UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE QUIMICA
Y FARMACIA
CATEDRA DE BIOQUIMICA GENERAL

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE QUIMICA
FISIOLOGICA Y PATOLOGICA

BIOSINTESIS DE TIROTRICINA EN *BACILLUS BREVIS*

Tesis para optar al grado
de Licenciado en Bioquímica.

PROFESOR PATROCINANTE:
DR. MARCO PERRETTA P.

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS BASILIO R.

CARLOS JEREZ GUEVARA

1968

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE QUIMICA
Y FARMACIA
CATEDRA DE BIOQUIMICA GENERAL

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE QUIMICA
FISIOLOGICA Y PATOLOGICA

BIOSINTESIS DE TIROTRICINA EN *BACILLUS BREVIS*

Tesis para optar al grado
de Licenciado en Bioquímica.

PROFESOR PATROCINANTE:
DR. MARCO PERRETTA P.

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS BASILIO R.

CARLOS JEREZ GUEVARA

1968

Jerez, C., "BIOSINTESIS DE TIROTRICINA" (Tyrothricina Biosynthesis)

C. Jerez, R. Cavieres y C. Baez

INTRODUCCION

Las gramicidinas y las tirocidinas son antibióticos producidos específicamente por el Bacillus brevis, que se agrupan bajo el nombre de [illegible]. Las primeras son polipéptidos lineales formados por 13 a 17 aminoácidos con excepción de la gramicidina S que tiene 10 y es cíclica. Las segundas están formadas por 10 aminoácidos y todas son de naturaleza cíclica. Ambos tipos de compuestos contienen aminoácidos que no se encuentran en el resto de las proteínas como la L-ornitina, D-fenilalanina, D-triptofano, D-leucina y D-valina (1).

La dilucidación de la biosíntesis de estos péptidos, especialmente la de la gramicidina S, ha despertado el interés de varios grupos de investigadores (2-6), quienes han publicado resultados contradictorios. Los experimentos de Winnick y col. (7) ~~han publicado experimentos que~~ indicarían que las gramicidinas y tirocidinas se sintetizarían de acuerdo al esquema general de biosíntesis de las proteínas. Estos autores han aislado y caracterizado un RNA* mensajero específico para la gramicidina S, el cual en capas de ~~[illegible]~~ su síntesis de [illegible] en un sistema subcelular (8). Los resultados de Leland y col. y Otani y col. difieren fundamentalmente de los de Winnick. Su interpretación favorece la idea de que la síntesis de la gramicidina S se haría por un sistema enzimático soluble sin la participación de ribosomas, RNA mensajero ni sRNA.

A MIS PADRES

A MI ESPOSA

A MIS HIJOS

Abreviaturas

* RNA, ácido ribonucleico; sRNA, RNA de transferencia; D O, densidad óptica; ATP, adenosintrifosfato; TCA, ácido tricloroacético; PPO, 2,5 difenilexazol; POPOP, 1,4 bis 2(5-fenilexazolil)-benceno; S-30, sobrenadante que se obtiene al centrifugar los homogenizados a 30.000 g por 30 minutos; ATCC, American Type Culture Collection; Tris, tri(hidroximetil)aminometano; [illegible]
Dietilaminoetilcellulosa

"BIOSINTESIS DE TIROTRICINA" (Tyrothricine Biosynthesis)

C. Jerez, R. Cavides y E. Basilio
Instituto de Química y Patología Médica, Facultad de Medicina y Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INTRODUCCION

Las gramicidinas y las tirocidinas son antibióticos producidos específicamente por el Bacillus brevis (que se agrupan bajo el nombre de tirotricina). Las primeras son polipéptidos lineales formados por 15 a 17 aminoácidos con excepción de la gramicidina S que tiene 10 y es cíclica. Las segundas están formadas por 10 aminoácidos y todas son de naturaleza cíclica. Ambos tipos de compuestos contienen aminoácidos que no se encuentran en el resto de las proteínas como la L-ornitina, D-fenilalanina, D-triptofano, D-leucina y D-valina (1).

La dilucidación de la biosíntesis de estos péptidos, especialmente la de la gramicidina S, ha despertado el interés de varios grupos de investigadores (2-6), quienes han publicado resultados contradictorios. Los experimentos de Winnick y col. (7) han obtenido experimentos que indicarían que las gramicidinas y tirocidinas se sintetizan de acuerdo al esquema general de biosíntesis de las proteínas. Estos autores han aislado y caracterizado un RNA* mensajero específico para la gramicidina S, el cual es capaz de promover su síntesis en un sistema subcelular (8). Los resultados de Laland y col. y Otani y col. difieren fundamentalmente de los de Winnick. Su interpretación favorece la idea de que la síntesis de la gramicidina S se haría por un sistema enzimático soluble sin la participación de ribosomas, RNA mensajero ni sRNA.

Abreviaturas

* RNA, ácido ribonucleico; sRNA, RNA de transferencia; D O, densidad óptica; ATP, adenosintrifosfato; TCA, ácido tricloroacético; PPO, 2,5 difeniloxasol; POPOP, 1,4 bis 2(5-feniloxasolil)-benceno; S-30, sobrenadante que se obtiene al centrifugar los homogenizados a 30.000 g por 30 minutos; ATCC, American Type Culture Collection; Tris, tri(hidroximetil)aminometano; DEAE-celulosa, Dietilaminoetilcelulosa.

En una publicación reciente (9) el grupo de Winnick se ha retractado de sus resultados y presenta nuevos experimentos que estarían más de acuerdo con los del grupo de Laland y Otani.

Todos los autores que han trabajado en síntesis in vitro de gramicidina S han empleado el mutante de Bacillus brevis ATCC 9999 aislado por primera vez por Gause y Brashnikova (10) el cual produce específicamente gramicidina S.

En este trabajo se presentan experimentos sobre biosíntesis in vivo e in vitro de tirotricina, que es una mezcla de gramicidinas y tirocidinas producida por el Bacillus brevis ATCC 8185 aislado por Dubos (11). Esta cepa no produce gramicidina S.

MATERIAL

Bacillus brevis cepa ATCC 8185.

La fuente y la actividad específica de los aminoácidos C^{14} son las siguientes: New England Nuclear Corporation, Massachusetts, U. S.A., valina, 210; ornitina, 172, fenilalanina, 356. Ribonucleasa y creatinaquinasa cristalinas de Worthington Biochemical Corporation, New Jersey. Fosfocreatina de General Biochemicals, Ohio. Tirotricina, tirocidina, gramicidina, aminoácidos-C^{12} y 2-mercaptoetanol de Mann Research Laboratories Inc., New York. ATP de Sigma Chemical Company, Saint Louis. Bactotriptona y extracto de levadura de Difco Laboratories, Michigan. n-Butanol, 2-propanol, piridina, alcohol isoamílico, p-dimetilaminobenzaldehido de Matheson Coleman and Bell, Ohio. Sephadex-G25, Pharmacia Fine Chemicals Uppsala.

