

## **Efecto inhibitorio del citosol sobre la biosíntesis de proteínas en levadura**

J. DEL SOL Y R. MARIBONA

*Dpto. de Biología Celular y Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba*

*Recibido: 31 de diciembre de 1980*

*Recibido: 22 de mayo de 1981*

**ABSTRACT.** In this work the isolation, characterizations and study of the most important parameters of a yeast cell free system using poliuridilic acid as synthetic messenger is presented. This system showed and activity like others reported. The relationaship between the incorporation of the  $^{14}\text{C}$  and the extraction of the cytosol from the mixture depended on the centrifugation conditions used. In this direction was found an inhibitory effect in the cytosol which may be associated with the lipidic fraction in the cellular extract.

**RESUMEN.** En este trabajo se presenta el aislamiento, caracterización y estudio de un sistema libre de células de levadura en sus parámetros más importantes, empleando ácido poliuridílico como mensajero sintético. La dependencia de la reacción del citosol, estuvo relacionada con las condiciones de centrifugación. Se encontró un efecto inhibitorio de la incorporación de fenilalanina  $^{14}\text{C}$  marcada, al aumentar la concentración del citosol, que puede estar asociado a las fracciones lipoproteínicas del extracto celular.

### **INTRODUCCION**

En el estudio de los mecanismos y la regulación de la biosíntesis de proteínas en eucariotes, se requieren sistemas libres de células con un alto grado de fraccionamiento y estabilidad a fin de esclarecer las diferencias de estos organismos respecto a los procariotes.

Aunque la levadura es un modelo idóneo en este sentido, por ser un eucariote unicelular, cuya bioquímica y genética son bien conocidas, existen dificultades en la obtención y fraccionamiento de un extracto celular activo para los ensayos de biosíntesis de proteínas.

Los sistemas de mayor actividad reportados, requieren de un tedioso fraccionamiento de los extractos celulares<sup>1,2</sup>, mientras que los ensayos con fraccionamientos más simples muestran dificultades, tanto por la baja actividad como por la presencia de inhibidores de la actividad biosintética en el extracto<sup>3,4</sup>. En todos estos experimentos se han empleado siempre mensajeros sintéticos.

En este trabajo se obtiene y caracteriza un sistema fraccionado, libre de células para el estudio de la biosíntesis de proteínas en levadura, empleando el ácido poliuridílico como mensajero sintético.

Se describe un fraccionamiento simplificado del extracto celular y se estudia la dependencia de la reacción respecto a las propiedades más importantes del sistema.

Contrario a lo reportado por Sisson<sup>3</sup>, se observó dependencia de la reacción del citosol y se detectó un efecto inhibitorio de la incorporación de fenilalanina que se evidencia durante el fraccionamiento celular.

## MATERIALES Y METODOS

*Siglas de los reactivos empleados.* ATP (trifosfato de adenosina), GTP (trifosfato de guanosina), PEP (fosfoenolpiruvato), PK (piruvato kinasa).

*Biomasa y extractos celulares.* Se siguió el método descrito por Sisson<sup>3</sup> con algunas modificaciones. El extracto celular obtenido por centrifugación a  $30000 \times g$  en un rotor de  $10 \times 10$  ml de la ultracentrífuga SS-50 de la MSE (super 30), fue fraccionado en ribosomas y citosol (super-100) por centrifugación a  $120000 \times g$  durante 90 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en un rotor de  $3 \times 6,5$  ml de la ultracentrífuga SS-75. Las fracciones de super-30 (S-30), de super-100 (S-100) y de ribosomas fueron almacenadas en nitrógeno líquido y usadas antes de un mes de envejecimiento.

*Gradiente de los ribosomas y el S-30.* Se aplicó 0,1 ml de S-30 o en su lugar, 1-2 mg de ribosomas en un gradiente de sacarosa 10-40% (p/p) y se centrifugó a  $150\,000 \times g$  durante 3 horas, en un rotor de  $3 \times 5$  ml de la centrífuga Janetzki Vac-60.

*Mezcla de la reacción para la determinación de la actividad biológica.* Las concentraciones finales de los componentes fueron:

ácido poliuridílico ( $0,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ); S-30 (diluido 8 veces) o en su lugar ribosomas ( $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) y S-100 (diluido 4 veces); agua o antibióticos

(puromicina, cicloheximida y cloranfenicol y una mezcla que contiene Tris-HCL pH 7,6, 50 mM; acetato de magnesio 8 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  60 mM, PEP 5 mM, ATP 1,33 mM, PK  $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , GTP 0,167 mM, GSH 8 mM (glutación reducido), espermidina 1,0 mM, una mezcla total de aminoácidos fríos 0,04 mM y fenilalanina  $^{14}\text{C}$  ( $495 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$  y  $50 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Nunca se mezclaron muestras de S-30, S-100 o ribosomas correspondientes a distintas maceraciones para realizar la cinética.

