

Influencia de los iones magnesio en el sistema ribosomal de levadura

S. PÉREZ, R. PÉREZ, R. MARIBONA Y S. BAETA

Lab. de Biología Molecular, del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 16 de mayo de 1977

Recibidos 8 de noviembre de 1977

ABSTRACT. Due to the effect of Mg^{+2} on the ribosomal system it is of interest to study its influence, as an approach to the understanding of the mechanisms of protein biosynthesis. However the literature reports of quantitative studies on Mg^{+2} influence are contradictory, probably because of the effect of high hydrostatic pressures on the dissociation of the system. In order to analyze the influence of the latter effect, it was studied comparatively by means of ultracentrifugation in an MSE Analytical Ultracentrifuge with Schlieren optic system and by Electron Microscopy using negative staining with uranyl acetate in a Hitachi HU-11A and a Tesla BS-500 Electron Microscope. A strong Mg^{+2} dependence for the ribosomal system was observed, since just a variation of 2 μ Mg units was enough to provoke total change in the state of association of the system. Furthermore no effect of the hydrostatic pressures was observed under the ionic strength conditions used.

RESUMEN. Debido al efecto que producen los iones magnesio en el sistema ribosomal resulta interesante su estudio, para esclarecer los mecanismos de la síntesis proteica. Sin embargo en los estudios cuantitativos efectuados hasta el momento de ese efecto, no existe coincidencia, pudiendo ser debido esto al efecto que las altas presiones hidrostáticas producen en la disociación del sistema, por lo cual se abordó un estudio comparativo por ultracentrifugación en una ultracentrífuga analítica MSE con sistema óptico de Schlieren a 40 000 rpm, y por microscopia electrónica mediante tinción con acetato de uranilo en un microscopio Hitachi-HU-11A y en un Tesla BS-500. Se obtuvo una dependencia fuerte de este sistema con la concentración de iones magnesio, ya que al variar 2 unidades de μ Mg se produce un cambio total en el estado de asociación del sistema. No se detectó efecto de las presiones hidrostáticas en las condiciones de fuerza iónica utilizada.

INTRODUCCION

El rol de la disociación y asociación de los ribosomas en el ciclo ribosomal durante la biosíntesis de proteínas en particular como una etapa de la iniciación de la cadena peptídica, ha sido ampliamente demostrada (Colombo y cols., 1968; Nomura y cols., 1967; Kaempfer y cols., 1968). Además se ha comprobado que los iones magnesio pueden provocar la disociación o asociación de los ribosomas, por lo que el estudio del efecto de este ion en el sistema ribosomal resulta atractivo para esclarecer los mecanismos de la síntesis proteica (Maribona, 1970; Petre, 1970; Shcherbukhin y Guermant, 1975, Walters y Van Os, 1970). Sin embargo en los sistemas ribosomales de eucariotes y en específico de levaduras, a diferencia de los de procariotes no existe una uniformidad en los resultados reportados para la influencia del Mg^{+2} .

Los estudios cuantitativos para determinar el estado de asociación del sistema ribosomal por medio de ultracentrifugación analítica (Walters y Van Os, 1970) y por centrifugación en gradiente de zona (Petre, 1970), pueden estar afectados por el efecto disociante de la presión hidrostática (Amesz y cols., 1973; Infante y Grades, 1971).

En el presente trabajo se realiza un estudio comparativo de la influencia de la concentración de los iones magnesio en el sistema ribosomal de levadura, mediante técnicas de ultracentrifugación y microscopia electrónica, para evaluar de esta forma la influencia de los efectos mencionados sobre el sistema ribosomal.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de ribosomas: Los ribosomas fueron obtenidos a partir de la cepa 197-4D de *Sacharomice cerevisiae* mediante ruptura mecánica de un mortero de porcelana con alúmina. El tampón de ruptura utilizado fue Tris-HCl 50mM, $MgCl_2$ 10mM, NH_4Cl 60mM, mercaptoetanol 0,5mM, pH 7,6, manteniendo todo el tiempo una temperatura de 0°C aproximadamente. El grado de ruptura fue chequeado mediante microscopia óptica. El rendimiento obtenido fue entre 10 y 15 mg de ribosomas por gramo de biomasa utilizada. Los ribosomas obtenidos fueron caracterizados por ultracentrifugación analítica.

