm en el sitio A del ribosoma en una reacción dependiente de GTP. Puede encontrarse formando complejos con otros polipéptidos, como por ejemplo: los factores EF-1β-γ envueltos en el intercambio de GDP por GTP sobre EF-1α (Janssen y Moller, 1988),

con EF-1δ también responsable en el intercambio de GDP por GTP (Van-Damme y col., 1990) y participa en el complejo entre EF-1βγδ y la Valina ARNt-sintetasa (Bec y col., 1989). A EF-1α también se le ha encontrado anclado en la membrana del reticulo endoplasmático por fosfatidilinositol (Hayashi y col., 1989).

Por otro lado, se ha reportado a EF-1α y proteínas homólogas a EF-1α (Greenberg y Slobin, 1987; Slobin y Geenberg, 1988) asociadas a los RNPms en reticulocitos , como se explicó anteriormente. Se ha encontrado también a un polipéptido homólogo a EF-1α como componente de los RNPs que está envuelto en la traducción, y como acumulación de ARNts en la etapa anterior a la vitelogénesis en oocitos de ***Xenopus laevis*** (Mattaj y col., 1987).

En un trabajo realizado en este laboratorio, se ha implicado a EF-1α en la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas por asociación de las subunidades ribosomales (Herrera y col., 1991).

El gen supresor SUP2 (SUP35) en levadura codifica para un polipéptido homólogo a EF-1α de 79 KDa que interviene en el control y fidelidad traduccional (Didichenko y col., 1991).

En vista de todo esto, hay muchas evidencias que llevan a pensar que el factor EF-1α está envuelto en otras funciones diferentes a la establecida en la traducción, y que además existen una variedad de polipéptidos relacionados estructuralmente con este factor que pueden ejecutar algunas de estas funciones. Las razones para hacer este tipo de planteamientos son las siguientes:

a) Los niveles celulares de EF-1α son bastante altos (1-10 %) en las fracciones crudas de proteínas, y exceden a los niveles de otros componentes de la maquinaria traduccional, incluyendo a EF-1βγ, ARNts, factores de iniciación, EF-2 y ribosomas.

b) EF-1α sufre modificaciones post-traduccionales que aparentemente no afectan directamente la actividad traduccional, por lo tanto dichas modificaciones pueden modular otras funciones de EF-1α diferentes a la traduccional (Yang y Boss, 1994).

c) Hay muchas regiones en EF-1α (eucariotes) ausentes en EF-Tu (procarites) que pueden tener funciones diferentes.
c) Es evidente la existencia de una familia EF-1α en organismos superiores y de genes intra-específicos de EF-1α.

El mayor número de análisis que se ha realizado respecto a EF-1α participando en otras funciones diferentes a la traduccional, y a homólogos de EF-1α, están relacionados con el citoesqueleto. Se ha reportado a una proteína homóloga a EF-1α de 49 KDa llamada PIK-A49, que sufre modificaciones post-traduccionales y se asocia a la actina del citoesqueleto (Yang y Boss, 1994). Se activa por fosforilación originada por su unión con la fosfatidilinositol 4-quinasa, que a su vez depende de otra proteína quinasa activada por Ca^{++}. Esta activación disminuye por su unión con nucleótidos de guanina. En este sentido en una publicación anterior (Edmonds, 1993), se encontró a una proteína homóloga a EF-1α (ABP-50) que tiene afinidad de enlace a la actina, y esta unión interfiere con las funciones traduccionales de ABP-50 como el factor EF-1α. El GTP inhibe el enlace de ABP-50 a la actina y GDP no. Esto sugiere que el enlace de GDP.EF-1α a la actina interfiere con el reciclaje de EF-1α para entrar en la maquinaria traduccional como GTP.EF-1α.

En ***Physarum Polycephalum*** se reportó a una proteína de 52 KDa asociada a la F-actina que interviene en el empaquetamiento de microtúbulos (MT) y co-empaquetamiento de MT/F-actina. Esta proteína reacciona con anticuerpos contra EF-1α de levadura, y anticuerpos contra una proteína asociada a la actina de células He La, sugiriendo indirectamente que también es posible una

asociación de EF-1α con la actina en células de mamíferos (Itano y Hatano, 1991). De hecho, proteínas extraídas de células mitóticas de mamíferos en un complejo multiproteico incluyen a EF-1α-actina, y a cantidades estequiométricas de EF-1α con las tubulinas α, β yγ (Marchesi, 1993).

En huevos de urticaria de mar también se reportó a una proteína homóloga a EF-1α (50 KDa) que interviene en la formación de microtúbulos *in vitro* (Kuriyama y Boris, 1985). Un anticuerpo contra este polipéptido afecta la formación del tallo en la mitosis, proponiendose una función estabilizante durante esta fase.

En células de carrot se encontró a otra proteína (pp50) homóloga a EF-1α que no es PIK-49, y que se enlaza a los MT y puede empaquetarlos vía Ca^{++}/Ca^{++}M (Calcio-modulina). En tabaco la proteína de 49 KDa homóloga a EF-1α localizada en todas las estructuras de MT parece funcionar de manera similar.

Las interacciones entre posibles homólogos de EF-1α, Ca^{++}/Ca^{++}M y citoesqueleto no ha sido planteada más allá de las plantas superiores. Sin embargo, la presencia de tubulinas y un homólogo a EF-1α en complejos multiproteicos de extractos celulares de mamíferos, pueden indicar una relación equivalente. La síntesis de actina y tubulina parecen estar reguladas por los niveles de estas proteínas y su efecto sobre la estabilidad de sus ARNms (Theodorakis y Cleveland, 1992).

Hasta los momentos no se conoce cual es la relación entre el citoesqueleto y la maquinaria traduccional. Las evidencias parecen indicar que EF-1α participa en una interacción fisiológica con proteínas del citoesqueleto. Esto sería lógico porque varios elementos de la maquinaria traduccional, incluyendo al ARNm y ribosomas interactuan con componentes del citoesqueleto. Sin embargo, los resultados encontrados sobre diferentes polipéptidos homólogos a EF-1α, establecen que la

asociación de estos polipéptidos con el citoesqueleto no es simplemente una consecuencia de las interacciones ribosomales.

A parte de la interacción que existe entre proteínas homólogas a EF-1α y el citoesqueleto, los datos presentados en este trabajo, relacionan a una proteína estructuralmente similar a EF-1α con la iniciación de la síntesis de proteínas. Los resultados sobre su participación en la formación del complejo de preiniciación 48S, indican que es probable que su interacción con el ARNm sea a través de la región 5' terminal. También es probable según los datos de la literatura, sobre la existencia de un sinergismo entre la región del "cap"y la cola de poli (A) en el ARNm, que este polipéptido participe en esta función, e interactue con otros polipéptidos en la región 3' terminal del ARNm. En este sentido, se ha reportado recientemente que el factor de iniciación eIF-4G de ***Saccharomyces cerevisiae*** , el cual interactua con la región del "cap" a través del complejo eIF-4F, está asociado a PABP en la cola de poli (A) sobre el ARNm (Salvador y col., 1996).

CONCLUSIONES

7.0. CONCLUSIONES

- El ARNm poli $(A)^+$ aislado de los polisomas de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** por extracción en condiciones desnaturalizantes, tiene asociados a tres polipéptidos principales de 72, 60 y 50 KDa, constituyendo una partícula RNPm.

- El polipéptido de 72 KDa es la proteína asociada a la cola de poli (A) en la región 3' terminal del ARNm.

- El polipéptido de 50 KDa es una proteína homóloga al factor de elongación EF-1α y posiblemente está asociada en la región 5' terminal del ARNm.

- El polipéptido de 72 KDa (PABP) participa en la iniciación de la síntesis de proteínas, especificamente en la formación del complejo de iniciación 80S.

- El polipéptido de 50 KDa homólogo a EF-1α participa en la iniciación de la síntesis de proteínas, y es necesario en la formación del complejo de preiniciación 48S y el complejo de iniciación 80S.

BIBLIOGRAFÍA

8.0. BIBLIOGRAFIA

ADAM, S.A., NAKAGAWA, T., SWANSAR, M., WOODRUFF, T.K.,& DREYFUSS, G. (1986). POLYADENILATE-BINDING PROTEIN: GENE ISOLATION AND SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A RIBONUCLEOPROTEIN CONSENSUS SEQUENCE. MOL. CELL. BIOL. 6: 2932-2943.

ANTHONY, D.D., MERRICK, W.C. (1992). ANALYSIS OF 40S Y 80S COMPLEXES WITH mRNA AS MEASURED BY SUCROSE DENSITY GRADIENTS AND PRIMER EXTENSION INHIBITION. J. BIOL. CHEM. 267: 1554-1562.

AVIV, H.,& LEDER, P. (1972). PURIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE GLOBIN MESSENGER RNA BY CROMATOGRAPHY ON OLIGOTHYMIDYLIC ACID-CELLULOSE. J. MOL. BIOL. 134: 743.

BEC, G., KERJAN, P., ZHA, X.D., & WALLER, J-P. (1989). VALYL-tRNA SYNTHETASE FROM RABBIT LIVER. J. BIOL. CHEM. 264: 21131-21137.

BERNSTEIN, P., PELTZ, S., & ROSS, J. (1989). THE POLY (A)-POLY (A) BINDING PROTEIN COMPLEX IS A DETERMINANT OF mRNA STABILITY *IN VITRO*. MOL. CELL. BIOL. 9: 659-670.

BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSELL-JONES, G.J., & GOTSCHLICH, E.C. (1984). A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTION OF ALKALINE-PHOSPHATASE CONJUGATED ANTI-ANTIBODY ON WESTERN BLOST. ANAL. BIOCHEM. 136: 175-179.