Para iniciar la reacción se mezclaron a  $4^\circ\text{C}$   $50 \mu\text{l}$  de los cuatro componentes finales indicados y se incubaron los tubos a temperatura ambiente ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ). A distintos intervalos se detuvo la reacción mediante la adición de 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 7%. El precipitado se filtró a través de filtros Whatman GF/C. El filtrado se lavó tres veces con TCA 7% y una vez con alcohol 96%. La radioactividad fue evaluada en un contador de centelleo con 90% de eficiencia.

## RESULTADOS Y DISCUSION

*Extractos celulares.* Los gradientes del S-30 mostraron una adecuada homogeneidad de la población ribosomal (Fig. 1). Sólo los extractos con estas características mostraron actividad biológica.

El contenido de proteínas determinado por el método de Lowry y cols.<sup>5</sup>; fue de  $20\text{-}25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el S-30 y de  $10\text{-}15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el S-100.

La absorbancia de 260 nm del S-30 fue de 220-300 D.O. y la del S-100 fue de 50 a 60-D.O. Se observó elevada dependencia de la calidad de los extractos celulares de las condiciones de ruptura celular.

*Cinética.* La incorporación de fenilalanina  $^{14}\text{C}$  en el tiempo, tanto empleando S-30, como ribosomas y S-100 (Figs. 2 y 3) mostró la evolución cinética característica de estos sistemas, con una incorporación aproximada de 2-3 aminoácidos por ribosoma a los 60 minutos de incubación. Estos valores coincidieron con los reportados por otros autores.

*Reacción con S-100 y ribosomas.* La Tabla I muestra que la reacción es dependiente del ácido poliuridílico (poli U), de ribosomas y del S-100 (ensayos 1,6 y 7). El sistema mostró la inhibición esperada en presencia de antibióticos específicos.

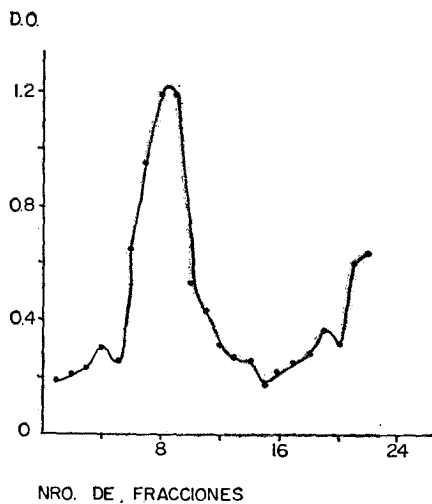


Fig. 1. Gradiente de sacarosa 10-40 % del S-30. El pico máximo corresponde a los ribosomas

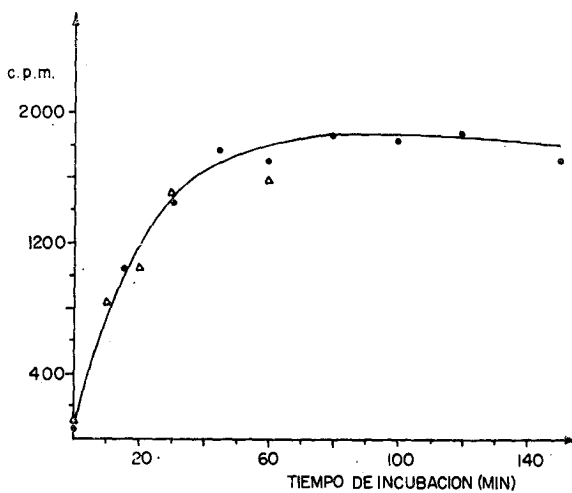


Fig. 2. Cinética de incorporación de fenilalanina  $^{14}\text{C}$ . Cada punto corresponde a dos ensayos. Se plotean dos experimentos empleando S-30.