Disociación: Los pellets de ribosomas se resuspendieron en tampón A que contenía 10mM de fosfato, 20mM de potasio y 20mM de cloruro de

magnesio, se guardaron en nitrógeno líquido en alícuotas de 0.5ml y concentración de 10mg/ml después de clarificada la suspensión a bajas revoluciones. La concentración fue determinada por absorción a 260nm utilizando como coeficiente de extinción para 1 mg/ml, E_{260-11} OD. En todos los casos se comprobó la homogeneidad del preparado inicial de ribosomas por ultracentrifugación analítica. La disociación se realizó mediante diálisis en varios pasos, a 10°C, con una relación de volumen de 1:1000 donde el tampón exterior se cambió cada 2 horas, disminuyendo en estos cambios un orden en la concentración de Mg^{2+} y por último, se dejó dializar la muestra durante toda la noche contra el tampón a la concentración final deseada. El equilibrio en la diálisis fue comprobado por conductimetría.

Microscopia Electrónica: Para la caracterización de los ribosomas por esta técnica, las muestras con concentración de 10 OD, después de dializadas se fijaron mediante la incubación con formaldehído a una concentración final de 1% durante 30 minutos y a 10°C, contrastándose mediante tinción negativa según la técnica descrita por Vignais y cols., (1972). Las microfotografías fueron tomadas a 70 000, 80 000 y 100 000 de aumento en un microscopio electrónico Hitachi UH-11A y en un Tesla BS-500. Los conteos de monosomas y subunidades para determinar la razón de disociación se hizo en base a las dimensiones y modelos propuestos (Bayley, 1964; Nonomura y cols., 1971; Vignais y cols., 1972; Kiselev y cols., 1974).

Determinación de la razón de disociación: La caracterización del sistema ribosomal a las diferentes concentraciones de Mg^{2+} , fue realizada en un rotor de 4 plazas de una ultracentrífuga analítica MSE, a 40 000 rpm y 20°C, tomándose las fotos cada 100 segundos. Como criterio de identificación de los picos de monosomas y subunidades fueron determinados en todos los casos los coeficientes de sedimentación de éstos. La determinación de la razón de disociación se realizó calculando la razón de las áreas de los picos obtenidos por planimetría con un OTT Planimeter y rectificadas con el factor de dilución radial.

RESULTADOS

Estudio de la disociación por ultracentrifugación analítica. Soluciones de ribosomas a concentraciones de 10 mg/ml fueron dializadas contra

tampones A, que contenían diferentes concentraciones de Mg^{2+} y caracterizadas por ultracentrifugación analítica con el sistema óptico de Schlieren, a 40 000 rpm y 20°C. Bajo cada concentración de Mg^{2+} se analizaron 3 muestras cuyos resultados se muestran en las Figs. 1a, 1b, 1c y 1d.