METODOS

Cultivos. La mayor parte de los cultivos de Bacillus brevis se realizaron en medio enriquecido que contenía por litro bactotriptona 10 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 10 g y una mezcla de minerales de acuerdo con Okuda y col. (12). Los frascos inoculados se

agitaron a 37° en un agitador automático New Brunswick hasta alcanzar la D O deseada, la cual se determinó en el fotocolorímetro Klett-Summerson utilizando el filtro 660. Como inoculum se usó esporas obtenidas de cultivos estacionarios de más de siete días. Las esporas se controlaron por observación microscópica después de ser teñidas por el método de von Wirtz (13). Su concentración se determinó directamente en una cámara de conteo. La cantidad de inoculum empleada se ajustó para que en el medio inoculado las esporas quedaran a una concentración de 5×10^5 por ml.

La recolección de la bacteria se hizo por centrifugación a 7000 rpm durante 20 min. en una centrífuga refrigerada Sorvall con rotor GSA. Las células sedimentadas se lavaron dos veces con una solución de $MgCl_2$ 0,05 M ajustada a pH 7,5, y se utilizaron inmediatamente para preparar los extractos subcelulares.

Extracción de la tirotricina de cultivos de Bacillus brevis.

La tirotricina de los cultivos se extrajo de acuerdo al método descrito por Okuda (12) que se basa en la alta solubilidad que tiene el péptido en etanol y en su insolubilidad en soluciones salinas. Para esto, los cultivos se ajustaron a pH 4,5 con HCl 1 N y se calentaron a 60°C durante 5 minutos. Luego se agregó 25 ml de una solución de etanol en HCl 0,02 N por cada 100 ml de medio de cultivo y se dejó extrayendo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente la suspensión se centrifugó a 15.000 g durante 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante etanólico que contenía la tirotricina. Esta se purificó evaporando el extracto etanólico a un mínimo volumen, precipitándola con 10 volúmenes de NaCl al 2% frío y redisolviéndola en un volumen mínimo de la solución de etanol-HCl. Esta operación se repitió dos veces y finalmente la tirotricina se disolvió en etanol de 95° (habitualmente 2 ml) descartándose el residuo insoluble por centrifugación. Un litro de medio de cultivo de D O 0,5 produjo entre 300 y 400 mg de tirotricina.

Preparación de extractos subcelulares

Todas las operaciones se realizaron a 4°. Las células lavadas se resuspendieron en 4 volúmenes de una solución de $MgCl_2$ 0,005 M que contenía 2-mercaptoetanol 0,001 M ajustada a pH 7,5 (solución homogeneizadora) y se las sometió a vibración ultrasónica en un sonicador Raytheon de 10 Kciclos durante dos minutos. El homogeneizado resultante se centrifugó a 3.000 x g en una centrífuga refrigerada para remover células intactas y membranas y el sobrenadante se recentrifugó a 30.000 g durante 30minutos. El nuevo sobrenadante constituyó el S-30 que se utilizó en todos los experimentos de síntesis in vitro. La purificación parcial del S-30 aparece descrita en las tablas pertinentes.

Inertar aviso 1

Mezcla de incubación para síntesis de tirotricina in vitro

Las mezclas de incubación contenían, en µmoles por ml, los siguientes componentes (a menos que se especifique de otra manera): Amortiguador Tris-HCl pH 7,5, 100; KCl, 5; $Mg(COOCH_3)_2$, 25; ATP, 2,5; fosfocreatina, 2,5; creatinaquinasa, 20 µg; 2-mercaptoetanol, 6; aminoácido-C^{14}, 1.0 µC; extracto bacteriano, 4-5 mg de proteína. Esta mezcla se incubó habitualmente durante 60 minutos a 37° con agitación suave en un baño termo-regulado New Brunswick. La reacción se detuvo agregando 20 µmoles del aminoácido-C^{12} correspondiente y 5 ml de etanol absoluto que contenía 0,2 mg de tirotricina comercial por ml. Se dejó extrayendo toda la noche y luego se centrifugó a 5.000 x g durante 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante etanólico con la tirotricina y un sedimento que contiene las proteínas totales. El primero se evaporó con una corriente de aire hasta un volumen de 0.5 a 1 ml y se precipitó en frío con TCA al 10%. Se lavó dos veces con TCA y se redisolvió en 2 ml de etanol de 95°. El sedimento que contenía las proteínas totales se lavó dos veces con TCA al 10% y se redisolvió en 2 ml de NH_4OH 1,5 M. La radiactividad presente en la tiro-

tricina y en las proteínas totales se midieron en alícuotas apropiadas.

La identificación de la tirotricina radioactiva presente en los extractos etanólicos se realizó por cromatografía en papel con tres sistemas diferentes y por electroforesis en el mismo material (Ver figura 2 del Anexo).

Medición de la radioactividad

La radioactividad de las soluciones de tirotricina y proteínas provenientes de cultivos o de síntesis in vitro se midió en planchetas utilizando un contador de flujo continuo Nuclear Chicago con un background de 1 cpm o un contador de la misma marca con un background de 25 cpm, ambos con una eficiencia de 40% para C^{14}. Las muestras presentes en cromatogramas y electroforetogramas en papel se cortaron en trozos apropiados y se incluyeron directamente en una solución centelleante y su radioactividad se midió en un contador de centelleo Nuclear Chicago con un background de 30 cpm y una eficiencia de 90% para C^{14}. La solución centelleante contenía en 500 ml de tolueno 4 gramos de PPO y 50 mg de POPOP (fórmula equivalente a la del Liquifluor de Nuclear Chicago).

Determinaciones colorimétricas

La determinación colorimétrica de la tirotricina se hizo por el método de Mach (14) y la de las proteínas, por el método de Lowry (15).

Cromatografía en papel (Whatman Nº 1)

La composición de los sistemas cromatográficos empleados y los Rf de las tirocidinas y gramicidinas en cromatografía ascendente con los siguientes. Sistema 1: Ciclohexano-isopropanol-agua (2:2:1) tirocidinas 0,08; gramicidinas 0,94. Sistema 2: n-butanol, ácido acético-agua (50:11:25), tirocidinas 0,91, gramicidinas 0,94. Sistema

3: piridina-alcohol isoamílico-agua (3:3:2), tirocidinas 0,84, gramicidinas 0,95. Las gramicidinas se revelaron con HNO_3 7N y las tirocidinas con azul de bromofenol.