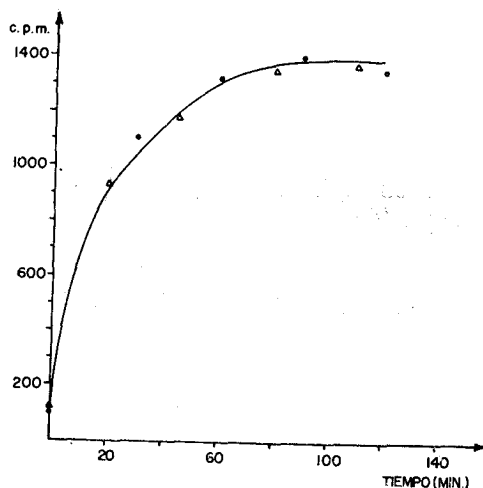


Fig. 3. Cinética de incorporación de fenilalanina empleando ribosomas y S-100 en lugar del S-30. Se plotean dos experimentos.

TABLA I

*Sistema fraccionado en ribosomas y S-100*

No.	Ensayo	% de incorporación relativa	
		Con poli U	Sin poli U
1	Mezcla de reacción total (MRT)	100%	10-20%
2	MRT + cicloheximida (05 mM)	22	—
3	MRT + puromicina (2 mM)	18	—
4	MRT + ribonucleasa (2 g.ml <sup>-1</sup> )	24	—
5	MRT sin ribosomas + puromicina (2 mM)	16	—
6	MRT sin ribosomas, sin S-100	7	—
7	MRT sin S-100	38	—
8	MRT sin S-100 + puromicina (2 mM)	16	—
9	MRT con cloranfenicol (0,5 ml)	101	—

100% (1350 cpm)  
poli U (ácido poliurídico).

La actividad observada al añadir cloranfenicol 0,5 mM sugiere que la incorporación no es debida a ribosomas mitocondriales. El resto de los controles dan resultados que reafirman el carácter específico de la incorporación en este sistema.

En las condiciones de centrifugación indicadas en materiales y métodos se obtienen los resultados registrados en la Tabla I. La reacción es dependiente de S-100 (ensayo 7); sin embargo, el valor es relativamente alto y susceptible a la inhibición por puomicina (ensayo 8). Este comportamiento sugiere que el ensayo 7 junto a los ribosomas precipitan parte de los factores proteínicos que hacen posible la actividad observada.

*Efecto del fraccionamiento.* Los niveles de incorporación reflejados con anterioridad (Tabla I) fueron logrados mediante el fraccionamiento en un rotor de ángulo libre. En estos ensayos se observó dependencia de la reacción del S-100 (ensayos 1 y 7). Sin embargo, al utilizar un rotor de ángulo fijo en las mismas condiciones de centrifugación esta dependencia no se logró (Tabla II, ensayos 1 y 6).

TABLA II

*Resultados al variar las condiciones de centrifugación*

No.	Ensayo	Incorporación (cpm)
1	Mezcla total con S-100 (MT)	1224
2	MT sin ATP y sin PK	145
3	MT sin ribosomas	
	+ mezcla de proteínas RNA	214
4	MT + GTP (0,6 mM)	1449
5	MT sin ribosomas y sin poli U	328
6	MT sin S-100 (MTS)	2604
7	MTS con cicloheximida	450
8	MTS sin poli U	840

En el trabajo de Sisson<sup>3</sup> donde se emplea también un rotor de ángulo fijo (comunicación personal) y condiciones semejantes de centrifugación a las aquí empleadas, tampoco se observa dependencia de la reacción de la adición del S-100.

Las diferencias observadas en cuanto a la dependencia de la reacción del S-100 se pueden explicar si se considera que el rotor de ángulo fijo (Fig. 4) por tener la mitad del radio de centrifugación del rotor de ángulo libre y debido a que las macromoléculas no son "lavadas" como en éste, precipitan junto a los ribosomas los factores proteicos necesarios para la síntesis de proteínas.

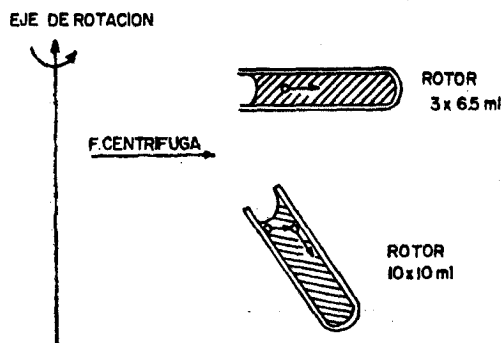


Fig. 4. Diferencias en las condiciones de centrifugación. En el rotor de ángulo libre ( $3 \times 6,5$  ml) los ribosomas, se dice son "lavados" porque atraviesan en todo momento el medio líquido y con ello la posibilidad de liberar proteínas es mayor que en el rotor de ángulo fijo ( $10 \times 10$  ml).