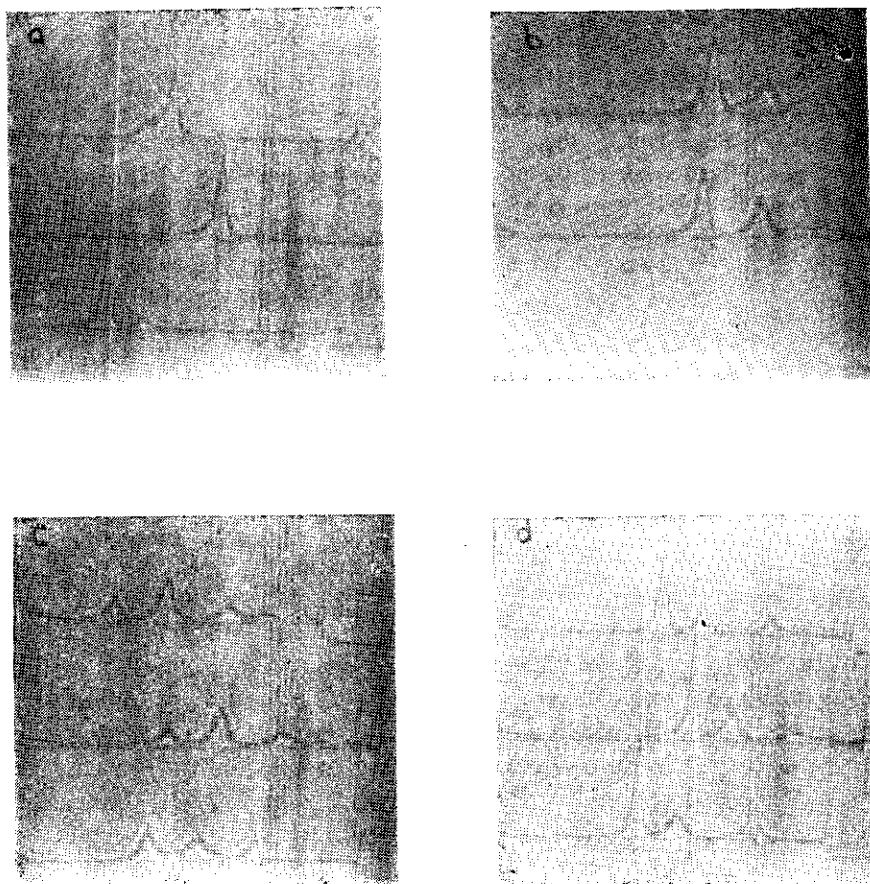


Fig. 1. Sedimentogramas del sistema ribosomal de levadura tomados en un rotor de 4 plazas a 40 000 rpm y 20°C. Las concentraciones de las muestras son de 10 mg/ml en tampón fosfato 10mM, K⁺ 20mM. 1a: Mg^{2+} 5mM. 1b: Mg^{2+} 1mM. 1c: Mg^{2+} 0,5 mM. 1d: Mg^{2+} 0,1mM.

La razón de disociación R_d , fue evaluada para cada una de estas muestras, teniendo en cuenta la corrección en las áreas debido a la dilución radial. R_d fue calculada según $R_d = \frac{Al + As}{Am + Al + As}$ donde Am , Al y As son las áreas promedios de 5 mediciones, bajo los picos de monosomas, subunidad mayor y menor respectivamente. Los errores relativos porcentuales en la medición de las áreas fueron evaluados a partir de las desviaciones standard de las mediciones de éstas, obteniéndose una variación desde 1% para los picos de áreas mayores hasta un 9% para los de áreas menores. Como se puede observar de las Figs. 1a, d y 3a en los puntos cercanos a $R_d = 0$ y $R_d = 1$, o sea $pMg = 2,3$ y $pMg = 4$, existe una diferencia mayor entre los patrones de sedimentación de las 3 muestras analizadas y en las razones de disociación de ellas.

En la Fig. 3b se muestra el comportamiento promedio de R_d a distintas concentraciones de Mg^{2+} y a las concentraciones de fosfato y potasio fijadas por el tampón A.

Para comprobar que durante la disociación no ocurría ningún cambio que impidiera la reasociación de las subunidades se tomó una muestra a la cual se le había disminuido la concentración de Mg^{2+} hasta 0.05mM, se dializó aumentando lentamente la concentración de Mg^{2+} hasta 10 mM, en estas condiciones se analizó en la ultracentrifuga analítica comprobándose la presencia de monosomas.

Estudio de la disociación por microscopia electrónica. Con el objetivo de poder comparar los resultados obtenidos por ultracentrifugación con los de este método, se seleccionaron 3 concentraciones de iones magnesio a las cuales se habían analizado muestras previamente por ultracentrifugación y eran representativas de estados de asociación significativamente diferentes, éstas fueron 5mM, 0,5 mM y 0,05mM de Mg^{2+} . Las muestras fueron ajustadas a estas concentraciones de Mg^{2+} mediante diálisis, fijándose con formaldehído para evitar que se produjesen alteraciones en el estado de asociación del sistema ribosomal al variar la concentración de Mg^{2+} durante la tinción. Posteriormente se realizó la tinción de la muestra.