BRAWERMAN, G. (1981). THE ROLE OF POLY (A) SEQUENCE IN MAMMALIAN MESSENGER RNA. CRC. CRIT. REV. BIOCHEM. 10: 1-38.

BROWNING, K.S., LAX, S.R., RAVEL, J.M. (1987). IDENTIFICATION OF TWO MESSENGER RNA CAP BINDING PROTEINS IN WHEAT. J. BIOL. CHEM. 262: 11228-11232.

CCHWARTZ, H., & DARNELL, J.E. (1976). THE ASSOCIATION PROTEIN WITH THE POLYADENYLIC ACID OF MESSENGER RNA:: EVIDENCE FOR A TRANSPORT ROLE OF A 75000 MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDE. J. MOL. BIOL. 104: 833-851.

CENTRELLA, M., & LUCAS-LENARD, J. (1982). REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN VESICULAR STOMATITIS VIRUS-INFECTED MOUSE L-929 CELLS BY DECREASED PROTEIN SYNTHESIS INITIATION FACTOR 2 ACTIVITY.J.VIROL. 41: 781-791.

CHAKRABURTTY, K., & SAHA, S. (1986). PROTEIN SYNTHESIS IN YEAST. ISOLATION OF VARIANT FORMS OF ELONGATION FACTOR 1 FROM THE YEAST ***Saccharomyces cerevisiae.***J. BIOL.CHEM. 261: 12599-12603.

CHU, E., TAKIMOTO, CH., VOELLER, D., GREM, J.L., ALLEGRA, C.J. (1993). SPECIFIC BINDING OF HUMAN DIHIDROFOLATO REDUCTASA PROTEIN TO DIHIDROFOLATO REDUCTASA MESSENGER RNA *IN VITRO*. BIOCHEMISTRY. 32: 4756-4760.

CHU, E., VOELLER, D., KOELLER, D.M., DRAKE, J.C., TAKIMOTO, CH., MALEY, G.F., MALEY, F., ALLEGRA, C.J. (1993). IDENTIFICATION OF AN RNA BINDING SITE FOR HUMAN THYMIDYLATE-SYNTHASE. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 90:517-521.

CIVELLI, O., VINCENT, A., MAUNDRELL, K., BURI, J.F., & SCHERRER, K. (1980). THE TRANSLATIONAL REPRESSION OF GLOBIN mRNA IN FREE CYTOPLASMIC RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES. EUR. J. BIOCHEM. 107: 577-585.

CONROY, S.C., DEVER, J.E., OWENS, C.L., MERRICK, W.C. (1990). CHARACTERIZATION OF THE 46000 DALTON SUBUNIT OF eIF-4F. ARCH.BIOCHEM. BIOPHYS. 282: 363-371.

DANDEKAR, T., STRIPECKE, R., GRAY, N.K., GOOSSEN, B., CONSTABLE, A., JOHANSSON, H.E., HENTZE, M.W. (1992). IDENTIFICATION OF THE IRON-RESPONSIVE ELEMENT IN MURINE AND HUMAN CRYTHROID δ-AMINOLEVULINIC ACID SYNTHASE mRNA. EMBO. J. 10: 1903-1909.

DASMAHAPATRA, B., & CHAKRABURTTY, K. (1981). PURIFICATION AND PROPERTIES OF ELONGATION FACTOR 3 FROM ***Saccharomyces cerevisiae***. J. BIOL. CHEM. 256: 9999-10004.

DASMAHAPATRA, B., SKOGERSON, L., & CHAKRABURTTY, K. (1981).PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE ELONGATION FACTOR 1 FROM ***Saccharomyces cerevisiae***. J. BIOL. CHEM. 256: 10005-10011.

DATTA, B., CHAKRABARTY, D., ROY, A.L., GUPTA, N. (1988). ROLES OF A 67-KDa POLYPEPTIDE IN REVERSAL OF PROTEIN SYNTHESIS INHIBITION IN HEME-DEFICIENT RETICULOCYTE LYSATE. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85: 3324-3328.

DE BENEDETTI, A., JOSHI-BARVE, S., RINKER-SCHAEFFER, C., RHOADS, R.E. (1991). EXPRESSION OF ANTISENSE RNA AGAINST INITIATION FACTOR eIF-4E mRNA IN He La CELLS RESULTS IN LENGTHENED CELL DIVISION TIMES DISMINISHED TRANSLATION RATES AND REDUCED LEVELS OF BOTH eIF-4E AND THE p220 COMPONENT OF eIF-4F.MOL. CELL. BIOL. 11: 5435-5445.

DE BENEDETTI, A., RHOADS, R.E. (1990). OVEREXPRESSION OF EUKARYOTIC PROTEIN SYNTHESIS FACTOR 4E IN He La CELLS RESULTS IN ABERRANT GROWTH AND MORPHOLOGY. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 87: 8212-8216.

DHOLAKIA, J.N., WAHBA, A.J. (1989). MECHANISM OF THE NUCLEOTIDE EXCHANGE REACTION IN EUKARYOTIC POLYPEPTIDE CHAIN INITIATION. J.BIOL.CHEM. 264: 546-550.

DIDICHENKO, S., TER-AVANESYAN, M., AND SMIRNOV, V. (1991). RIBOSOME-BOUND EF-1α-LIKE PROTEIN OF YEAST ***Saccharomyces cerevisiae***. EUR. J. BIOCHEM. 198:705-711.

DUNCAN, R., HERSHEY, J.W.B. (1985). REGULATION OF INITIATION FACTORS DURING TRANSLATIONAL REPRESSION CAUSED BY SERUM DEPLETION COVALENT MODIFICATION. J.BIOL. CHEM. 260: 5493-5497.

DUNCAN, R., HERSHEY, J.W.B. (1984). HEAT SHOCK-INDUCED TRANSLATIONAL ALTERATIONS IN He La CELLS. INITIATION FACTOR MODIFICATION AND INHIBITION OF TRANSLATION. J. BIOL. CHEM. 259: 11882-11889.

EDERY, I., HUMBELIN, M., DARVEAU, A., LEE, K.A.W., MILBURN, S., HERSHEY, J.W.B., TRACHSEL, H., SONENBERG, N. (1983). INVOLVEMENT OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A IN THE CAP RECOGNITION PROCESS. J. BIOL. CHEM. 258: 11398-11403.

EDMONS, M., & CARAMELA, M.G. (1969). THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADENOSINE MONOPHOSPHATE-RICH POLYNUCLEOTIDES SYNTHESIZED BY EHRLICH ASCITES CELLS. J. BIOL. CHEM. 244: 1314-1324.

ELLIOT, b.W., & COHEN, C. (1986). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LYSINE-SPECIFIC PROTEASE FROM ***Pseudomonas aeruginosas***. J. BIOL. CHEM. 261: 11259-11262.

EDMONDS, B.T. ABP50: (1993). AN ACTIN-BINDING ELONGATION FACTOR 1 ALPHA FROM ***Dictyostelium discoideum***. J. CELL. BIOCHEM. 52 N° 2: 134-139..

ETCHISON, D., MILBURN, S.C., EDERY, I., SONENBERG, N., HERSHEY, J.W.B. (1982). INHIBITION OF He La CELL PROTEIN SYNTHESIS FOLLOWING POLIOVIRUS INFECTION CORRELATES WITH THE PROTEOLYSIS OF A 220000- DALTON POLYPEPTIDE. J. BIOL. CHEM. 257: 14806-14810.

EVANS, J.C., GOODWIN, E.B., KIMBLE, J. (1992). TRANSLATIONAL REGULATION OF DEVELOPMENT AND MATERNAL RNAs IN ***Caenorhabditis elegans***. SEMIN. DEV. BIOL. 3: 381-389.

EVDOKIMOVA, V.M., WEIC, C.L., SITIKOV, A.S., SIMONENKO,P.N., LAZAREV, O.A., VASILENKO, K.S., USTINOV, V.A., HERSHEY, J.W.B., & OVCHINNIKOV, L.P. (1995). THE MAJOR PROTEIN OF MESSENGER RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLES IN SOMATIC CELLS IS A MEMBER OF THE Y-BOX BINDING TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY. J. BIOL. CHEM. 270: 3186-3192.

FRAKER, P.J., & SPECK, J.C.Jr. (1978). PROTEIN AND CELL MEMBRANE IODINATION WITH A SPARINGLY SOLUBLE CHLOROAMIDE, 1, 3, 4, 6-TETRACHLORO 3a, 6a DIPHENYLGLYCOLURIL. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 80: 849-857.

GALLIE, D.R. (1991). THE CAP AND POLY (a) TAIL FUNCTION SYNERGISTICALLY TO REGULATE mRNA TRANSLATIONAL EFFICIENCY. GENES. DEV. 5: 2108-2116.

GALLIS, R.M., Mc DONNEL, J.P., HOPPER, J.F., & YOUNG, E.J. (1975). TRANSLATION OF POLYRIBOADENYLIC ACID-ENRICHED MESSENGER RNAs FROM THE YEAST

Saccharomyces cerevisiae IN HETEROLOGOUS CELL-FREE SYSTEMS. BIOCHEMISTRY. 14: 1038-1041.

GASIOR, E., HERRERA, F., SADNIK, I., McLAUGHING, C., & MOLDAVE, K. (1979). THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CELL-FREE SYSTEM FROM ***Saccharomyces cerevisiae*** THAT TRANSLATED NATURAL MESSENGER RIBONUCLEIC ACID. J. BIOL. CHEM. 254: 3965-3976.

