

SINTESIS DE PROTEINAS EN LOS RIBOSOMAS DE ERITROCITOS DE POLLO EN DIFERENCIACION

RUTH ROMÁN Y ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ

Departamento de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM, México 20, D. F.

RESUMEN

Se comparó la incorporación a proteínas de ^{14}C fenilalanina entre ribosomas de eritrocitos de embrión de pollo de 13 días y de pollo adulto. Se determinaron las condiciones óptimas del sistema de incorporación con respecto a las condiciones de magnesio, cinasa de piruvato, adenosin trifosfato y ácido fosfoenol pirúvico.

La actividad endógena se estimuló 3.0 veces en los ribosomas de embrión y 2.2 veces en los adultos. Cuando la incorporación de aminoácidos se efectuó en presencia de ácido poliurídilico, las estimulaciones se incrementaron 10 veces en el embrión y 9 veces en el adulto, teniendo siempre los ribosomas de los adultos menor capacidad de incorporación que los de los embriones. Se discute la importancia de un cambio estructural en los ribosomas de estas dos fuentes en relación con la actividad de síntesis de proteínas.

ABSTRACT

The incorporation of ^{14}C -phenylalanine into ribosomal proteins in the red cells of 13-day chick embryos and of adult chickens, was comparatively determined. Some parameters for optimal conditions in the incorporation system were determined, such as the concentration of magnesium, pyruvate kinase, adenosin triphosphate and phosphoenol pyruvate.

The endogenous activity showed 3 times more stimulation in the case of the embryonic ribosomes, versus 2.2 times more for adult ribosomes. When the assay was done in the presence of polyuridylic acid the stimulations increased 10 times for the embryo, and 9 times for the adult ribosomes. The adult ribosomes consistently showing less incorporation than in the case of the chick embryos. The role of a structural change of these two sources or ribosomes, upon the protein synthesis activity is being discussed.

INTRODUCCION

Durante la diferenciación celular del eritrocito de pollo, se efectúan diversos cambios fisiológicos y bioquímicos. Uno de ellos, es el cambio de 80 a 62 S en el coeficiente de sedimentación (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1968). Esto, junto con

Abreviaturas: RNA, ácido ribonucleico; GPT, guanosa trifosfato; ATP, adenosin trifosfato; FEP ácido fosfoenol pirúvico, TCA ácido tricoloro acético; Poli U, ácido poliurídilico.

otras alteraciones fisicoquímicas sugieren que la estructura terciaria de los ribosomas sufre una alteración más durante el proceso de diferenciación celular (Román y Sánchez, 1975). Se observa además que la síntesis de proteínas decrece en forma paralela a dichos cambios (Rowley y Morris, 1967) y que el RNA ribosómico de las células maduras se encuentra parcialmente degradado (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1973).

Con el objeto de conocer si los ribosomas de éstas células maduras son aún capaces de incorporar aminoácidos en un sistema de síntesis de proteínas *in vitro*, se aislaron ribosomas de células inmaduras y maduras, utilizando sangre de pollo adulto y de embrión de pollo de 13 días, respectivamente. Entonces se comparó la capacidad de síntesis de proteínas *in vitro* en ambos tipos de ribosomas.

METODOLOGIA

Obtención de las fracciones ribosómicas y sobrenadante

Las sangres de embrión de pollo de 13 días o de pollo adulto se lavan 3 veces consecutivas con una solución NKM (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), eliminando en la última lavada las células blancas.

El paquete de eritrocitos se suspende en una solución TKM (0.01 M Tris-HCl pH 7.55, 0.01 M KCl, 0.005 M MgCl₂) en 10 veces su volumen (ó 2 veces para adulto) y se le agrega 1/10 de volumen de solución de saponina (0.6 g/10 ml de PO=4 0.1 M pH 7.0), se mezcla y se deja en hielo 30 minutos con agitación esporádica. A continuación se ajusta la concentración de KCl a 0.025 M y la de sacarosa a 0.25M. Se deja otros 5 minutos más en hielo. Se centrifuga a 20,000 rpm (rotor J20 de centrifuga Beckman, modelo 21) durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar 100,000 x g (rotor 40, centrifuga Spinco, modelo L) durante 3 horas y media. El precipitado de ribosomas se suspende en una solución buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.55, 0.004 M MgCl₂, 0.025 MKCl, 0.25 M sacarosa y 0.002 M mercapto etanol) a una concentración de 8 mg/ml. Al sobrenadante de 100,000 x g se le agrega, por cada 50 ml, 0.1 ml de mercapto etanol 1 M y se guarda congelado a una concentración de 10 mg/ml.