De las microfotografías obtenidas se escogieron 10 fotos que fueron ampliadas hasta 200 000 veces de aumento, para realizar el conteo de monosomas y subunidades ribosomales. La razón de disociación se determinó como: $R_d = \frac{N_{sub}}{N_m + N_{sub}}$.

El conteo se realizó 2 veces en forma independiente una de otra, para poder evaluar cualquier criterio subjetivo en la operación. Los resultados se muestran en la Fig. 4 conjuntamente con la curva obtenida por ultra centrifugación para su comparación. Los errores fueron evaluados a partir de la propagación de errores en la expresión de R_d y de considerar una distribución de Poisson de las partículas en las microfotografías. Se obtuvieron para los puntos extremos errores menores de un 20% y para el punto intermedio menor de un 17%.

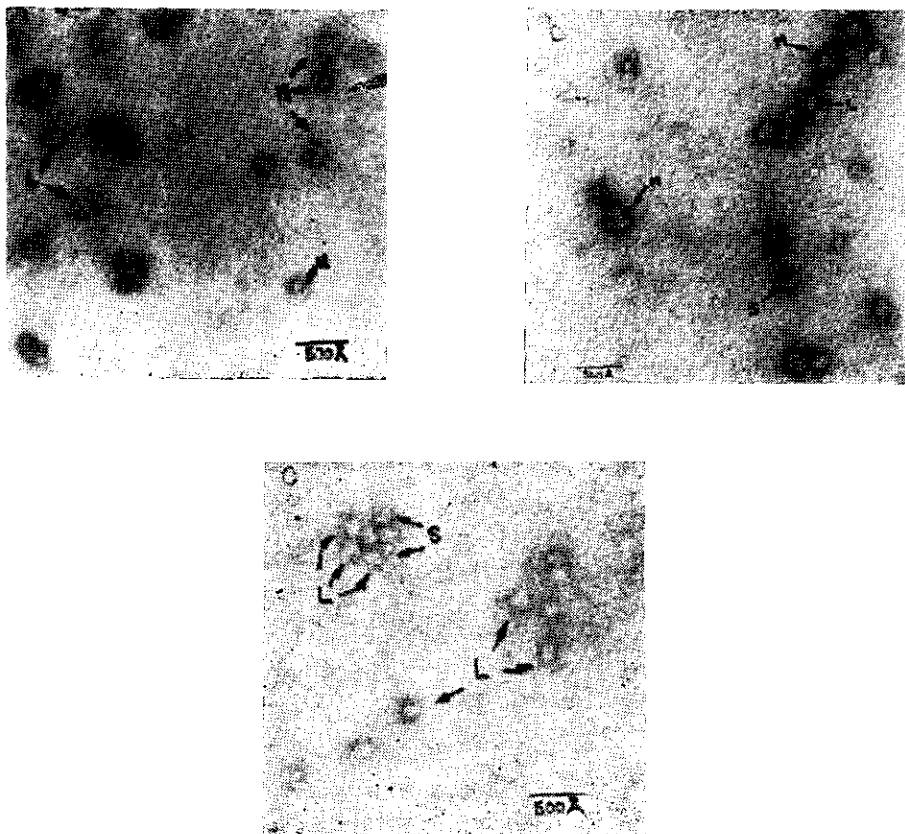


Fig. 2. Microfotografías del sistema ribosomal de levadura. Se encuentran marcadas algunas partículas para que sirvan de identificación. M: monosomas, L: subunidad mayor, S: Subunidad menor. El aumento está indicado en las fotos. 2a: Mg^{2+} 5mM; 2b: Mg^{+2} 0,5mM; 2c: Mg^{+2} 0,05mM.

En las Figs. 2a, b y c se pueden apreciar muestras de monosomas y subunidades, así como la evaluación del estado de asociación al variar la concentración de Mg^{2+} . Obsérvese la relativa cantidad de agregados que puede deberse a la acción del formaldehído.