GASPAR, N., KINZY, T.G., SCHERER, B.J., HUMBELIN, M., HERSHEY, J.W.B., MERRICK, W.C. (1994). TRANSLATION INITIATION FACTOR eIF-2: CLONING AND SEQUENCING THE HUMAN cDNA ENCODING THE r-SUBUNIT. J. BIOL. CHEM. 269:3415-3422.

GIRARD, M., & BALTIMORE, D. (1966). CELL CYTOPLASM ON THE ROLE OF SEDIMENTATION OF RNA. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 56: 999-1002.

GÖRLACH, M., HILSE, K. (1986). STOICHIOMETRIC ASSOCIATION OF CAP-BINDING PROTEIN I WITH TRANSLATED POLYSOMAL GLOBIN mRNP. EMBO. J.5: 2629-2635.

GOSS, D.J., WOODLEY, C.L., WABBA, A.J. (1987). A FLUORESCENCE STUDY OF THE BINDING OF EUKARYOTIC INITIATION FACTORS TO MESSENGER RNA AND MESSENGER RNA ANALOGUES. BIOCHEMISTRY. 26: 1551-1556.

GOYER, C., ALTMAN, A., TRACHSEL, H., SONENBERG, N. (1989). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CAP-BINDING PROTEINS FROM YEAST. J. BIOL. CHEM. 264: 7603-7610.

GRAHAM, P.B., & MICK, F. (1993). MICROREVIEW TRANSLATION ELONGATION FACTOR 3: A FUNGUS-SPECIFIE TRANSLATION FACTOR. MOLECULAR MICROBIOL. 9(3): 411-418.

GRANGE, T. DE Sa C., ODDOS, J., PICTET, K. (1987). HUMAN mRNA POLYADENYLATE BINDING PROTEIN: EVOLUTIONARY CONSERVATION OF A NUCLEIC ACID BINDING MOTIF. NUCLEIC. ACIDS. RES. 15: 4771-4787.

GREENBERG, J.R., &SLOBIN, L.I. (1987). EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR Tu IS PRESENT IN mRNA PROTEIN. FEBS. LETT. 224: 54-58.

GRIFO, J.A., ABRAMSON, R.D., SATLER, C.A., MERRICK, W.C. (1984). RNA-STIMULATED ATPasa ACTIVITY OF EUKARYOTIC INITIATION FACTORS. J. BIOL. CHEM. 259: 8648-8654.

GRIFO, J.A., TAHARA, S.M., MORGAN, M.A., SHATKIN, A.J., MERRICK, W.C. (1983). NEW INITIATION FACTOR ACTIVITY REQUIRED FOR GLOBIN mRNA TRANSLATION. J. BIOL. CHEM.258: 5804-5810.

GROSSI DE Sa, M.F., STANDART, N., MARTINS DE Sa. C., AKHAYAT, O., HUESCA, M., & SCHERRER, K. (1988). THE POLY (A)-BINDING PROTEIN FACILITATES *IN VITRO* TRANSLATION OF POLY (A)-RICH mRNA. EUR. J. BIOCHEM. 176: 521-526.

GULYAS, K.D., DONAHUE, T.F (1992). SSL2, A SUPPRESSOR OF A STEM-LOOP MUTATION IN THE HIS4 LEADER ENCODES THE YEAST HOMOLOG OF HUMAN ERCC-3. CELL. 69: 1031-1042.

HANNING, E.M., CIGAN, A.M., FREEMAN, B.A., KINZY, T.G. (1993). GCD11, A NEGATIVE REGULATOR OF GCN4 EXPRESSION, ENCODES THE r-SUBUNIT OF eIF-2 IN ***Saccharomyces cerevisiae***. MOL. CELL. BIOL. 13: 506-520.

HAMMOND, M.L., MERRICK, W., BOWMAN, L.H. (1991). SEQUENCES MEDIATING THE TRANSLATION OF MOUSE S16 RIBODOMAL PROTEIN mRNA DURING MYOBLAST DIFFERENTIATION AND *IN VITRO* AND POSSIBLE CONTROL POINTS FOR THE IN *IN VITRO* TRANSLATION. GENES. DEV. 5: 1723-1736.

HARTWELL, L. (1967). MACROMOLECULE SYNTHESIS IN TEMPERATURE SENSITIVE MUTANS OF YEAST. J. BACTERIOL. 93: 1662-1670.

HAYASHI, Y., URADE, R., UTSUMI, S., & KITO, M. (1989). ANCHORING OF PEPTIDE ELONGATION FACTOR EF-1α BY PHOSPHATIDYL INOSITOL AT THE ENDOPLASMIE RETICULUM MEMBRANE. BIOCHEM. 106: 560-563.

HERRERA, F., CORREIA, H., TRIANA, L., & FRAILE, G. (1991). ASSOCIATION OF RIBOSOMAL SUBUNITS: A NEW FUNCTIONAL ROLE FOR YEAST EF-1α IN PROTEIN BIOSYNTHESIS. EUR. J. BIOCHEM. 200: 321-327.

HERRERA, F., FRANCOIS, F., ZAMBRANO, R., & ALVARADO, M. (1986). A ALTERED RIBOSOMAL PROTEIN IN AN EDEINE RESISTANT MUTANT OF ***Saccharomyces cerevisiae***. MOL. GEN. GENET. 202: 120-124.

HERRERA, F., MORENO, N., & MARTINEZ, J.A. (1984). EDEINE REISTENT mRNA-DEPENDENT PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM FROM A ***Saccharomyces cerevisiae*** MUTANT. FEBS. LETT. 174: 47-49.

HERRERA, F., MORENO, N., & MARTINEZ, J.A. INCREASED RIBOSOMAL AFFINITY FOR mRNA CAUSE RESISTANCE TO EDEINE A MUTANT OF ***Saccharomyces cerevisiae***. EUR. J. BIOCHEM. 145: 339-344 (1984).

HERRERA, F., TRIANA, L., & BOSCH, I. (1988). IMPORTANCE OF POLYSOMAL mRNA-ASSOCIATED POLYPEPTIDES FOR PROTEIN SYNTHESIS INITIATION IN YEAST. EUR. J. BIOCHEM. 175: 87-92.

HERSHEY, J.W.B. (1991). TRNSLATIONAL CONTROL IN MAMMALIAN CELLS. ANNU. REV. BIOCHEM. 60: 717-755.

HIREMATH, L.S., HIREMATH, S.T., RYCHLIK, W., JOSHI, S., DOMIER, L.L., RHOADS, R.E. (1989). *IN VITRO* SYNTHESIS PHOSPHORYLATION, AND LOCALIZATION ON 48s INITIATION COMPLEXES OF HUMAN PROTEIN SYNTHESIS INITIATION FACTOR 4E. J. BIOL. CHEM. 264: 1132-1138.

HIRSCH,C.A., COX, M.A., VAN VENROOIJ, W.J., & HENSHAW, E.C. (1973). THE RIBOSOME CYCLE IN MAMMALIAN PROTEIN SYNTHESIS. J. BIOL. CHEM. 248: 4377-4385.

HOWE, J.G., HERSHEY, S.W.B. (1984). TRANSLATIONAL INITIATION FACTOR AND RIBOSOME ASSOCIATION WITH THE CYTOSKELETAL FRAMEWORK FRACTION FROM He La CELLS. CELL. 37: 85-93.

HUTCHISON, J.S., FEIBERG, B., ROTHWELL, J.C., & MOLDAVE, K. (1984). MONOCLONAL ANTIBODY SPECIF FOR YEAST ELONGATION FACTOR 3. BIOCHEMISTRY. 23: 3055-3064.

ITANO, N., & HATANO, S. (1991). F-ACTIN BUNDLING PROTEIN FROM ***Physarum polycephalum***: PURIFICATION AND ITS CAPACITY FOR CO-BUNDLING OF ACTIN LILAMENTS AND MICROTUBULES. CELL. MOTIL. CYTOSKELETON. 19(4): 244-254.

JACOBSON, A., & MUNROE, D. (1990). mRNA POLY (A) TAIL, A 3' ENHANCER OF TRANSLATIONAL INITIATION. MOL. CELL. BIOL. 10: 4341-3455.

JANSSEN, G.M., MOLLER, W. (1988). ELONGATION FACTOR 1 BETA GAMMA FROM ARTEMIA. PURIFICATION AND PROPERTIES OF ITS SUBUNITS. EUR. J. BIOCHEM. 171(1-2): 119-129.

KACKSON, R.J. (1993). CYTOPLASMIC REGULATION OF mRNA FUNCTION THE IMPORTANCE OF THE 3' UNTRANSLATES REGION. CELL. 74: 9-14.

JOSHI, B., YAN, R., RHOADS, R.E. (1994). *IN VITRO* SYNTHESIS OF HUMAN PROTEIN SYNTHESIS INITIATION FACTOR eIF-4γ AND ITS LOCALIZATION ON 43S AND 48S INITIATION COMPLEXES. J. BIOL. CHEM. 269: 2048-2055.

KAMINSKI, A., HUNT, S.L., GIBBS, C.L., JACKSON, R.J. (1994). INTERNAL INITIATION OF mRNA TRANSLATION IN EUKARYOTES. IN. GENETIC ENGINEERING. PRINCIPLES AND METHODS. (SETLOW J.ED) PLENUM PRESS. NEW YORK. VOL. 16: 115-155.

KAUFMAN, R.J., MURTHA-RIEL P., PITTMAN, D.D., DAVIES, M.V. (1993). CHARACTERIZATION OF WILD-TYPE AND SER^{53}MUTANT EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E OVEREXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS. J. BIOL. CHEM. 268: 11902-11909.