Sistema de incorporación de síntesis de proteínas

En un volumen total de 0.1 ml se prepara una mezcla de 50 mM tris HCl pH 7.55, 80 mM KCl, 4mM MgCl₂, mM GTP, 2 mM mercapto etanol, 1 mM A₁TP, 10 mM ácido fosfoenol pirúvico, 0.5 unidades de cinasa de piruvato (2 ug) 0.5 μ Curies de ¹⁴C fenilalanina (325 uC/u moles) 120 μ g ribosomas, 100 g de fracción sobrenadante y ácido poliuridílico (Miles) cuando se indique. Se incuba la mezcla de reacción a 37°C durante 25 minutos. Se detiene la eracción agregando 0.1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y 1 ml de TCA al 5%. Se hierve durante 20 minutos, se filtra en fibra de vidrio GF/C y se lava 3 veces con

5 ml de TCA frío al 5%. Se seca con lámpara y se agregan 10 ml de líquido de centelleo (1,000 ml de tolueno más 64 ml de spectrafuor ppo-popop, Amersham/Searle) y se cuenta en un aparato de cintilación líquida (Packard).

RESULTADOS

A. Optimización del sistema de medición

Para estudiar la capacidad de síntesis de proteínas de los ribosomas de células maduras e inmaduras, se procedió a establecer las condiciones óptimas de medición. En este caso, se utilizaron fracciones de ribosomas y sobrenadante celular de células inmaduras ya que son más activas que las de células maduras. Sin embargo, los resultados obtenidos con células maduras fueron similares, excepto por los niveles de incorporación de aminoácidos que fueron más bajos.

Se estudiaron varios parámetros como el tiempo de incubación. Se encontró que la incorporación de la ^{14}C -fenilalanina fue lineal hasta los 40 minutos. Las mediciones posteriores se hicieron incubando durante 25 minutos.

En la figura 1, se observa que la concentración óptima de magnesio para la incorporación de ^{14}C fenilalanina fue de 4 mM (I-A). También se determinaron las concentraciones óptimas del sistema generador de energía, encontrándose 0.5 unidades de cinasa de piruvato (I-B), 1.0 mM de ATP (I-C) y 10mM de ácido fosfoenolpirúvico (I-D). Cada uno de estos experimentos se reprodujo cuando menos 3 veces. Los resultados de la figura 1 son valores promedio. En la figura 2 se muestra la incorporación de ^{14}C -fenilalanina por diferentes concentraciones de ribosomas y sobrenadante de células inmaduras. Se encontró en ambos casos incorporación casi lineal a bajas concentraciones de estos componentes y saturación de la incorporación alrededor de 100-200 μg , de cada uno de ellos. Los experimentos se realizaron 2 veces con resultados prácticamente idénticos.

B. Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas

Una vez conocidas las condiciones óptimas para la incorporación se procedió a comparar la capacidad de incorporación de los ribosomas de embrión y de adulto. La figura 3 muestra la capacidad de síntesis endógena de ribosomas de embrión y adulto siendo ligeramente más activos los de embrión (la columna).

Cuando se agrega el sobrenadante celular, la incorporación del sistema de embrión aumenta 3 veces con respecto a los ribosomas solos, mientras que el sistema mixto de ribosomas de embrión y sobrenadante de adulto sólo una vez. En la misma figura se observa que el sistema completo de adulto viene a ser como la mitad de activo que el sistema de embrión y que la adición del sobrenadante de embrión a los ribosomas de adulto, no mejora significativamente ésta incorporación. Los resultados, muestran una deficiencia en la incorporación tanto en la fracción de ribosomas como en el sobrenadante de adulto.