Electroforesis en papel (Whatman N° 1)

→ Todas las electroforetogramas se hicieron en papel Whatman N°1

Se utilizó como solución conductora una mezcla de metanol, ácido acético y agua en la proporción 3:3:1. La fuente de poder fue un aparato construido en el Instituto de Química Fisiológica y Patológica. Operando a 40 Vxcm durante 6 horas, las tirocidinas y gramicidinas migran hacia el cátodo alrededor de 18 cm y 4,5 respectivamente. El revelado se hizo en la forma descrita en cromatografía.

RESULTADOS

Síntesis de tirotricina in vivo

a) Determinación de tirotricina en un cultivo de Bacillus brevis en diferentes estados de desarrollo.

Con el objeto de conocer el curso de la síntesis de tirotricina en un cultivo en desarrollo y poder determinar así el período de mayor producción de los antibióticos, éstos se extrajeron de alícuotas de un mismo frasco de cultivo a diferentes densidades ópticas y se determinaron colorimétricamente. Los resultados muestran que la tirotricina comienza a detectarse después de una densidad óptica de 0,5 ~~0,35~~. Luego, hasta una densidad óptica de 0,6 ~~0,55~~, aumenta logarítmicamente y después en forma lineal. La cantidad de proteínas, determinada en las mismas alícuotas, muestra un aumento ~~que es directamente~~ proporcional a la DO del cultivo. ~~(Ver figura 2 del Anexo).~~

b) Radioactividad asociada a la tirotricina en un cultivo adicionado de aminoácido-C^{14}

Un resultado enteramente similar se obtiene si al medio de cultivo se adiciona simultáneamente con el inoculum de esporas 2 µC de valina-C^{14} y se mide a diferentes DO la radioactividad asociada a

tirotricina y proteínas. La figura 1 indica que el curso de la incorporación de la radioactividad en ambas fracciones es paralelo al que siguen sus respectivas síntesis.

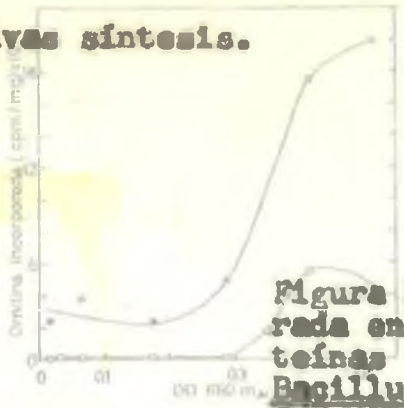

Figura 1. Radioactividad incorporada en tirotricina (●—●) y proteínas (○—○) en un cultivo de Bacillus brevis adicionado de 2 μC de valina-C^{14} de actividad específica 210

Utilizando ornitina-C^{14} los resultados se repiten sólo para la tirotricina. En cambio, la radioactividad asociada a proteínas es muy baja y sólo aumenta ligeramente después que el cultivo alcanza una DO de 0,2.

El análisis cromatográfico de la tirotricina radioactiva extraída a una DO de 0,5 con el sistema de solventes 1 (ver Materiales y Métodos) revela que en esta etapa del desarrollo el 65% de ella corresponde a tirocidinas y el 35% a gramicidinas.

c) Radioactividad asociada a tirotricina en cultivos expuestos por tiempos cortos a ornitina-C^{14}

Cuando se incuban alícuotas de un cultivo de Bacillus brevis en distintas fases de desarrollo con ornitina-C^{14} por cortos períodos (pulse) y se determina la radioactividad incorporada en tirotricina y proteínas se obtienen los resultados que aparecen en la figura 2. (Ver detalles experimentales en la leyenda).

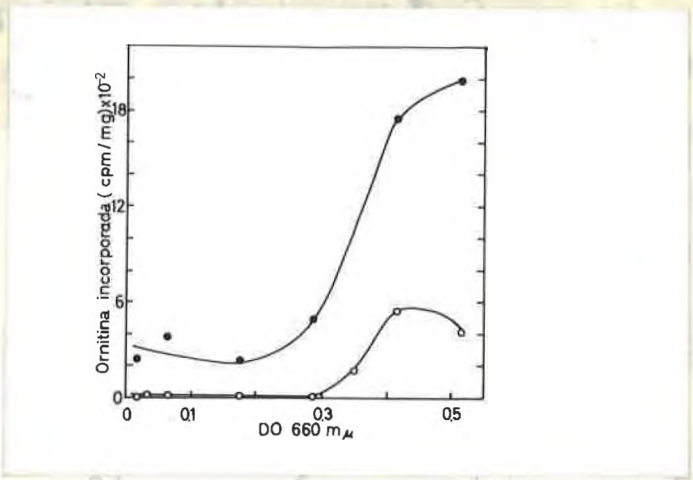

Figura 2. Radioactividad incorporada por mg de tirotricina (●—●) y proteínas (○—○) en alícuotas de diferentes DO de un cultivo de Bacillus brevis expuestas a cortos períodos con ornitina-C^{14}. Se inocularon 170 ml de medio enriquecido con $8,5 \times 10^7$ esporas provenientes de un cultivo estacionario de más de 7 días. A las DO indicadas en la figura se extrajeron alícuotas de 20 ml que se incubaron durante 20 minutos a 37° con 3,0 μC de ornitina-C^{14} de actividad específica 172. La incubación se detuvo con 200 μmoles de ornitina-C^{12} y las células se lavaron dos veces por centrifugación con 10 ml de una solución de NaCl al 2% que contenía 2 μmoles de ornitina fría por ml. Luego se extrajo la tirotricina y se midió su radioactividad de acuerdo con lo descrito en Métodos.

Se observa que la radioactividad en tirotricina comienza a aumentar bruscamente a una DO de 0,25 (0.3) manteniéndose este aumento hasta el final del experimento. Las proteínas en cambio no se marcan sino hasta una DO de 0,35. En este punto la radioactividad asociada a proteína comienza a aumentar con un ritmo mucho menor que el de la tirotricina, alcanzando un máximo más bajo y estabilizándose después de una DO de 0.4.

El análisis cromatográfico con el sistema 1 de las distintas muestras de tirotricina, marcada de esta manera, revela que a partir de una DO de 0.032 es posible detectar una pequeña cantidad de radioactividad que se comporta cromatográficamente como gramicidina, la cual aumenta lentamente hasta el fin del experimento. La radioactividad asociada a tirocidinas sólo comienza a detectarse después de que el cultivo ha alcanzado una DO de 0,174. A partir de este punto se

produce un brusco aumento que sobrepasa la de gramicidina a medida que aumenta la DO (Figura 3).