KENNEDY, M.C., MENDE-MUELLER, L., BLONDIN, G.A., BEINERT, H. (1992). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC ACONITASE FROM BEEF LIVER AND ITS RELATIONSHIP TO THE IRON-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 89: 11730-11734.

KICK, D., BARRETT, P., CUMMING. A., & SOMERVILLA, T. (1987). PHOSPHORYLATION OF A 60 KDa POLYPEPTIDE FROM XENOPUS OOCYTES BLOCKS MESSENGER RNA TRANSLATION. NUCLEIC. ACIDS. RES. 15: 4099-4109.

KIMBALL, S.R., ANTONETTI, D.A., BRAWLEY, R.M., JEFFERSON, L.S. (1991). MECHANISM OF INHIBITION OF PEPTIDE CHAIN INITIATION BY AMINO ACID DEPRIVATION IN PERFUSED RAT LIVER: REGULATION INVOLVING INHIBITION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 2α PHOSPHAEUKARYOTIC INITIATION FACTOR 2α PHOSPHATASE ACTIVITY. J. BIOL. CHEM. 266: 1969-1976.

KLAUSNER, R.D., ROUAULT, T.A., HARFORD, J.B. (1993). REGULATING THE FATE OF mRNA: THE CONTROL OF CELLULAR IRON METABOLISM. CELL. 72: 19-28.

KOBAYASHI, M., HIARA, N., & MATSUDA, K. (1985). ISOLATION OF ENZYMES FROM POLY ACRYLAMIDE DISC GELS BY A CENTRIFUGAL HOMOGENIZATION METHOD. ANALYTICAL BIOCHEM. 145: 351-353.

KONECKI, D.S., AUNE, K.C., TATE, W., & CASKEY, C.J. (1977). CHARACTERIZATION OF RETICULOCYTE RELEASE FACTOR. J. BIOL. CHEM. 252: 4514-4520.

KOZAK, M. (1989). THE SCANING FOR TRANSLATION: AN UPDATE. J. CELL. BIOL. 108: 229-249.

KROWCZYNSKA, A., YENOFSKY, R., AND BRAWERMAN, G. (1985). REGULATION OF MESSENGER RNA STABILITY IN MOUSE ERYTHROLEUKEMIA CELLS. J. MOL. BIOL. 181: 231-239.

KRYSTOSEK, A., CAWTHON, M.L., & KABAT, D. (1975). IMPROVED METHODS FOR PURIFICATION AND ASSAY OF EUKARYOTIC MESSENGER RIBONUCLEIC ACIDS AND RIBOMES J. BIOL. CHEM. 250: 6077-6084.

KURIYAMA, R., BORIS, G.G. (1985). IDENTIFICATION OF MOLECULAR COMPONENTS OF THE CENTROSPHERE IN THE MITOTIC SPINDLE OF SEA URCHIN EGGS. J. CELL. BIOL. 101(2): 524-530.

KWON, Y.K., HECHT, N.B. (1993). BINDING OF A PHOSPHOPROTEIN TO THE 3' UNTRANSLATED REGION OF THE MOUSE PROTAMINE 2 mRNA TEMPORALLY REPRESSES IITS TRANSLATION. MOL. CELL. BIOL. 13: 6547-6557.

LAEMMLI, U.K. (1970). CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4. NATURE. 227: 680-685.

LAMPHEAR, B.J., PANNIERS, R. (1990). CAP BINDING PROTEIN COMPLEX THAT RESTORES PROTEIN SYNTHESIS IN HEAT-SHOCKED EHRLICH CELL LYSATES CONTAINS HIGHLY PHOSPHORYLATED eIF-4E. J. BIOL. CHEM. 265: 5333-5336.

LAZARIS-KARATZAS, A., MONTINE, K.S., SONENBERG, N. (1990). MALIGNANT TRANSFORMATION BY A EUKARYOTIC INITIATION FACTOR SUBUNIT THAT BINDS TO mRNA 5' CAP. NATURE. 354: 544-547.

LEJBKOWICZ, F., GOYER, C., DARVEAN, A., NERON, S., LEMIEUX, R., SONENBERG, N. (1992). A FRACTION OF THE mRNA 5' CAP-BINDING PROTEIN, EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E, LOCALIZES TO THE NUCLEUS. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 89: 9612-9616.

LIAUTARD, J.P. (1977). PROTEIN OF THE POLYSOMAL MESSENGER RIBONUCLEOPROTEIN ARE RESPONSIBLE FOR ITS ASSOCIATION WITH THE 40S RIBOSOMAL SUBUNIT IN He La CELLS. BIOCHIM. BIOPHYS. ACT. 476: 238-252.

LIAUTARD, J.P., SETYONO, B., SPINDLER, E., & KOHLER, K. (1976). COMPARISON OF PROTEINS BOUND TO THE DIFFERENT FUNCTIONAL CLASSES OF MESSENGER RNA. BIOCHIM. BIOPHYS. ACT. 425: 373-383.

LIM, L. & CANELLAKIS, E.S. (1970). ADENINE-RICH POLYMER ASSOCIATED WITH RABBIT RETICULOCYTE MESSENGER RNA. NATURE. 227: 710-712.

LORENI, F., FRANCESCONI, A., AMALDI, F. (1993). COORDINATE TRANSLATIONAL REGULATION IN THE SYNTHESIS OF ELONGATION FACTOR 1α AND RIBOSOMAL PROTEINS IN ***Xenopus laevis***. NUCL. ACIDS. RES. 21: 4721-4725.

MARCHESI, V.T., NGO, N. (1993). *IN VITRO* ASSEMBLY OF MULTIPROTEIN COMPLEXES CONTAINING ALPHA, BETA, AND GAMMA TUBULIN, HEAT SHOCK PROTEIN HSP70, AND ELONGATION FACTOR 1 ALPHA. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 90(7): 3028-3032.

MATTAJ, I.W., COPPARD, N.J., BROWN, R.S., CLARK, B.F., DE ROBERTIS,E.M. (1987). 42S P48 THE MOST ABUNDANT PROTEIN IN PREVITELLOGENIC XENOPUS OOCYTES RESEMBLES ELONGATION FACTOR 1 ALPHA STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY. EMBO. J. 6(8): 2409-2413.

Mc GREW LL., DWORKIN-RASTL, E., DWORKIN, M.B., J.D. (1989). POLY (A) ELONGATION DURING XENOPUS OOCYTE MATURATION IS REQUIRED FOR TRANSLATIONAL RECRUITMENT AND IS MEDIATED BY A SHORT SEQUENCE ELEMENT. GENES. DEV. 3: 803-815.

MEEROVITCH, K., PELLETIER, J., SONENBERG, S. (1989). A CELLULAR PROTEINS THAT BINDS TO THE 5'-NONCODING REGION OF POLIOVIRUS mRNAs: IMPLICATIONS FOR INTERNAL INITIATION. GENES. DEV. 3: 1026-1034.

MELEFORS, O., HENTZE, M.W. (1993). TRANSLATIONAL REGULATION BY mRNA/PROTEIN INTERACTIONS IN EUKARYOTIC CELLS: FERRITIN AND BEYOND. BIO. ESSAYS. 15: 85-90.

MERCER, J.F., & WAKE, S.A. (1985). AN ANALYSIS OF THE RATE METALLOTHIONEIN POLY (A) SHORTENING USING RNA BLOT HYBRIDIZATION. NUCL. ACIDS. RES. 13: 7929-7943.

MERRILL, B.M., STONE, K.L., COBIANCHI, F., WILSON, S., & WILLIAMS, K.R. (1987). PHENYLALANINE RESIDUES THAT ARE CONSERVED AMONG SEVERAL RNA-BINDING PROTEINS FORM PART OF A NUCLEIC ACID-BINDING POCKET IN THE A1 hnRNP PROTEIN. J. BIOL. CHEM. 263: 3307-3313.

MILBURN, S.C., HERSHEY, J.W.B., DAVIES, M.V., KELLEHER, K., KAUFMAN, J. (1990). CLONING AND EXPRESSION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4B cDNA: SEQUENCE DETERMINATION IDENTIFIES A COMMON RNA RECOGNITION MOTIF. EMBO J. 9: 2783-2790.

MINICH, W.B., BALESTA, M.L., GOSS, D.J., RHOADS, R.E. (1994). CHROMATOGRAPHIE RESOLUTION OF *IN VITRO* PHOSPHORYLATED AND NONPHOSPHORYLATED TRANSLATION INITIATION OF INCREASED CAP AFFINITY OF THE PHOSPHORYLATED FORM. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 91: 7668-7672.

MINICH, W.B., KORNEYERA, N.L., BEREZIN, YuV, OVCHINNIKOV, L.P. (1989). A SPECIAL REPRESSOR/ACTIVATOR SYSTEM CONTROLS DISTRIBUTION OF mRNA

BETWEEN TRANSLATIONALLY ACTIVE AND INACTIVE mRNPs IN RABBIT RETICULOCYTES. FEBS. LETT. 258: 227-229.

MISETA, A., WOODLEY, CH., GREENBERG, J.R., & SLOBIN, L. (1991). J. BIOL.CHEM. MAMMALIAN SERYL-tRNA SYNTHETASE ASSOCIATES WITH mRNA *IN VITRO* AND HAS HOMOLOGY TO ELONGATION FACTOR. J. BIOL. CHEM. 266: 19158-19161.

MOORE, C.L., & SHARP, P.A. (1984). SITE-SPECIFIC POLYADENYLATION IN A CELL-FREE REACTION. CELL. 36: 581-591.