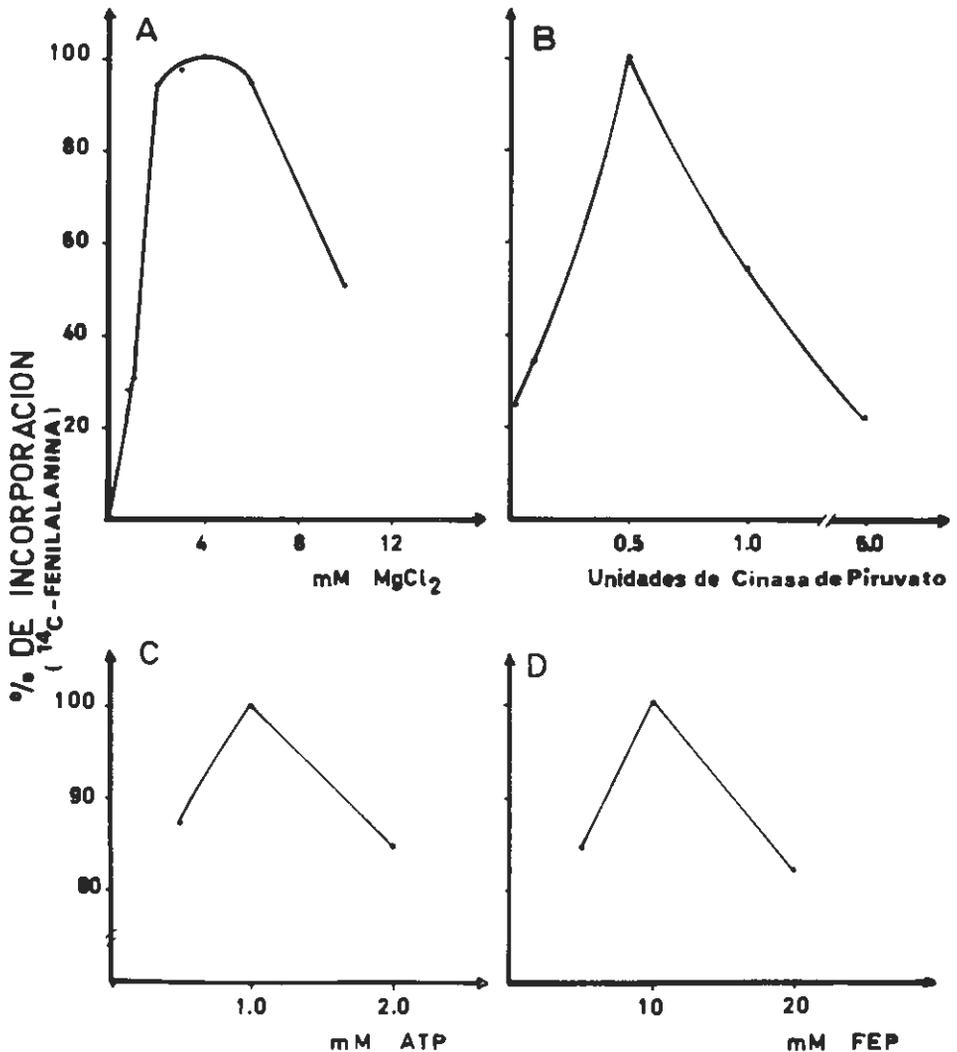


Figura 1. Condiciones de reacción. 100 μg de ribosomas de embrión fueron incubados durante 25 minutos a 37° en las condiciones descritas en la metodología en ausencia de ácido poliuridílico. La cantidad de ^{14}C fenilalanina insoluble en ácido tricloroacético caliente se determinó por centelleo líquido. A. Concentración de magnesio variable, B. Variación de cinasa de piruvato, C. Variación de ATP, D. Variación de ácido fosfoenolpirúvico.