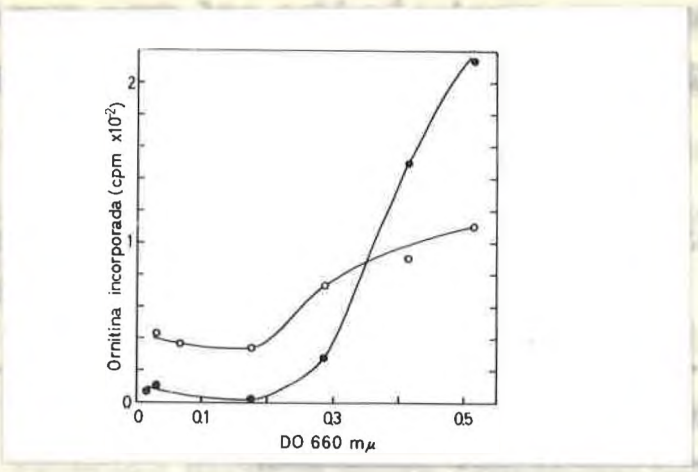

Figura 3. Radioactividad incorporada en tirocidinas (●—●) y gramicidina (○—○) en cultivos de Bacillus brevis adicionados de ornitina-C^{14} en condiciones experimentales iguales a las descritas en la leyenda de la Figura 2. Los polipéptidos se separaron por cromatografía en el sistema de solventes 1 y su radioactividad se midió en un contador de centelleo de acuerdo a lo descrito en Métodos.

Síntesis de tirotricina en sistemas subcelulares

Con el fin de determinar las fracciones subcelulares responsables de la síntesis de tirotricina y de los factores necesarios para esta síntesis, se prepararon extractos de cultivo de Bacillus brevis de DO que variaron entre 0.35 y 0.45. Este rango de DO se eligió tomando en cuenta experimentos preliminares que indicaron que los extractos obtenidos en esta etapa de desarrollo, eran más activos para incorporar aminoácidos en tirotricina.

La capacidad de síntesis de tirotricina se determinó midiendo la radioactividad presente en este compuesto después de incubar el extracto en presencia de un aminoácido radioactivo. Paralelamente se estudió la incorporación de aminoácidos en proteínas. La tabla 1 muestra uno de estos experimentos, en el cual se usó valina-C^{14} y extractos de Bacillus brevis tratados con distintos procedimientos. La estimulación de la incorporación de valina-C^{14} en tirotricina por el extracto crudo es de dos veces, en cambio en el S-30 precipitado

con sulfato de amonio es de catorce veces. El efecto de la precipitación con sulfato de amonio es mucho mayor en las proteínas donde la estimulación de la incorporación es de 170 veces. La filtración por sephadex produce efectos similares pero las estimulaciones son menores. La diálisis del S-30 crudo produce una ligera estimulación sólo en las proteínas.

TABLA 1

Incorporación de valina-C^{14} en tirotricina y proteínas estimulada por extractos de Bacillus brevis*

	c.p.m. incorporadas			
	Tirotricina		Proteínas	
Minutos de incubación	0	60	0	60
S-30 Crudo	28	57	102	116
S-30 dialisado	13	46	20	184
S-30 sephadex	7	74	25	2432
S-30 80% $(NH_4)_2SO_4$	11	151	28	4916

* El sistema de ensayo está descrito en Métodos. El S-30 dialisado se obtuvo después de 4 horas de diálisis del S-30 crudo contra dos cambios de 1 l de solución homogenizadora. El S-30 sephadex se preparó filtrando el S-30 crudo por una columna de sephadex G-25 de 0.9 x 10 cm y eluyendo con solución homogenizadora. Para el ensayo se utilizó una fracción que tenía una concentración de proteínas similar al S-30 crudo. Para obtener el S-30 80% $(NH_4)_2SO_4$ se precipitó el S-30 crudo con una solución saturada de sulfato de amonio en cantidad suficiente para que este quedara a una concentración final de 80% de saturación.

Influencia de algunos factores en la incorporación de aminoácidos en tirotricina y proteínas

Se realizó un estudio de dependencia a diversos factores con el objeto de determinar las condiciones óptimas de incorporación de aminoácidos en tirotricina y de conocer la probable participación de algunos componentes.

a) Efecto del tiempo, concentración de extracto, ATP, sistema regenerador de ATP, Mg^{++} y H^{+}

Si se estudia la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina y proteínas en función del tiempo, se observa que la primera alcanza un máximo entre los 35 y 40 minutos. Las proteínas, en cambio, llegan a un máximo a los 20 minutos, el cual se mantiene hasta los 45 minutos. Luego ambas disminuyen a una velocidad aproximadamente similar (Ver Anexo Figura 4).

El efecto de la concentración de extracto en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina y proteínas es del mismo orden. Ambas muestran una relación directa entre radioactividad incorporada y concentración de extracto usado, siendo la pendiente de las proteínas mayor que la de tirotricina (Ver figura 5 del Anexo).

La figura 4 indica la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina y en proteínas en función de la concentración de ATP. La primera fue directamente proporcional con las concentraciones de ATP usadas. No se observa un óptimo de ATP, sin embargo, experimentos posteriores revelaron que éste está a una concentración 0.01 M. Las proteínas tienen un óptimo que está alrededor de los 5 µmoles/ml. A concentraciones mayores la incorporación prácticamente no varía. La ausencia del sistema regenerador de ATP, creatinaquinasa y fosfocreatina no tiene ningún efecto en la incorporación de aminoácidos en tirotricina, en cambio produce una inhibición de alrededor de un 25% en las proteínas.

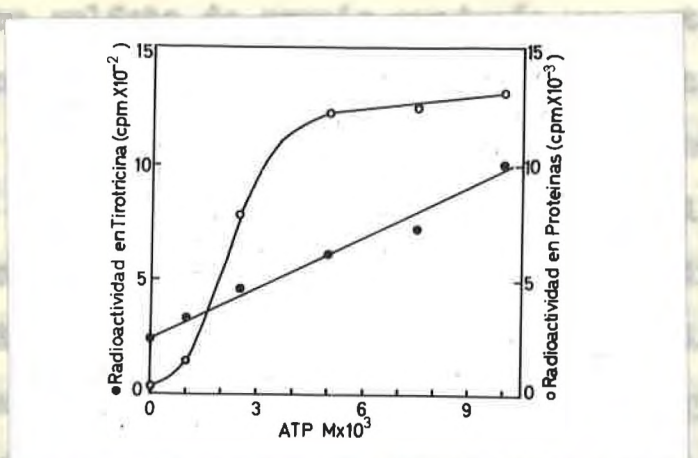

Figura 4. Influencia de la concentración de ATP en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (●—●) y en proteínas (o—o).

La influencia del Mg^{++} aparece en la figura 5. El óptimo de Mg^{++} para tirocidina y proteínas está alrededor de 40 µmoles/ml. Sin embargo, el rango de concentración del metal, para obtener incorporaciones cercanas a la máxima, aparece más estrecho para la tirotricina que para las proteínas.