MORLEY, S.J., DEVER, T.E., ETCHISON, D., TRAUGH, J.A. (1991). PHOSPHORYLATION OF eIF-4F BY PROTEIN KINASE C OR MULTIPOTENTIAL S6 KINASE STIMULATES PROTEIN SYNTHESIIS AT INITIATION. J. BIOL. CHEM. 266: 4669-4672.

MURRAY, M.J., SCHILLER, D.L., FRANKE, W.W. (1992). SEQUENCE ANALYSIS OF CYTOPLASMIC mRNA-BINDING PROTEINS OF XENOPUS OOCYTES IDENTIFIES A FAMILY OF RNA-BINDING PROTEINS. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 89:11-15.

NIERHAUS, K.H. (1990). THE ALLOSTERIC THREE-SITES MODEL FOR THE RIBOSOMAL ELONGATION CYCLE: FEATURES AND FUTURE. BICHEMISTRY. 29: 4997-5008.

NUDEL, U., SOREQ, H., LITTAUER, U.Z., MARBAIX, G., HUEZ, G., LECIERQ, M., HUBERT, E., & CHANTRENNE, H. (1976). GLOBIN mRNA SPECIES CONTAINING POLY (A) SEGMENTS OF DIFFERENT LENGTHS: THEIR FUNCTIONAL STABILITY IN XENOPUS OOCYTES. EUR. J. BIOCHEM. 64: 115-121.

OVCHINNIKOV, L.P., SERIAKOVA, J.A., ALZHANOVA, A.T., & RADZHABOV, H.M. (1978). A COMPARISON OF THE RNA-BINDING PROTEINS WITH THE PROTEINS OF POLYRIBOSOMAL MESSENGER RIBONUCLEOPROTEINS IN RABBIT RETICULOCYTES. EUR J. BIOCHEM. 97: 527-537.

OVCHINNIKOV, L.P., & SPIRIN, A.S. (1978). RNA-BINDING PROTEINS OF RABBIT RETICULOCYTES CONTAIN THE TWO ELONGATION FACTORS AND SOME OF THE INITIATION FACTORS OF TRANSLATION. FEBS. LETT. 88: 21-26.

OCHOA, S. (1983). REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS INITIATION IN EUKARYOTES. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 223: 325-349.

OLDFIELD, S., PROUD, C.G. (1992). PURIFICATION, PHOSPHORYLATION AND CONTROL OF THE GUANINE-NUCLEOTIDE-EXCHANGE FACTOR FROM RABBIT RETICULOCYTE LYSATES. EUR. J. BIOCHEM. 208: 73-81.

OSTARECK-LEDERER, A., OSTARECK, D.H., STANDART, N., THIELE, B.J. (1994). TRANSLATION OF 15-LIPOXYGENASE mRNA IS CONTROLLED BY A SEQUENCE IN THE 3' UNTRANSLATED REGION. EMBO. J. 13: 1476-1481.

OUCHTERLONY, O. (1954). IN IMMUNOLOGICAL METHODS. AKERYOD, J.F., EDITOR, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD. pp 55-58.

PARIS, J., SWENSON, K., PIWNICA-WORMS, H., RICHTER, J.D. (1991). MATURATION-SPECIFIC POLYADENYLATION: *IN VITRO* ACTIVATION BY $p34^{cdc2}$ AND

PHOSPHORYLATION OF A 58-KDa CPE-BINDING PROTEIN. GENES.DEV. 5: 1697-1708.

PAUSE, A., METHOT, N., SVITKIN, Y., MERRICK, W.C., SONENBERG, N. (1994). DOMINANT NEGATIVE MUTANTS OF MAMMALIAN TRANSLATION INITIATION FACTOR eIF-4A DEFINE A CRITICAL ROLE FOR eIF-4F IN CAP-DEPENDENT AND CAP-INDEPENDENT TRANSLATION. EMBO.J. 13: 1205-1215.

PAUSE, A., SONENBERG, N. (1992). MUTATIONAL ANALYSIS OF A DEAD BOX RNA HELICASE THE MAMMALIAN TRANSLATION INITIATION FACTOR eIF-4A. EMBO.J. 11: 2643-2654.

PELLETIER, J., SONENBERG, N. (1985). PHOTOCHEMICAL CROSS-LINKING OF mRNAs: EFFECT OF mRNA 5' SECUNDARY STRUCTURE. MOL. CELL. BIOL. 5: 3222-3230.

PESTOVA, T., SHATSKY, I., & CHRISTOPHER, U.T.H. (1996). FUNCTIONAL DISSECTION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4F: THE 4A SUBUNIT AND THE CENTRAL DOMAIN OF THE 4G SUBUNIT ARE SUFFICIENT TO MEDIATE INTERNAL ENTRY OF 43S PREINITIATION COMPLEXES. MOL. CELL. BIOL. 16(12): 6870-6878.

PRICE, N., PROUD, C. (1994). THE GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR, eIF-2B. BIOCHIMIE. 76: 748-760.

RAY, B.K., CHAKRABORTY, A., DATTA, B., CHAHOPDHYAY, A., SAHA, D., BOSE, A., KINZY, T.G., Wu S. HILEMAN, R.E., MERRICK, W.C., GUPTA, N.K. (1993). CHARACTERIRISTICS OF THE EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 2 ASSOCIATED 67-KDa POLYPEPTIDE. BIOCHEMISTRY. 32: 5151-5159.

RAY, B.K., LAWSON, T.G., KRAMER, J.C., CLADARAS, M.H., GRIFO, J.A., ABRAMSON, R.D., MERRICK, W.C., THACH, R.E. (1985). ATP-DEPENDENT UNWINDING OF MESSENGER RNA STRUCTURE BY EUKARYOTIC INITIATION FACTORS. J. BIOL. CHEM. 260: 7651-7658.

RHEINBERGER, H. (1991). THE FUNCTION OF THE TRANSLATING RIBOSOME: ALLOSTERIC THREE-SITE MODEL OF ELONGATION. BIOCHIMIE. 73: 1067-1088.

RHOADS, R.E., JOSHI-BARVE, S., RINKER-SCHAEFFER, C. (1991). MECHANISM OF ACTION AND REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS INITIATION FACTOR 4E: EFFECTS ON mRNA DISCRIMINATION, CELLULAR GROWTH RATE, AND ONCOGENESIS. PROC. NUCLEIC. ACID. RES MOL BIOL. 46: 183-219.

RHOADS, R.E., (1993). REGULATION OF EUKARYOTIC PROTEIN SYNTHESIS BY INITIATION FACTORS. J. BIOL. CHEM. 266: 3017-3020.

RICHTER, J., & SMITH, L.D. (1981). DIFFEREN TIAL CAPACITY FOR TRANSLATION AND LACK OF COMPETITION BETWEEN mRNAs THAT SEGREGATE TO FREE AND MEMBRANE-BOUND POLYSOMES. CELL. 27: 183-191.

RICHTER, J., & SMITH, L.D. (1984). REVERSIBLE INHIBITION OF TRANSLATION BY XENOPUS OOCYTE-SPECIFIC PROTEINS. NATURE. 309: 378-380.

ROWLANDS, A.G., PANNIERS, R., HENSHAW, E.C. (1988). THE CATALYTIC MECHANISM OF GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR ACTION AND COMPETITIVE

INHIBITION BY PHOSPHORYLATED EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 2. J. BIOL. CHEM. 263: 5526-5533.

RUSSELL, D.W., & SPERMULLI, L.L. (1980). MECHANISM OF ACTION OF THE WHEAT GERM RIBOSOME DISOCIATION FACTOR: INTERACTION WITH THE 60S SUBUNIT. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 201: 518-526.

RYCHLIK, W., RUSS, M.A., RHOADS, R.E. (1987). PHOSPHORYLATION SITE OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E. J. BIOL. CHEM. 262: 10434-10437.

RYCHLIK, W., RUSH, M.A., RHOADS, R.E., WAECHTER, C.J. (1990). INCREASED RATE OF PHOSPHORYLATION-DEPHOSPHORYLATION OF THE TRANSLATIONAL INITIATION FACTOR eIF-4E CORRELATES WITH THE INDUCTION OF PROTEIN AND GLYCOPROTEIN BIOSYNTHESIS IN ACTIVATED B. LYMPHOCYTES. J.BIOL.CHEM. 265: 19467-19471.

SACHS, A.B., BOND, M.W., & KORNBERG, R.D. (1986). A SINGLE GENE FROM YEAST FOR BOTH NUCLEAR AND CYTOPLASMIE POLYADENYLATE-BINDING PROTEINS: DOMAIN STRUCTURE AND EXPRESSION. CELL. 45: 827-835.

SACHS, A.B., & DAVIS, R.W. (1989). THE POLY (A) BINDING PROTEIN IS REQUIRED FOR POLY (A) SHORTENING AND 60S RIBOSOMAL SUBUNIT-DEPENDENT TRANSLATION INITIATION. CELL. 58: 857-867.

SACHS, A.B., & DEARDORFF, J.A. (1992). TRANSLATION INITIATION REQUIRES THE PAB-DEPENDENT POLY (A) RIBONUCLEASE IN YEAST. CELL. 70: 961-973.

SACHS, A.B., DAVIS, R.W., & KORNBERG, R. (1987). A SINGLE DOMAIN OF YEAST POLY (A)-BINDING PROTEIN IS NECESSARY AND SUFFICIENT FOR RNA BINDING AND CELL VIABILITY. MOL. CELL. BIOL. 7: 3268-3276.