Con el objeto de investigar si la incorporación de aminoácidos podía mejorar en presencia de mensajero, en caso de ser éste un factor limitante en el sistema, se realizó el siguiente experimento que se ilustra en la figura 4. Los sistemas completo de embrión y adulto se incubaron en presencia de dos concentraciones de ácido poliuridílico, sólo que los ribosomas en ambos casos se lavaron con 0.5 MKCl para eliminar los factores de iniciación. En ambas concentraciones el nivel

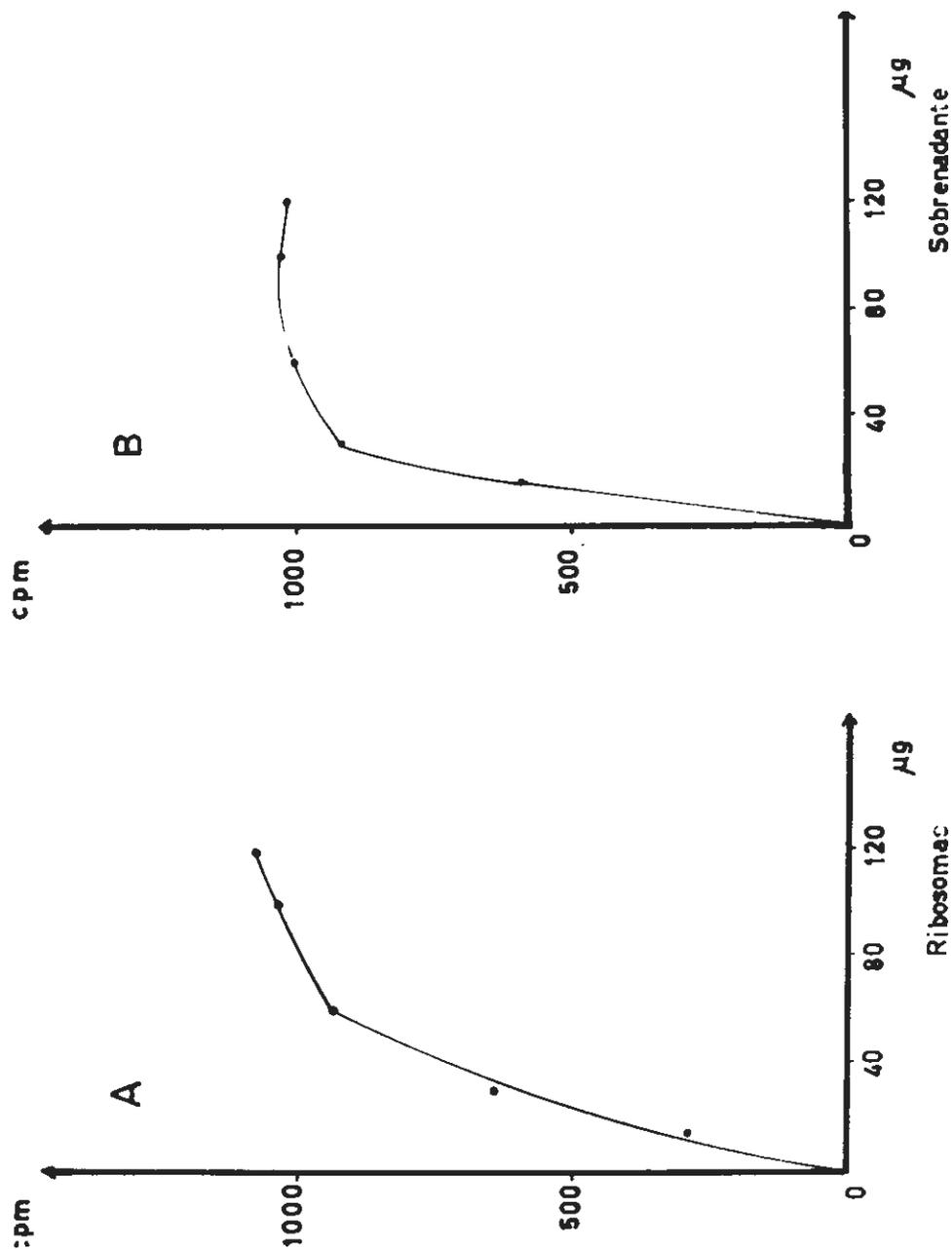


Figura 2. Actividad de ribosomas y sobrenadante. A. 100 μg de sobrenadante de embrión se incubaron en ausencia de poli U a las concentraciones de ribosomas que se indican. B. 100 μg de ribosomas de embrión se incubaron a diferentes concentraciones de sobrenadante. Otras especificaciones se indican en la metodología.