DISCUSION

De los resultados expresados en las Figs. 3a y b se puede asumir que la dependencia del estado de asociación del sistema ribosomal de levadura con la concentración de iones magnesio, para las condiciones fijadas de fuerza iónica, es fuerte, ya que la disminución de 2 unidades de pMg produce un cambio total en el estado de asociación del sistema. Esto coincide con los resultados de Walters y Van Os (1970), donde se reporta que los valores extremos de la razón de disociación en esa misma concentración de fosfato dista 1,5 unidades pMg.

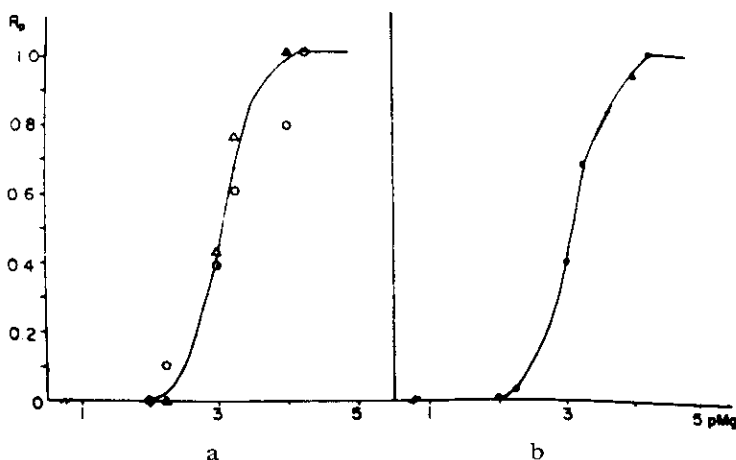


Fig. 3. Razones de disociación RD del sistema ribosomal de levadura a diferentes concentraciones de iones magnesio, ($pMg^{2+} = -\log [Mg^{2+}]$) calculadas de los sedimentogramas teniendo en cuenta el factor de dilución radial. a: representa los valores calculados para las 3 muestras analizadas en cada concentración de iones magnesio y b: representa los valores promedio de las 3 muestras.

Sin embargo el hecho de que la curva que expresa la dependencia de Rd con la concentración de fosfato (Figs. 3a y b) difiera de la reportada

por estos autores, se debe a nuestro juicio a los errores inherentes al método de medición, ya que el sistema óptico de Schlieren tiene baja sensibilidad y en los puntos extremos se incrementa el error; esto puede evidenciarse en las fotos de los sedimentogramas a las concentraciones extremas ($\text{pMg} = 2,3$ y $\text{pMg} = 4$) en las cuales se observan las mayores diferencias entre los patrones de las 3 muestras.

Otro factor que puede influir en la diferencia de resultados presentados es el estado biológico de los ribosomas con los que se ha trabajado, ya que de acuerdo a la forma de obtención, estos deben constituir una mezcla heterogénea de ribosomas con secciones de mRNA y peptidil tRNA que le dan estabilidad ante la disociación (*Belitsina y Spirin, 1970; Amesz y cols., 1973*) y ribosomas libres que terminaron la síntesis, luego esta mezcla tendría un comportamiento heterogéneo en el estado de asociación del sistema ribosomal ante la variación de la concentración de Mg^{2+} . Asimismo la comparación de los resultados de diferentes trabajos se dificulta también por las condiciones diferentes de fuerza iónica y tampones utilizados, por ejemplo se ha comprobado que los iones fosfatos pueden modificar el comportamiento del sistema ribosomal ante la concentración de iones magnesio (*Chao, 1957; Walters y Van Os, 1970*).