SAFER, B., ADAMS, S.L., ANDERSON, W.I., & MERRICK, W.C. (1975). BINDING OF MET-tRNAF AND GTP TO HOMOGENEOUS INITIATION FACTOR MP. J. BIOL. CHEM. 250: 9076-9082.

SALVADOR, Z., TARUN, Jr., & SACHS, A. (1996). ASSOCIATION OF THE YEAST POLY (A) TAIL BINDING PROTEIN WITH TRANSLATION INITIATION FACTOR eIF-4G. EMBO. J. 15(24): 7168-7177.

SCHOCHETMAN, G., & PERRY, R. (1972). CHARACTERIZATION OF THE MESSENGER RNA RELEASED FROM L CELLS POLYRIBOSOMES AS A RESULT OF TEMPERATURE SHOCK. J. MOL. BIOL. 63: 577-590.

SCHÄFER, M., KUHN, R., BOSSE, F., SCHÄFER, U. (1990). A CONSERVED ELEMENT IN THE LEADER MEDIATES POST-MEIOTIC TRANSLATION AS WELL AS CYTOPLASMIC POLYADENYLATION OF A DROSOPHILA SPERMATOCYTE mRNA. EMBO. J. 9: 4519-4525.

SCHAGGER, H., & VON JAGOW, G. (1987). TRICINE SODIUM DODECYL SULFATE-PLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS FOR THE SEPARATION OF PROTEINS IN THE RANGE FROM 1 TO 100 KDa. ANALYTICAL BIOCHEM. 166: 368-379.

SEAL, S.N., SCHMIDT, A., & MARCUS, A. (1983). FRACTIONATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM OF WHEAT GERM. I. RESOLUTION OF TWO ELONGATION FACTORS AND FIVE INITIATION FACTORS. J. BIOL.CHEM. 258: 859-865.

SEHGAL, P.B., SOREQ, H., & TAMM, I. (1978). DOES 3' TERMINAL POLY (A) STABILIZE HUMAN FIBROBLAST INTERFERON mRNA IN OOCYTES ***Xenopus laevis***?. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 75: 5030-5033.

SIMON, R., TASSAN, J-P., RICHTER, J.D. (1992). TRANSLATIONAL CONTROL BY POLY (A) ELONGATION DURING XENOPUS DEVELOPMENT: DIFFERENTIAL REPRESSION AND ENHANCEMENT BY A NOVEL CYTOPLASMIC POLYADENYLATION ELEMENT. GENES DEV. 6: 2580-2591.

SKOGERSON, L., & MOLDAVE, K. (1968). EVIDENCE FOR AMINOACYL-tRNA BINDING, PEPTIDE BOND SYNTHESIS AND TRANSLOCASE ACTIVITIES IN THE AMINOACYLTRANSFER REACTION. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 125: 497-505.

SKOGERSON, L. (1979). SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF YEAST ELONGATION FACTORS. IN METHODS IN ENZYMOLOGIA.. EDITED BY K. MOLDAVE, & L. GROSSMAN. EDS. ACADEMIC PRESS. N.Y. VOL. 60: 676-685.

SLOBIN, L.I., & MOLLER, W. (1976). CHARACTERIZATION OF DEVELOPMENTALLY REGULATED FORMS OF ELONGATION FACTOR 1 IN AETEMIA SALINA: PURIFICATION AND STRUCTURAL PROPERTIES OF THE ENZYME. EUR. J. BIOCHEM. 69: 351-366.

SLOBIN, L.I., & GREENBERG, J.R. (1988). PURIFICATION AND PROPERTIES OF A PROTEIN COMPONENT OF MESSENGER RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLES THAT SHARES A COMMON EPITOPE WITH EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR Tu. EUR. J. BIOCHEM. 173: 305-310.

SOMMERVILLE, J. (1996). TRANSCRIPTION AND MASKING OF mRNA INGERM CELLS: INVOLVEMENT OF Y-BOX PROTEINS. CHROMOSOMA. 104: 469-478.

SONENBERG, N., RUPPRECHT, K.M., HECHT, S.M., SHATKIN, A.J. (1979). EUKARYOTIC mRNA CAP BINDING PROTEIN: PURIFICATION BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON SEPHAROSE- m^7GDP. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 76: 4345-4349.

SPIRIN, A.S. (1966). ON "MASKED" FORMS OF MESSENGER RNAA IN EARLY EMBRYOGENESIS AND IN OTHER DIFFERENTIATING SYSTEMS. CURR. TOP. DEV. BIOL. 1: 1-38.

SPOHR, G., GRAMBOULAN, N., MOREL, C., & SCHERRER, K. (1970). AN INVESTIGATION OF FREE AND POLYRIBOSOME BOUND CYTOPLASMIC RIBONUCLEO-PROTEIN PARTICLES BY KINETIC LABELLING AND ELECTRON MICROSCOPY. EUR. J. BIOCHEM. 17: 296-318.

STANDART, N. (1992). MASKING AND UNMASKING OF MATERNAL mRNA. SEMIN. DEV. BIOL. 3: 367-379.

SWATANTRA, K., MALCOLM, J., PLUSKAL, G., & SATYAPRIYA, S. (1979). THERMAL CHROMATOGRAPHY OF EUKARIOTIC MESSENGER RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLES ON OLIGO (dT)-CELULOSE. FEBS. LETT. 97: 84-90.

TAFURI, Y. (1993). SELECTIVE RECRUITMENT OF MASKED MATERNAL mRNA FROM MESSENGER RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLES CONTAINING FRGY2 (mRNP4). J.BIOL.CHEM. 268: 2455-2461.

TAHARA, S.M., MORGAN, M.A., SHATKIN, A.J. (1981). TWO FORMS OF PURIFIED m^7G-CAP BINDING PROTEIN WITH DIFFERENT EFFECTS ON CAPPED mRNA TRANSLATION IN EXTRACTS OF UNINFECTED AND POLIOVIRUS-INFECTED He La CELLS. J. BIOL. CHEM. 256: 7691-7694.

THEODORAKIS, N.G., CLEVELAND, D.W. (1992). PHYSICAL EVIDENCE FOR COTRANSLATIONAL REGULATION OF BETA-TUBULIN mRNA DEGRADATION. MOL. CELL. BIOL. 12(2): 791-799.

THOMAS, N.S., & ARNSTEIN, H.R. (1984). FORMATION OF A 22S mRNA.rRNA.PROTEIN COMPLEX DURING TRANSLATION GLOBIN MESSENGER RNA. EUR. J. BIOCHEM. 107: 39-45.

THOMAS, A., GOUMANS, H., VOORMA, H., & BENNE, R. (1980). THE MECHANISM OF ACTION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4C IN PROTEIN SYNTHESIS. EUR. J. BIOCHEM. 107: 39-45.

THOMAS, A., GOUMANS, H., AMESZ, H., BENNE, R., VOORMA, H.O. (1979). A COMPARISON OF INITIATION FACTORS OF EUKARYOTIC PROTEIN SYNTHESIS FROM RIBOSOMES AND FROM THE POSTRIBOSOMAL SUPERNATANTS. EUR. J. BIOCHEM. 98: 329-337.

THOMPSON, H.A., SADNIK, I., SCHEINBUKS, J., & MOLDAVE, K. (1977). STUDIES ON NATIVE RIBOSOMAL SUBUNITS FROM RAT LIVER. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A RIBOSOME DISSOCIATION FACTOR. BIOCHEMISTRY. 16: 2221-2230.

TRACHSEL, H., & STAEHELIN, J. (1978). BINDING AND RELEASE OF EUKARIOTIC INITIATION FACTOR eIF-2 AND GTP DURING PROTEIN SYNTHESIS INITIATION. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 75: 204-208.

TRIANA, F., NIERHAUS, K., & CHAKRABURTTY, K. (1994). TRANSFER RNA BINDING TO 80S RIBOSOMES FROM YEAST: EVIDENCE FOR THREE SITES. BIOCHEM. MOL. BIOL. INTER. 33(5).

TRIANA-ALONSO, F.J., CHAKRABURTTY, K., AND NIERHAUS, K.H. (1995). THE ELONGATION FACTOR 3 UNIQUE IN HIGHER AND ESSENTIAL FOR PROTEIN BIOSYNTHESIS IS AN E SITE FACTOR.. J. BIOL. CHEM. 270: 20743-20748.

TUAZON, P.J., MERRICK, W.C., TRAUGH, J.A. (1989). COMPARATIVE ANALYSIS OF PHOSPHORYLATION OF TRANSLATION INITIATION AND ELONGATION FACTORS BY SEVEN PROTEIN KINASES. J. BIOL. CHEM. 264: 2773-2777.

URITANI, M., & MIYAZAKI, M. (1988). ROLE OF YEAST PEPTIDE ELONGATION FACTOR 3 (EF-3) AT THE aa-tRNA BINDING STEP. J. BIOCHEM. (TOKIO). 104: 118-126.

VAN-DAMME, H.T., AMONS, R., KARSSIES, R., TIMMERS, C.J., JANSSEN, G.M., MOLLER, W. (1990). ELONGATION FACTOR 1 BETA OF ARTEMIA: LOCALIZATION OF FUNCTIONAL SITES AND HOMOLOGY TO ELONGATION FACTOR 1 DELTA. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 1050(1-3): 241-247.

VASSALLI, J.D., HUARTE, J., BELIN, D., GUBLER, P., VASSALLI, A., O'CONNELL, M.L., PARTON, L.A., RICKLES, R.J. STRICKLAND, S. (1989). REGULATED POLYADENYLATION CONTROLS mRNA TRANSLATION DURING MEIOTIC MATURATION OF MOUSE OOCYTES. GENES. DEV. 3: 2163-2171.