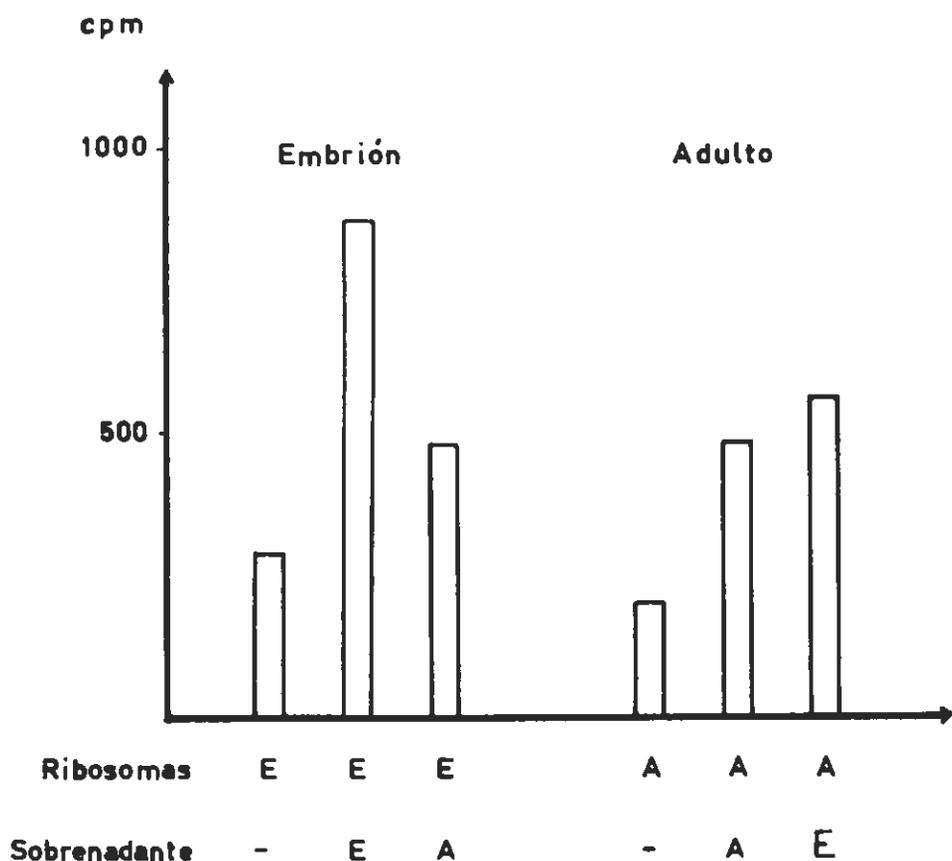


Figura 3. Cruzamiento de sobrenadantes. La incorporación endógena de ribosomas de embrión o adulto se midió en la forma que se explica en la metodología. E. Embrión. A. Adulto.

de incorporación de los sistemas completos mejora notablemente. El sistema de embrión aumenta 5 a 10 veces para $1.2 \mu\text{g}$ y $50 \mu\text{g}$ de poli U, respectivamente; mientras que el adulto, 3.2 y 9.1 veces. Como puede observarse el sistema de adulto que es menos eficiente, muestra también mayor incorporación, pero siempre en menor nivel que el embrión. Cuando al sistema combinado de ribosomas de adulto y sobrenadante de embrión se le agrega $1.2 \mu\text{g}$ de PoliU, la incorporación mejora el sistema de adultos (3.6 veces), sin embargo, no alcanza el nivel del sistema de embrión. Estos experimentos fueron repetidos varias veces mostrando consistentemente las mismas tendencias y menor incorporación en los ribosomas de adulto a pesar de encontrar algunas variaciones de experimento a experimento en los valores absolutos de incorporación. Esto indica que aún supliendo las deficiencias que pudiese tener el sistema de adulto con respecto a aminoacil-tRNA sintetetas, factores de elongación y RNA mensajero, el ribosoma de adulto está en sí alterado y no alcanza un nivel de incorporación igual a la del embrión.