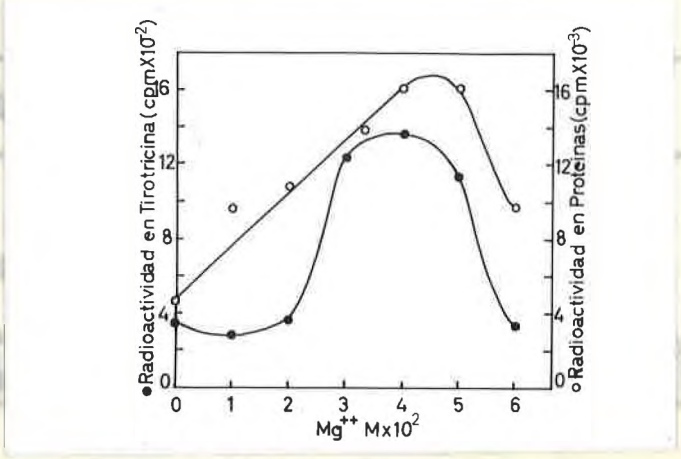

Figura 5. Influencia de la concentración de Mg^{++} en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (●—●) y en proteínas (o—o).

El efecto de la concentración de los iones hidrógeno en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina fue ligeramente distinta a la incorporación en proteínas. Para la primera se obtuvo un óptimo a pH 8,2 y para las segundas, uno de 7,5. (Ver Anexo figura 6).

b) Efecto del amonio

En los experimentos de purificación del sistema se vió que la precipitación con sulfato de amonio producía una estimulación marcada de la incorporación de aminoácido, tanto en tirotricina como en proteínas. Esta estimulación podría deberse a la remoción de algún inhibidor o de aminoácidos libres que estuvieran diluyendo la actividad específica del isótopo usado o bien a la activación del sistema responsable de la síntesis. Con el objeto de esclarecer el problema se comparó la actividad de un S-30 de Bacillus brevis precipitado con 60% de sulfato de amonio con un S-30 al cual se agregó 200 µmoles de este compuesto por ml de mezcla de incubación. Los resultados aparecen en la Tabla 2.

TABLA 11

Incorporación de Fenilalanina-C^{14} en tirotricina y proteínas estimulada por extractos de Bacillus brevis

	c.p.m. incorporadas			
	Tirotricina		Proteínas	
Minutos de incubación	0	30	0	30
S-30 crudo	144	280	368	664
S-30 80% $(NH_4)_2SO_4$	140	570	156	7506
S-30 + 200 µmoles de $(NH_4)_2SO_4$	170	950	368	6784

Se observa que la adición de sulfato de amonio es más eficiente que la precipitación con este compuesto en estimular la incorporación de fenilalanina en tirotricina. La incorporación en proteínas se estimula en ambos casos en aproximadamente la misma magnitud.

Tomando en cuenta estos resultados se hizo un estudio de dependencia del sistema a diferentes concentraciones de sulfato de amonio, encontrándose que para tirotricina existe un óptimo a 0,3 M. Concentraciones mayores o menores disminuyen la incorporación. Las proteínas muestran un máximo de incorporación a una concentración 0,2 M que se mantiene hasta una concentración 0.4 M (Ver Anexo figura 7).

c) Efecto de la tirotricina fría en la extracción de la tirotricina sintetizada in vitro (carrier).

Si se adiciona tirotricina fría a la mezcla de incubación, conjuntamente con el etanol que sirve para detener la reacción y extraer la tirotricina-C^{14}, se observa un aumento de la radioactividad extraida como tirotricina. El efecto de la cantidad de tirotricina fría agregada en la radioactividad de la tirotricina y de las pro-

teínas, aparece en la figura 5. Se ve que la primera aumenta proporcionalmente hasta un máximo de 3 mg de tirotricina fría agregada, mientras que en las proteínas no se observa ningún efecto.

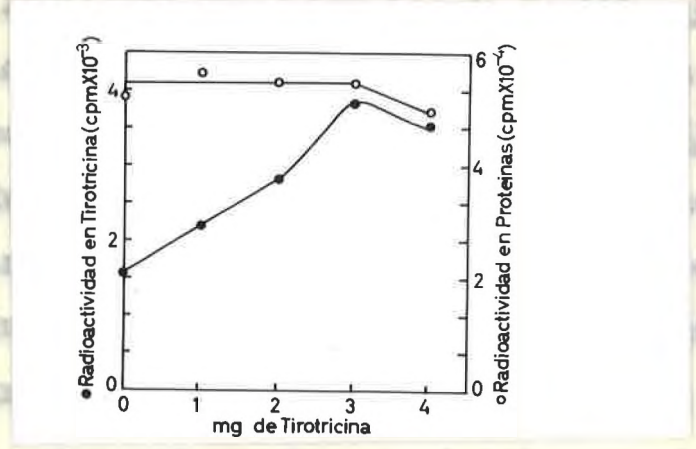

Figura 6. Efecto de la tirotricina fría en la extracción de la tirotricina-C^{14} sintetizada in vitro (•—•) tirotricina; (o—o) proteínas.

d) Incorporación de ornitina en tirotricina y en sRNA.

La ornitina forma parte de las tirocidinas y de la gramicidina S. Cuando este aminoácido se usa como precursor radioactivo en el sistema de síntesis, se observa que la tirotricina no se marca. Los resultados aparecen en la Tabla 3, donde se compara la incorporación de valina-C^{14} y ornitina-C^{14} en tirotricina. El mismo tipo de resultados negativos se obtuvieron en experimentos destinados a obtener ornitil-sRNA (19)

TABLA III

Incorporación de Ornitina-C^{14} y valina-C^{14} en tirotricina estimulada por extractos de Bacillus brevia*

Aminoácido-C^{14}	c.p.m. incorporadas	
	0 min	60 min
Valina-C^{14}	10	115
Ornitina-C^{14}	4	5

* Los componentes de la mezcla de reacción aparecen en Métodos. El extracto utilizado fue un S-30 precipitado a un 80% de saturación de sulfato de amonio resuspendido en el volumen inicial con solución homogenizadora.

e) Efecto de la puromicina y ribonucleasa

Varios autores (9,16,17) han presentado resultados que indican que la puromicina y la ribonucleasa no inhiben la síntesis in vitro de gramicidina S realizada con extractos de Bacillus brevis cepa ATCC 9999. La adición de estos compuestos al sistema de síntesis de tirotricina utilizado en este trabajo obtenido de Bacillus brevis cepa ATCC 8185 produce una marcada inhibición de la incorporación de aminoácidos en tirotricina y en proteínas. Este efecto se observó en todos los experimentos realizados con 5 extractos diferentes. Uno de ellos se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4 IV