*Efecto inhibitorio.* Atendiendo a lo anterior, el hecho de que al sustraer el S-100 se observe el doble de la incorporación que en su presencia (Tabla II, ensayos 1 y 6) puede explicarse si se considera un efecto inhibitorio del S-100).

La Fig. 5 muestra la disminución de la incorporación al aumentar en la mezcla de reacción la concentración del S-100 obtenido por fraccionamiento en un rotor de ángulo fijo, corroborando el efecto inhibitorio predicho.

En la Tabla II se observa que tanto en presencia como en ausencia del S-100 la reacción mantiene sus propiedades, por lo que el efecto inhibitorio no debe alterar el mecanismo de la misma, sino que debe disminuir la concentración de alguno de los componentes necesarios para la síntesis. Resultados simultáneos<sup>6</sup> sugieren una naturaleza ribonucleásica de los inhibidores planteados.

En los ensayos de purificación del S-100 (Tabla III) la inhibición disminuyó completamente al filtrar el S-100 sobre sepharosa 4 B (No. 5) y se eliminó en parte al extraer el S-100 con éter (No. 6).

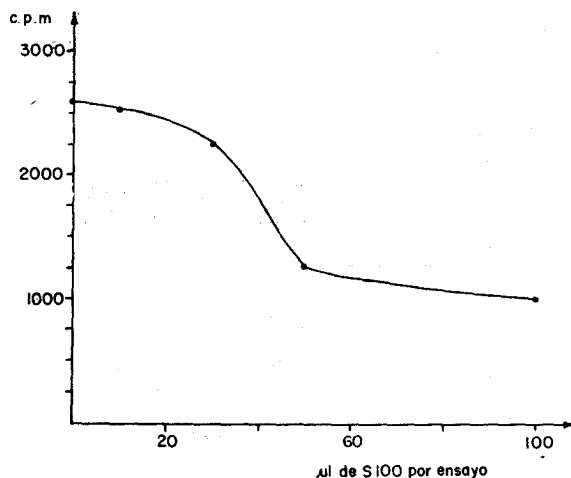


Fig. 5. Efecto de la concentración del S-100 sobre la incorporación de fenilalanina  $^{14}\text{C}$

TABLA III

*Ensayos de purificación del S-100*

No.	Ensayo	Incorporación (cpm)
1	Mezcla de reacción con S-100	1224
2	Mezcla de reacción S-100	2604
3	Mezcla con S-100 filtrado sobre carbón activado	1245
4	Mezcla con S-100 filtrado sobre CMC	1222
5	Mezcla con S-100 filtrado sobre sepharosa 4B	2532
6	Mezcla con S-100 extraído con éter	1620

0,5 ml de S-100 fueron mezclados con 0,2 g de cada componente indicado y filtrados a vacío sobre filtros Whatman GF/C. Para la extracción con éter se mezclaron volúmenes 1:1.



El resto de los ensayos no varió la inhibición (No. 3 y 4). Estos hechos sugieren que el inhibidor puede estar relacionado con lipoproteínas, que se conoce quedan flotando en el citosol o S-100.

### CONCLUSIONES

Se logró un sistema fraccionado libre de células de levadura para el estudio de la biosíntesis de proteínas con mRNA sintético, cuya cinética y controles coinciden con lo esperado de la literatura y garantiza exactitud y reproducibilidad de los resultados.

Se demuestra que la dependencia de la reacción por el S-100 no es como se pensaba<sup>3</sup> una limitante de este sistema, sino que varía con las condiciones de centrifugación y a su vez está enmascarada por la presencia de inhibidores de la reacción.

Se puso en evidencia la presencia y efecto de un inhibidor de la síntesis de polifenilalanina que aparece durante el fraccionamiento y que puede estar asociado a las fracciones lipídicas del extracto celular.

### REFERENCIAS

1. VANDER ZEWIST A.M.B. *Eur. J. Biochem.*, 30, 15, 1972.
2. PERANI A., TIBONI O. AND CIFERRI O. *J. Mol. Biol.*, 55, 107, 1971.
3. SISSON C.H. *J. Biochem.*, 144, 131, 1974.
4. BERQUIST P.L. *Biochemistry*, 7, 1751, 1968.
5. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FAIR A.L. AND RANDALL R.J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
6. MARIBONA R.H., KORNEVA S.B. AND KOPYLOV A.M. *Biochemistry (Russ)* 44, 1701, 1979.