DISCUSION

Tanto los ribosomas de eritrocitos de embrión como los de adulto tienen actividad significativa de síntesis de proteínas *in vitro* en presencia de un mensajero sintético. Esto es de llamar la atención puesto que *in vivo* los eritrocitos maduros de pollo prácticamente no muestran actividad de síntesis de proteínas (Rowley y Morris, 1967). Sin embargo, es importante mencionar que la incorporación obtenido *in vitro* no logra igualarse con ambos tipos de ribosomas (Figura 4). Supliendo el sistema de adulto con las fracciones de embrión esta diferencia no logra superarse (Fig. 3). Cuando a los ribosomas de embrión se les mide la incorporación de ^{14}C fenilalanina dirigida por $50 \mu\text{g}$ de Poli U, en presencia de

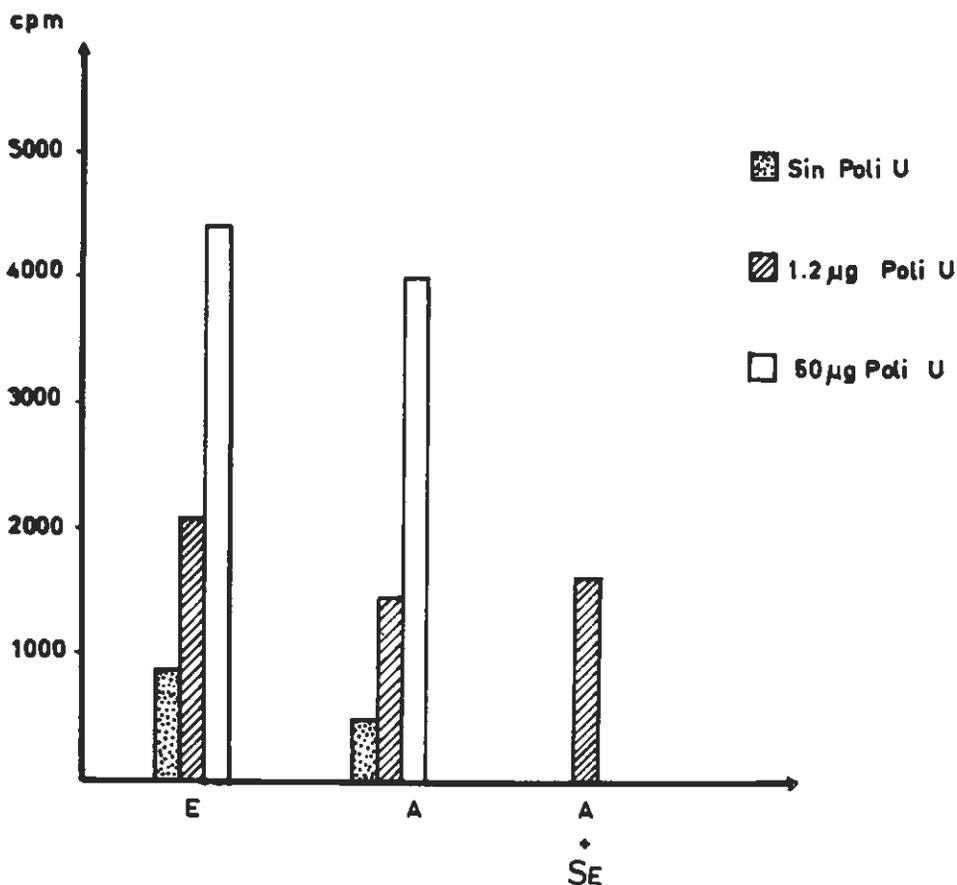


Figura 4. Estimulación con Poli U. $100 \mu\text{g}$ de ribosomas de embrión o adulto, lavados con 0.5 M KCl se incubaron en presencia de $100 \mu\text{g}$ de su respectivo sobrenadante. Las condiciones de medición son iguales a las descritas en la metodología, con excepción de 6 mM magnesio. S_E, Sobrenadante de embrión.

sobrenadante de trigo (dato no publicado) la estimulación se incrementa hasta 20 veces, lo cual es explicable ya que el sobrenadante de trigo puede suplir los factores proteicos que se encuentren limitados en el sistema del embrión de pollo. Por otro lado, Zagris (1977) ha descrito que en un sistema suplementado de trigo, los ribosomas de eritrocitos de embrión de pollo de 6.5 días muestran una incorporación endógena 2.0 veces mayor lo cual confirma los resultados que se obtuvieron en este trabajo, en relación a la existencia de una limitación en el RNA mensajero en el sistema embrionario.