Efecto de la Puromicina y Ribonucleasa en la Incorporación de Valina-C^{14} en Tirotricina y en proteínas estimulada por extractos de Bacillus brevis*

Adiciones	c.p.m. incorporadas			
	Tirotricina		Proteínas	
	0 min	60 min	0 min	60 min
Ninguna	12	152	56	9076
Puromicina	12	47	56	980
Ribonucleasa	10	5	44	40

* Los componentes de la mezcla de incubación aparecen en Métodos. El extracto utilizado fue un S-30 similar al descrito en la Tabla 3. Las cantidades de Puromicina y Ribonucleasa agregadas fueron 200 y 100 µg por ml de incubación respectivamente

DISCUSION

Los resultados de los experimentos con cultivos de Bacillus brevis revelan que la capacidad para sintetizar tirotricina no está presente en los primeros estados de desarrollo de la bacteria. Solamente después de una DO de aproximadamente 0.3 es posible detectar directa-

mente o por medio de marcación isotópica una cierta cantidad de tirotricina que aumenta luego logarítmicamente en relación con la DO. El análisis cromatográfico de la tirotricina obtenida en diferentes fases del desarrollo demuestran que la cepa empleada en este trabajo produce preferencialmente tirocidinas. El experimento de pulso realizado con ornitina-C^{14} muestra que las gramicidinas se marcan escasamente en relación a las tirocidinas. Este resultado era de esperar, ya que las gramicidinas no contienen ornitina en su estructura, con excepción de la tipo S que contiene dos residuos por molécula, pero esta última no es producida por la cepa 8165. Es probable que la escasa marcación observada en las gramicidinas se deba a la incorporación de otro aminoácido originado a partir de la ornitina agregada al cultivo. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Gruda y col. (12).

Los experimentos realizados con sistemas subcelulares mostraron que es posible obtener síntesis *in vitro* de tirotricina utilizando el sobrenadante de un homogenizado de *Bacillus brevis* obtenido por centrifugación a 30.000 g. Esta síntesis es dependiente de ATP y Mg^{++}, es estimulada por iones amonio y fuertemente inhibida por ribonucleasa y puromicina. Estas características, enteramente similares a las que presenta la síntesis de proteínas podrían sugerir que ambos procesos obedecen a un mismo mecanismo ~~La incorporación de aminoácidos-C^{14} en proteínas medida simultáneamente mostró características similares, si bien las concentraciones óptimas de ATP y Mg^{++} y el curso de la incorporación no son idénticas.~~ Estos experimentos sugerirían que la tirotricina se sintetiza siguiendo el modelo general de síntesis proteica, lo que estaría en franca contradicción con lo encontrado por Otani y col. (5), Estos autores que han obtenido síntesis *in vitro* de gramicidina S en sistemas exentos de ribosomas y RNA. Es posible plantear que la vía de síntesis de la gramicidina S producida por la cepa 9999 sea diferente a la de la tirotricina producida por la cepa 8165, pero sin embargo, la estrecha relación estructural existente entre gramicidina S y tirocidinas hace muy difícil aceptar esta idea.

En este trabajo no se ha establecido la participación de los ribosomas. Todos los esfuerzos por obtener preparaciones libres de ellos han terminado con la pérdida de la capacidad de síntesis de tirotricina (18). La reconstitución de los elementos separados también se muestran inactivos. La interpretación más simple de estas observaciones es que el sistema de biosíntesis es lábil y no resiste las manipulaciones a que son sometidos los extractos para separar los ribosomas.

Un hecho que llama la atención es la incapacidad de la ornitina, aminoácido que está presente en todas las tirocidinas para incorporarse en ellas. Esto implica necesariamente que no es utilizada al estado libre y que debe derivar de otro aminoácido en alguna etapa de la biosíntesis. Por similitud estructural la arginina podría ser un precursor adecuado si en alguna etapa intermedia, o una vez incorporada en el polipéptido, perdiera su grupo guanidínico. Resultados preliminares indican que cuando se utiliza arginina-C^{14} en el sistema de síntesis se obtiene tirotricina marcada. Sin embargo, no se ha comprobado que la radioactividad de esta última se deba a la presencia de ornitina-C^{14}. Si la síntesis de tirotricina se hiciera según el modelo general de síntesis proteica, la ornitina debería tener una aminoacyl-RNA sintetasa, por lo menos un sRNA y un codon específicos para su activación e incorporación. Los experimentos realizados para detectar estos componentes han sido negativos (19). Esta observación está de acuerdo con la universalidad y no ambigüedad del código genético. Los 64 codones posibles han sido ya asignados a los diferentes aminoácidos y, por lo tanto, no habría posibilidad para asignar nuevos codones. Por otro lado, si la ornitina derivara de la arginina a nivel del sRNA o del polipéptido, se estaría introduciendo ambigüedad en el código, ya que la ornitina se incorporaría con los codones de la arginina. La no ambigüedad del código genético está sustentada por un número elevado de evidencias experimentales (20, 21).

El mismo tipo de ~~interpretación~~ análisis valdría para los D-aminoácidos que forman parte de los péptidos. A este respecto es interesante señalar que en la síntesis de gramicidina S la L-fenilalanina es mejor precursor ~~para~~ de la D-fenilalanina presente en el péptido que la D-fenilalanina (5, 22).

La sensibilidad del sistema a la ribonucleasa sugiere fuertemente la participación de algún tipo de RNA en la síntesis de la tirotricina. Strominger (23) ha demostrado que el glicil-sRNA es un intermediario obligado en la incorporación del aminoácido en los polipéptidos de la pared del Estafilococo dorado. Estos polipéptidos se sintetisan sin la intervención de ribosomas ni RNA mensajero. Resultados similares han sido descritos por Lennarz (24) en relación con la incorporación de lisina en O-L-lisilfosfatidilglicerol. Un mecanismo similar podría estar operando en la síntesis de tirotricina.

Por otro lado, la sensibilidad a la puromicina implicaría la participación de los ribosomas. Es posible, sin embargo, que este inhibidor de la síntesis proteica pueda tener un efecto a otro nivel y que su acción no signifique necesariamente participación ribosomal.

Aun cuando es posible hacerlo, se considera prematuro elaborar una vía de síntesis de la tirotricina que satisfaga los datos acumulados hasta el momento. Antes es necesario resolver varios aspectos centrales del problema. Sin embargo, por la restricción en la codificación de los aminoácidos, es posible afirmar que la síntesis de tirotricina ~~no~~ es probablemente diferente ~~idéntica~~ a la de las proteínas.

CONCLUSIONES

1. La tirotricina producida por el Bacillus brevis ATCC 8185 se sintetiza después que los cultivos alcanzan una DO de 0.5.
2. El 65% de la tirotricina sintetisada in vivo corresponde a tirocidinas y el 35% a gramicidinas.
3. El sobrenadante de un homogenisado centrifugado a 30.000 x g es capaz de sintetizar tirotricina y de incorporar aminoácidos en proteínas.