WEBB, N.R., CHARI, R.V.J., DE PILLIS, G., KOZARICH, J.W., RHOADS, R.E. (1984). PURIFICATION OF THE MESSENGER RNA CAP-BINDING PROTEIN USING A NEW AFFINITY MEDIUM. BIOCHEMISTRY. 23: 177-181.

WICKENS, M., & STEPHESON, P. (1984). ROLE OF THE CONSERVED AAUAAA SEQUENCE: FOUR AAUAAA POINT MUTANTS PREVENT MESSENGER RNA 3' END FORMATION. SCIENCE. 226: 1045-1051.

WILSON, T., & TRIESMAN, R. (1988). REMOL OF POLY (A) AND CONSEQUENT DEGRADATION OF C-FOS mRNA FACILITATED BY 3' AU-RICH SEQUENCES. NATURE. 336: 396-399.

WOLFFE, A. (1994). STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE EVOLUTIONARY ANCIENT Y-BOX FAMILY OF NUCLEIC ACID BINDING PROTEINS. BIO. ESSAYS. 16: 245-251.

YANG, W., & BOSS, W.F. (1994). REGULATION OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-KINASE BY THE PROTEIN ACTIVATOR PIK-A49. ACTIVATION REQUIRES PHOSPHORYLATION OF PIK-A49. J. BIOL. CHEM. 269(5): 3852-3857.

YAN, R., RYCHLIK, W., ETCHISON, D., RHOADS, R.E. (1992). AMINO ACID SEQUENCE OF THE HUMAN PROTEIN SYNTHESIS INITIATION FACTOR eIF-4γ. J. BIOL. CHEM. 267: 23226-23231.

YODER-HILL, J., PAUSE, A., SONENBERG, N., MERRICK, W.C. (1993). THE p46 SUBUNIT OF eIF-4F EXCHANGES WITH eIF-4A. J. BIOL. CHEM. 268: 5566-5573.

Y-SVITKIN, Y., OVCHINNIKOV, L., DREYFUSS, G., SONENBERG, N. (1996). GENERAL BINDING PROTEINS RENDER TRANSLATION CAP DEPENDENT. EMBO. J. 15: 7147-7155.

ZEEVI, M., NEVINS, J.R., & DARNELL, J.E. (1982). NEWLY FORMED mRNA LACKING POLYADENYLIC ACID ENTERS THE CYTOPLASM AND THE POLYRIBOSOMES BUT IT HAS A SHORTES HALF-LIFE IN THE ABSENCE OF POLYADENYLIC ACID. MOL. CELL. BIOL. 2: 517-525.

ZELUS, B.D., GIEBELHAUS, D.H., EIB, D.W., KENNER, K.A., MOON, R.T. (1989). EXPRESSION OF THE POLY (A)-BINDING PROTEIN DURING DEVELOPMENT OF XENOPUS LAEVIS. MOL. CELL. BIOL. 9: 2756-2760.

ABREVIATURAS

9.0 ABREVIATURAS

ARNm	Acido ribonucleico mensajero.
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia.
ATP	Trifosfato de Adenosina.
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP.
AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclico.
cap	7-metilguanosina.
EDTA	Acido Etilendiaminotetracético.
EF	Factores de elongación en la traducción.
eIF	Factores de iniciación en la traducción.
FSBA	Fluorosulfonilbenzoiladenosina.
GDP	Difosfato de Guanosina.
GTP	Trifosfato de Guanosina.
HEPES	Acido N-2 hidroxietil-piperazina N'-2-etanosulfónico.
Met-ARNtf	Metionil-Acido ribonucleico de transferencia iniciador.
PABP	Proteína asociada a la cola de poli (A) en el ARNm.
Poli (A)	Cola de adeninas en la región 3' terminal del ARNm.
Poli (U)	Acido Poliuridinico.
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro.
RF	Factores de terminación en la traducción.
RNPm	Complejos de ácido ribonucleico mensajero y proteínas.
RNPm poli $(A)^+$	Complejos de ácido ribonucleico mensajero y proteínas purificados por columnas de oligo (dT)-celulosa.
RNPm poli $(A)^-$	Complejos de ácido ribonucleico mensajero y proteínas no retenidos en columnas de oligo (dT)-celulosa.
RNPmhn	Complejos de ácido ribonucleico mensajero y proteínas
	Sodiododecilsulfato.
SNIC	Suero no inmune de conejo.
SNIR	Suero no inmune de ratón.
Tris	Tris-hidroxi-metilamino-metano.
Temed	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamino.
50RNPm	Proteína de 50 KDa asociada al RNPm poli $(A)^+$.

TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1

EFECTO DE ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP SOBRE LA TRADUCCION DE RNPm POLI (A)$^+$ EN EL SISTEMA LIBRE DE CELULAS

	ACTIVIDAD TRADUCCIONAL DEL RNPm POLI (A)$^+$ (% SOBRE EL CONTROL)			
ug de Suero	anti-50RNPm	SNIR	anti-PABP	SNIC
0	100	100	100	100
4	63	98	77	102
8	47	81	52	93
12	35	89	39	86
16	29	75	30	89
20	25	72	25	97
24	27	80	20	85
28	24	73	24	88

El S-100' (111 μg de proteína) y el RNPm poli (A)$^+$ fueron incubados por 40 minutos a 25 °C con las cantidades indicadas de sueros (0-28 μg). Las mezclas de reacción fueron ajustadas a 50 μl bajo las condiciones descritas para la síntesis de proteínas en la parte experimental 4.2.7.

TABLA 2

EFECTO DE ANTI-50RNPm SOBRE LA TRADUCCION DE POLI (U) EN EL SISTEMA LIBRE DE CELULAS

	Traducción RNPm % sobre el control		Traducción poli (U) % sobre el control			
ug Suero	anti-EF-1β	SNIC	anti-EF-1β	SNIC	anti-50RNPm	SNIR
0	100	100	100	100	100	100
4	78	102	78	93	65	93
8	68	93	58	100	45	87
12	55	86	50	102	30	83
16	50	89	51	92	25	78
20	41	97	46	97	28	75
24	40	85	38	93	31	80
28	39	88	37	90	26	76

El S-100' (111 μg de proteínas) y el RNPm poli $(A)^+$ (7 μg) o poli (U) (4 μg) fueron incubados durante 40 minutos a 25 °C con las cantidades indicadas de los diferentes sueros (0-28 μg) según el procedimiento experimental 4.2.7. Luego se agregaron los componentes necesarios para la síntesis de proteínas (4.2.7.) o síntesis de poli (U) (4.2.8.).

FIGURA 1. DETECCION DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm. El RNPm polisomal, RNPm poli $(A)^+$ y RNPm poli $(A)^-$ fueron incubados con nucleasas (4.2.14.) para aislar las ^{125}I-proteínas asociadas. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y fueron visualizadas en una película Kodak según el procedimiento descrito en 4.2.14. Se obtuvo la densitometría de las autorradiografías en un densitómetro Laser LKB con integrador acoplado.**A)** 600 μg de ^{125}I RNPm polisomal. **B)** 600 μg de ^{125}I RNPm poli $(A)^-$. **C)** 4.4 μg de ^{125}I RNPm poli $(A)^+$. Los marcadores de peso molecular corresponden a: Fosforilasa b (94 KDa), Albumina de suero bovino (67 KDa), Ovalbumina (43 KDa), Anhidrasa Carbónica (30 KDa) e Inhibidor de Tripsina (20 KDa).

FIGURA 2. **PARTICIPACION DE ^{125}I 50RNPm EN LOS COMPLEJOS DE INICIACION.** El extracto libre de células (240 μg de proteína) fue incubado con 14 μg de ^{125}I RNPm poli (A)$^{+}$ en un volumen total de 100 μl, y bajo las condiciones descritas para los complejos de iniciación 48S **(A)** y 80S **(B)**. Los componentes de la reacción fueron separados a través de un gradiente de sacarosa (4.2.11.), y analizados con un sistema de monitoreo contínuo a 254 nm para determinar la absorbancia (—) y la radiactividad (- • -) en un contador de centelleo líquido. Las fracciones conte[illegible] complejos 48S y 80S fueron tratadas para aislar las proteínas marcadas como se des[illegible] procedimiento experimental (4.2.14.). Las proteínas fueron analizadas por electroforesis e[illegible] poliacrilamida-SDS (4.2.14.) y visualizadas por autorradiografía. Se obtuvieron las densitometrías de las autorradiografías en un densitómetro LKB con rayo laser e integrador acoplado. **C)** ^{125}I RNPm poli (A)$^{+}$..**D)** ^{125}I RNPm poli (A)$^{+}$ en el 48S. **E)** ^{125}I RNPm poli (A)$^{+}$ en el 80S. Los marcadores de peso molecular son equivalentes a los de la Figura 1.

FIGURA 3. **REACCION DE ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP CON LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm POLI (A)$^+$ Y CON EL SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS**. Las proteínas en el S-100' (100 μg) y los polipéptidos asociados al RNPm poli (A)$^+$ (60 μg), después de aplicar el tratamiento con nucleasas (4.2.14), se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, y posteriormente se transfirieron al papel PVDF (Millipore) (4.2.15). Los papeles fueron incubados con los diferentes sueros y ^{125}I-Proteína A como se expecifica en el procedimiento experimental (4.2.15.). Las diferentes bandas fueron visualizadas por autorradiografía.
Lineas 1y 2: RNPm poli (A)$^+$ y S-100' revelados con anti-50RNPm.
Lineas 3 y 4: RNPm poli (A)$^+$ y S-100' revelados con suero no inmune de ratón.
Lineas 5 y 6: RNPm poli (A)$^+$ y S-100' revelados con anti-PABP.
Lineas 7 y 8: RNPm poli (A)$^+$ y S-100' revelados con suero no inmune de conejo.
Línea a: S-100' teñido con Azul de Coomassie
Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Albúmina de suero bovino (66 KDa), Albúmina de huevo (45 KDa), Deshidrogenasa Gliceraldehido-3-fosfato (36 KDa), Anhidrasa Carbónica (29 KDa), Tripsinógeno (24 KDa), Inhibidor de Tripsina (20 KDa).