Con el fin de medir la incorporación de aminoácidos de los ribosomas de embrión y adulto en iguales condiciones de concentración de mensajero y presencia de factores proteicos, se lavaron los ribosomas con 0.5 MKCl, proceso que permite extraer los factores de iniciación. De esta manera ambos sistemas quedan en condiciones similares, pues dichos factores decrecen durante la diferenciación celular (Herzberg *et al.*, 1969).

El sistema de incorporación de síntesis de proteínas dirigidos por el ácido poliridílico no depende de los factores de iniciación y por lo tanto la diferencia en la incorporación encontrada (figura 4) no se debe al cambio de concentración de estos factores sino más bien se sugiere que sea debido al ribosoma en sí cuya estructura terciaria al estar alterada (Román y Sánchez, 1975) muestra una menor eficiencia en la incorporación de los aminoácidos. Por otro lado, si los ribosomas que han sido previamente degradados con ribonucleasa pancreática, continúan activos en la síntesis de proteínas *in vitro* (Kuechler *et al.*, 1972), no es extraño encontrar que los ribosomas de pollo adulto, cuyo RNA está parcialmente degradado (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1973), sean todavía activos aunque en menor proporción que los ribosomas de embrión. Sin embargo, se podría todavía explorar la capacidad de síntesis de éstos ribosomas en iguales condiciones de factores de iniciación pero con un mensajero natural, ya que esto podría poner de manifiesto, de manera más drástica, las diferencias encontradas en el ribosoma.

Phillay (1977) ha descrito un sistema de cotiledones de soya en envejecimiento. Los ribosomas extraídos de estos cotiledones pierden con el envejecimiento su capacidad de traducción y propone que ésta pérdida podría deberse tanto a un limitado uso de RNA mensajero, a la inactivación de los ribosomas, a factores que participan en la traducción y a la acumulación de un inhibidor en el sistema. La pérdida de actividad de los ribosomas de pollo adulto aquí descritos podrían reflejar también un proceso de envejecimiento y muerte celular durante el cual posiblemente contribuyen como factores limitantes las aminoacil tRNA sintetasas, los factores de elongación e iniciación y el RNA mensajero, y en forma significativa la alteración sufrida en la estructura terciaria del ribosoma, lo que viene a determinar la disminución en la capacidad de síntesis proteica.

LITERATURA

- HERZBERG, M., REVEL, M. Y DANON, D. (1969). The influence of ribosomal factors during the maturation of reticulocyte. *European J. Biochem.* 11, 148-153.

- KUECHLER, E., BAVER, K. Y RICH, A. (1972). Protein synthesis with ribonuclease digested ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta* 277, 615-627.
- PILLAY, D. T. N. (1977). Protein synthesis in ageing soybean cotyledons loss in translational capacity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 796-804.
- ROMÁN, R. Y SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, E. (1975). Physicochemical characteristics of ribosomes in relation to cell ageing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1243-1250.
- ROWLEY, P. T. Y MORRIS, J. A. (1967). Protein synthesis in the maturing reticulocyte. *J. Biol. Chem.* 242, 1533-1540.
- SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ E., WEEB, F. H. Y BOCK, R. M. (1968). Ribosome alterations during red cell differentiation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 452-459.
- . ROMÁN, R. Y LOTINA, B. (1973). *Gene expression and its regulation*. En: Ribosomes in reticulocyte maturation (F. T. Kenney, B. A. Hamkalo, G. Favelukes y J. T. August, (Eds.). Plenum Press, New York, pp. 473-485.
- ZAGRIS, N. (1977). Translation of endogenous message in embryonic chick erythroid cell polysomes in a cell-free protein synthesizing system. *Biochem. Genet.* 15, 825-832.