4. La síntesis in vitro de tirotricina requiere ATP y Mg^{++}, es inhibida por ribonucleasa y puromicina y es estimulada por iones amonio.
5. La incorporación de aminoácidos en proteínas presenta las mismas características señaladas para la síntesis de tirotricina.
6. La ornitina no se incorpora en la tirotricina ~~sintetizada in vitro~~.

RESUMEN

Se estudia la biosíntesis de tirotricina y proteínas en cultivos y en sistemas subcelulares obtenidos de Bacillus brevis ATCC 8185. La tirotricina se sintetiza después que los cultivos alcanzan una DO de 0.5. El 65% de la tirotricina sintetizada corresponde a tirocidinas y el 35% a gramicidinas. Extractos de estos cultivos incorporan aminoácidos en tirotricina y proteínas. Estas incorporaciones dependen de ATP y Mg^{++}, son inhibidas por puromicina y ribonucleasa y son estimuladas por iones amonio. La ornitina no se incorpora en tirotricina cuando se le usa como precursor radioactivo.

Estos resultados sugieren que en la biosíntesis de tirotricina participa algún tipo de RNA y ~~probablemente los ribosomas~~, pero que esta participación puede diferir de la descrita para la vía general de síntesis proteica.

SUMMARY

Tyrothricin and protein biosynthesis has been studied in cultures and in cell-free systems obtained from Bacillus brevis ATCC 8185. Tyrothricin is formed after the cultures reach an OD of 0.5. 65% of this tyrothricin was shown to be tyrocidines and 35% to be gramicidins. Cell-free extracts of these cultures are able to incorporate amino acids into tyrothricin and into proteins. These incorporations are dependent on ATP, Mg^{++}, are inhibited by ribonuclease and puro-

mycin and are stimulated by ammonium ions. Ornithine is not incorporated into tyrothricin when used as a radioactive precursor.

These results suggest that RNA and probably the ribosomes are involved in tyrothricin biosynthesis. However, their mechanism of action may differ from the one described for the general pathway of protein biosynthesis.

BIBLIOGRAFIA

1. Waley, S.G., Advan. Protein Chem. 21, 1 (1966).

2. Spagren, U., Fryholm, L.B., Laland, S.G., Biochem J. 102, 586 (1967)

3. Hall, J.B., Sedat, J.W., Adiga, P.R., Uemura, I. y Winnick, T. J. Mol. Biol. 12, 162 (1965).

4. Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H., Kurahashi, K., Biochemistry 6, 2552 (1967).

5. Otani, S., Yamamoi, T., Saito, Y. y Otani, S., Biochem. Biophys Res. Commun. 25, 590 (1966).

6. Ruttenberg, M., Mach, B., Biochemistry 5, 2864 (1966).

7. Okuda, K., Uemura, I., Hodley, J.W. y Winnick, T., Biochemistry 3, 100 (1964).

8. Sedat, J.W., Hall, J.B., J. Mol. Biol. 12, 174 (1965).

9. Bhagavan, N.V., Rao, P.M., Pallard, L.W., Rao, R.K., Winnick, T. y Hall, J.B., Biochemistry 5, 3844 (1966).

10. Gause, G.F., Brazhnikova, M.G., Sovyetskü Gramistidin i Lecheniye ran, Medgiz, Moscow (1943).

11. Dubos, R.J., J. Exptl. Med. 70, 11 (1939).

12. Okuda, K., Edwards, G.C. y Winnick, T., J. Bacteriol. 85, 329 (1963).

13. Von Wirtz, M., En "Handbuch der Pathogenenen Mikroorganismen", Herausgegeben von W. Kolle und A. von Wasser Mann, Auflage Band I, Jena Gustav Fischer, p. 347 (1912).

14. Mach, B., Reich, E. y Tatum, E.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50, 175 (1963).

15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

16. Yukioka, M., Tsukamoto, Y., Saito, Y., Tsuji, T., Otani, S. y Otani, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 204 (1965).

17. Berg, J.L., Frøholm, L.O., Laland, S.G., Biochem. J. 96, 43 (1965).

~~18. Jerez, C., Caviedes, R., Basilio, C., Manuscrito en preparación.~~

19. Jerez, C., Caviedes, R., Basilio, C., Resúmenes de la X Reunión Anual Soc. Biol. de Chile, Panimávida, p. 68 (1967).

20. Basilio, C., "Biosíntesis de Proteínas", Ed. Cabello, J., Niemeyer, H., Coronado, A., Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, p. 143 (1967).

21. Basilio, C., Natl. Cancer Inst. Monographs 27, 181 (1967).

22. Yamada, M., Tomino, S., Kurahashi, K., J. Biochem. (Tokyo) 56, 616 (1964).

23. Matsuhashi, M., Dietrich, C.P., Strominger, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 587 (1965).

24. Lennarz, W.J., Bonsen, P.P.M., van Deenen, L.L.M., Biochemistry 6, 2307 (1967).

18. Brumgraber, E.F. Biochem. Biophys. Research Com. 8, 1 (1962)

A N E X O

A N E X O

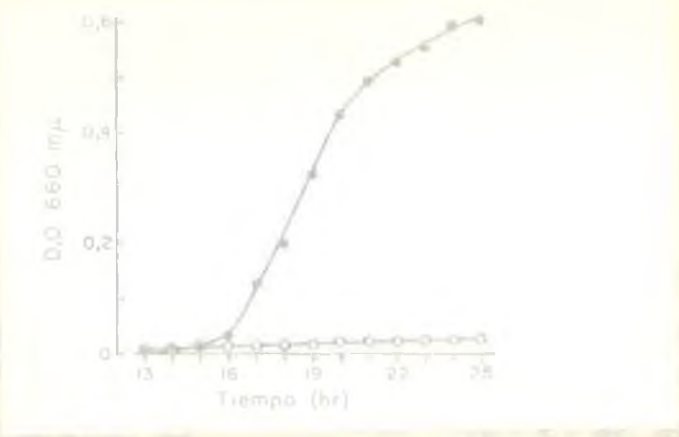

Figura 1. Curva de desarrollo del Bacillus brevis en medio enriquecido. (•—•) con agitación; (o—o) sin agitación. Condiciones de cultivo de acuerdo a lo descrito en Métodos.

A N E X O

Figura 2. Movilidad cromatográfica y electroforética de la tirotricina (Ver Métodos).