FIGURA 4. GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA INHIBICION DE LOS COMPLEJOS DE INICIACION POR ANTI-50RNPm Y ANTI-PABP. El S-100' (111 μg de proteína) y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ (7μg) fueron preincubados como se describe en el procedimiento experimental (4.2.7.) sin o con: anti-50RNPm (16 μg), suero no inmune de ratón (16 μg), anti-PABP (12 μg) y suero no inmune de conejo (12 μg). A las mezclas de preincubación se les agregó el resto de los componentes para formar el complejo de preiniciación 48S (A→E) (4.2.9.) o el complejo de iniciación 80S (F→K) (4.2.10.). Las muestras fueron analizadas a través de gradientes de sacarosa (4.2.11.), y a las diferentes fracciones se les determinó la absorbancia (—) y la ^{3}H radiactividad (-•-). **A y F**: Preincubación del S-100' y RNPm poli $(A)^{+}$ sin sueros. **B y H**: Con suero no inmune de ratón (16 μ g). **C y I**: Con anti-50 RNPm (16 μg). **D y J**: Con suero no inmune de conejo (12 μg). **E y K**: Con anti-PABP (12 μg).

FIGURA 5. INHIBICION DE LOS COMPLEJOS DE INICIACION POR ANTI-50RNPm. El S-100' (111 μg de proteína) y el ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ (7 μg) fueron preincubados como se especifica en el procedimiento experimental (4.2.7.) con diferentes cantidades de los sueros anti-50RNPm y suero normal de ratón (0-28 μg). Después de las preincubaciones se agregaron los diferentes componentes para formar el complejo de preiniciación 48S (A) (4.2.9.) y el complejo de iniciación 80S (B) (4.2.10.). Las mezclas de reacción fueron analizadas a través de gradientes de sacarosa (4.2.11.), determinandose la ^{3}H radiactividad en las fracciones correspondientes a los complejos 48S y 80S. El 100 % representa los complejos formados en las preincubaciones sin sueros con un total de cuentas aproximadas de 24500 c.p.m. para el complejo de preiniciación 48S y 10950 c.p.m. para el complejo 80S.(-♦-): Preincubación con suero no inmune de ratón. (-O-): Preincubación con suero anti-50RNPm.

FIGURA 6. EFECTO DE ANTI-PABP SOBRE LOS COMPLEJOS DE PREINICIACION 48S Y DE INICIACION 80S. Las condiciones del ensayo son las mismas de la Figura 5. Las preincubaciones del S-100' y del ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ se realizaron con diferentes cantidades de anti-PABP y suero normal de conejo (0-28 μg).

FIGURA 7. **REACCION DE EF-1α Y LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL RNPm POLI (A)$^+$ CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm.** La electroforesis y transferencia al papel PVDF de las proteínas en el S-100', los polipéptidos asociados al RNPm poli (A)$^+$ y el factor EF-1α purificado, fueron realizadas como se describió en la Figura 3.
Línea a: EF-1α (1.5 μg) teñido con Azul de Coomassie.
Lineas 1,2 y 3: EF-1α, S-100' y RNPm poli (A)$^+$ reaccionando con anti-EF-1α.
Línea 4: EF-1α reaccionando con anti-50RNPm.
Lineas 5,6 y 7: EF-1α, S-100' y RNPm poli (A)$^+$ reaccionando con suero normal de conejo.
Línea 8: EF-1α reaaccionando con suero normal de ratón.
Los marcadores de peso molecular son los mismos de la Figura 3.

FIGURA 8. **PROTEOLISIS DE EF-1α Y 50RNPm**. ^{125}I-EF-1α (1.9 μg, 5x10^6 c.p.m./μg), y 50RNPm (≈ 1.7 μg, 4.4x10^6 c.p.m./μg) fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS como se describe en la parte experimental (4.2.14.). Se ubicaron las proteínas en el gel por la autorradiografía, y se efectuó un corte del mismoen las zonas correspondientes. Los cortes de los geles con los polipéptidos fueron incubados con la proteasa Licina-C, y se colocaron en una segunda electroforesis como se explica en la parte experimental (4.2.16.). Los péptidos fueron detectados por autorradiografía, y se obtuvo la densitometría de las mismas en un densitometro LKB con rayo laser e integrador acoplado.

A) EF-1α (a) y 50RNPm (b).

B) EF-1α (a_1) y 50RNPm (b_1) incubados con Licina-C por 2.5 horas.

C) EF-1α (a_2) y 50RNPm (b_2) incubados con Licina-C por 7 horas.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Albúmina, de suero bovino (66 KDa), Albúmina de huevo (45 KDa), Anhidrasa Carbónica (31 KDa), Tripsinógeno (tratado con PMSF) (24 KDa), Inhibidor de Tripsina (19.8 KDa), lisozima (14.4 KDa), mioglobina tratada con CnBr (6.8 y 2.5 KDa).

FIGURA 9. INHIBICION DEL COMPLEJO DE INICIACION 80S POR ANTI-EF-1α. Las condiciones del ensayo son las mismas descritas en la Figura 5. Las preincubaciones del S-100' y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ se realizaron con diferentes cantidades de anti-EF-1α y suero normal de conejo (0-28 μg). (-♦-): Preincubación con el suero normal de conejo. (-O-): Preincubación con anti-EF-1α

FIGURA 10. RECUPERACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS POREF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm. Las diferentes cantidades de los sueros (20 μg de anti-EF-1α y de suero normal de conejo, 12 μg de anti-50RNPm y suero normal de ratón), fueron preincubadas con cantidades variables de EF-1α (0-1.2 μg), según se describe en la parte experimental (4.2.7.). Seguidamente se añadieron a esta preincubación el S-100' y el ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ para efectuar una segunda incubación (4.2.7.). Posteriormente se agregaron todos los componentes para el ensayo de síntesis de proteínas efectuandose una tercera incubación (4.2.7.). Las mezclas de reacción fueron precipitadas con TCA en caliente y filtradas en filtros de fibra de vidrio para el contaje de la radiactividad.

FIGURA 11. RECUPERACION DE LA SINTESIS DE POLIFENILALANINA POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm Y ANTI-EF-1α. El ensayo es el mismo descrito en la Figura 10, excepto que el mensajero natural ha sido reemplazado por poli (U), y las condiciones de reacción corresponden a la síntesis de polifenilalanina descrita en la parte experimental 4.2.8.

FIGURA 12. **RECUPERACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 80S POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-EF-1α Y ANTI-50RNPm**. Los pasos del ensayo son los mismos descritos en la Figura 10. La primera incubación con EF-1α y la segunda con el S-100' y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ fueron en las mismas condiciones. En la tercera incubación se agregó cicloheximida para bloquear el paso de elongación, y obtener el complejo de iniciación 80S (4.2.10.). Las mezclas de reacción fueron fraccionadas a través de gradientes de sacarosa y se determinó la radiactividad correspondiente al complejo de iniciación 80S (4.2.11.).

FIGURA 13. GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA RECUPERACIO COMPLEJO DE INICIACION 80S POR EF-1α EN SISTEMAS INHIBIDOS CON AN α Y ANTI-50RNPm. El ensayo es equivalente al descrito en la Figura 12. **A:** Preincubación del S-100 y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ sin sueros. **B**: Preincubación con anti-50RNPm (16 μg). **C**: Preincubación con anti-EF-1α (20 μg). **A'**: Preincubación del S-100' y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ sin sueros más 0.9 μg de EF-1 α. **B'**: Preincubación con anti-50RNPm más 0.9 μg de EF-1α. **C'**: Preincubación con anti-EF-1α más 0.9 μg de EF-1α.

FIGURA 14. RECUPERACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S POR EF-1 SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm. 12 μg de anti-50RNPm y suero normal de fueron preincubados con diferentes cantidades de EF-1α (0-1.2 μg) bajo las condiciones descritas en la parte experimental (4.2.7.). Seguidamente se añadieron a esta preincubación el S-100' y el ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ para realizar una segunda incubación (4.2.7.). Posteriormente se agregaron todos los componentes para la formación del complejo de preiniciación 48S (4.2.9.). El análisis del complejo se realizó por gradientes de sacarosa y luego se contó la radiactividad en esta zona (4.2.11.).

FIGURA 15.GRADIENTES DE SACAROSA SOBRE LA RECUPERACION DEL COMPLEJO DE PREINICIACION 48S EN SISTEMAS INHIBIDOS CON ANTI-50RNPm. Las condiciones del ensayo son las mismas descritas en la Figura 14. **A:** Preincubación del S-100' y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ sin sueros. **B:** Preincubación con suero normal de ratón (16 μg). **C:** Preincubación con anti-50RNPm (16 μg). **A':** Preincubación del S-100' y ^{3}H RNPm poli $(A)^{+}$ sin sueros más 0.9 μg de EF-1α. **B':** Preincubación con el suero normal de ratón más 0.9 μg de EF-1α. **C':** Preincubación con anti-50RNPm más 0.9 μg de EF-1α.