A N E X O

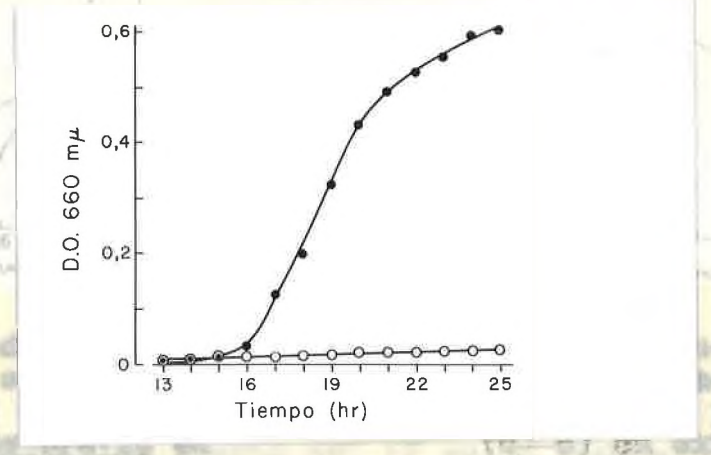

Figura 1. Curva de desarrollo del Bacillus brevis en medio enriquecido. (•—•) con agitación; (o—o) sin agitación. Condiciones de cultivo de acuerdo a lo descrito en Métodos.

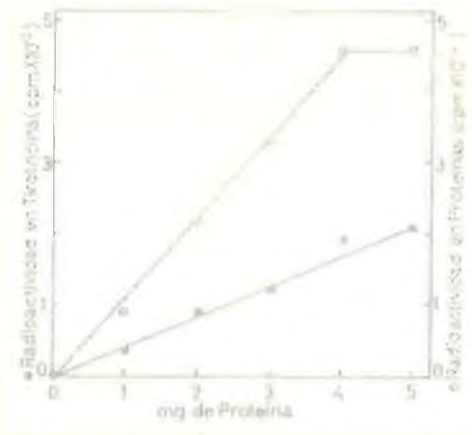

Figura 2. Movilidad cromatográfica y electroforética de la tirotricina (Ver Métodos).

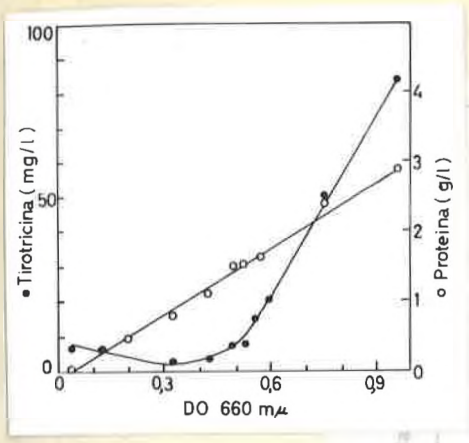

Figura 3. Producción de tirotricina (•—•) y proteínas (o—o) en un cultivo de Bacillus brevis en medio enriquecido. Condiciones de cultivo de acuerdo a lo descrito en Métodos.

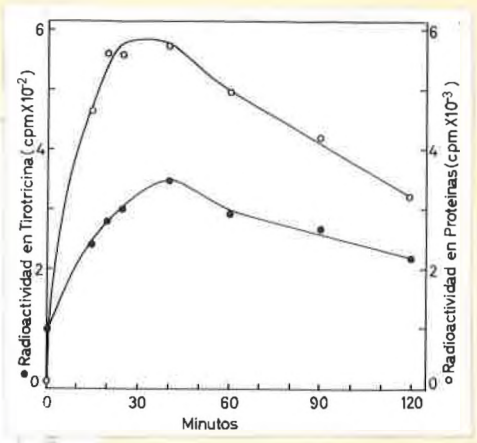

Figura 4. Incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (•—•) y proteínas (o—o) en extractos subcelulares de Bacillus brevis en función del tiempo de incubación.

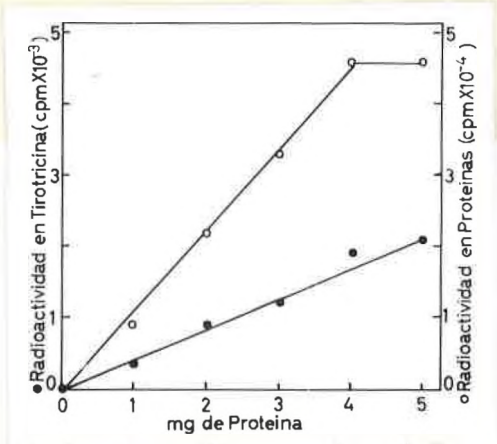

Figura 5. Efecto de la concentración de extracto de Bacillus brevis en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (•—•) y en proteínas (o—o).

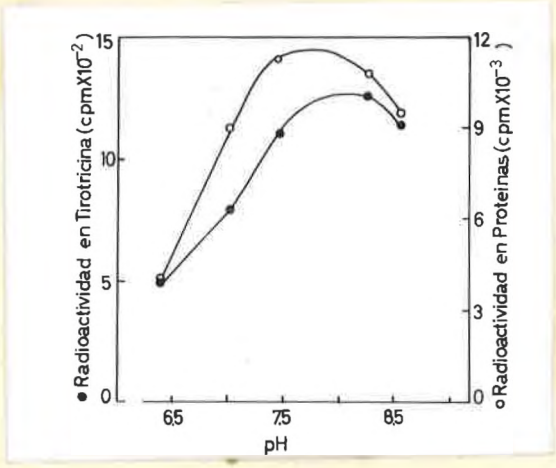

Figura 6. Efecto del pH en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (•—•) y en proteínas (o—o). Como amortiguador se utilizó Tris-HCl 0.1 M

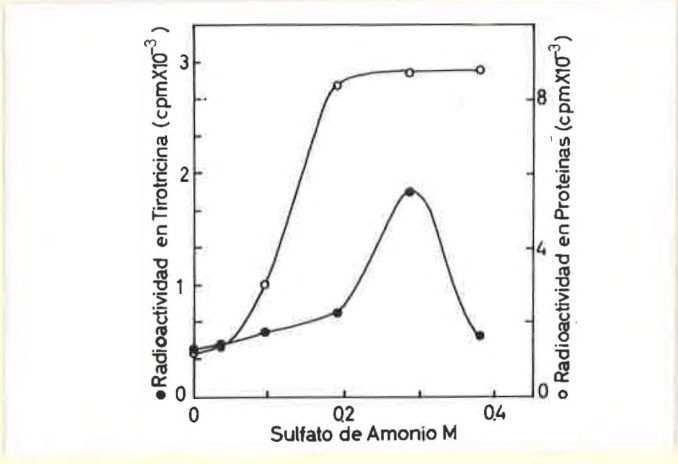

Figura 7. Influencia de la concentración de sulfato de amonio en la incorporación de fenilalanina-C^{14} en tirotricina (•—•) y en proteínas (o—o).