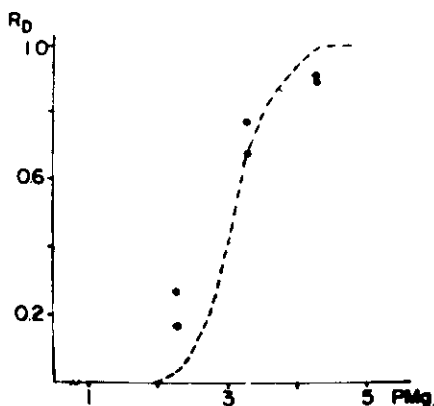


Fig. 4. Razones de disociación R_d del sistema ribosomal de levadura calculada mediante conteo de monosomas y subunidades en las microfotografías. Representan los valores obtenidos en dos conteos independientes. La curva de línea discontinua fue la obtenida por ultracentrifugación (Fig. 3b) y sirve de comparación.

Del estudio de los sedimentogramas a bajo Mg^{2+} puede concluirse que este sistema cuando disminuye la concentración de Mg^{2+} se hace lábil y puede degradarse con facilidad, incluso para concentraciones por debajo de 0,01mM de Mg^{2+} el sistema altera su estructura en alto grado, de manera que la reasociación a monosomas no se produce.

La comparación de los resultados en la determinación de la razón de disociación por microscopia electrónica y por ultracentrifugación analítica (Fig. 4) evidencia que para el punto 0,5mM de Mg^{2+} existe una buena coincidencia para las razones de disociación. En los puntos extremos la diferencia es mayor, pero por lo discutido anteriormente pueden considerarse coincidentes dentro de los errores del experimento, por lo que no fue detectado efecto de la presión hidrostática sobre el estado de asociación del sistema en las condiciones de fuerza iónica utilizadas.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la cooperación del Laboratorio de Ultraestructura del CNIC por facilitarnos los equipos y la asistencia técnica en este trabajo. Además a los técnicos Omar García y José del Sol por la manipulación de la ultracentrífuga analítica en las múltiples corridas realizadas.

REFERENCIAS

- AMESZ W. J. C. BLOEMERS H. P. J. AND BEVERS E. M. Dissociation of yeast ribosomes; the effects of hydrostatic pressure and KCl. *Molecular Biol. Reports* 1, 33, 1973.
- BAYLEY S. T. Physical studies on Ribosomes from Pea Seedling *J. Mol. Biol.* 8, 231, 1964.
- BELTSINA N. V. AND SPIRIN A. S. Studies on the structure of ribosomes IV Participation of Aminoacyl t-RNA and peptidyl t-RNA in the association of Ribosomal Particles *J. Mol. Biol.*, 52, 45, 1970.
- COLOMBO B., VESCO C. AND BAGLIONI C. Role of Ribosomal Subunits in Protein Synthesis in Mammalian Cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 61, 651, 1968.
- CHAO F. C. Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 426, 1957.
- INFANTE A. A. AND GRADES P. N. Stability of free ribosomes, derived ribosomes and polysomes of the sea urchin. *Biochem. Biophys. Acta.* 246, 100, 1971.

- KAEMPFER R., MESELSON M. AND RASKAS H.G. Cyclic Dissociation into Stable Subunits and Re-formation of Ribosomes during bacterial Growth. *J. Mol. Biol.*, 31, 277, 1968.
- KISELEV N. A., V. YA STEL' MASHCHUK, LERMAN M. I. AND O. YU ABABUMOVA on the structure of liver Ribosomes. *J. Mol. Biol.*, 86, 577, 1974.
- MARIBONA R. Tesis de Especialidad, Cátedra de Biología de la Universidad de Lomonosov, URSS. 1970.
- NOMURA M., LOWRY C. V. AND GUTHRIE C. The initiation of Protein synthesis: Joining of the 60S ribosomal subunit to the Initiation complex, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 1487, 1967.
- MONOMURA Y., BLOBEL B. AND SABATINI D. Structure of Liver Ribosomes studied by negative staining. *J. Mol. Biol.* 60, 303, 1971.
- PETRE J. Specific dissociation of Ribosomes from *S. cerevisiae* by a Protein factor. *Eur. J. Biochem.* 14, 339, 1970.
- SHCHERBUKHIN V. AND GUERMANT C. Anomalous sedimentation behavior of the *E. Coli* ribosomal system $50S-30S \rightleftharpoons 50S + 30S$. *Biophys. Chem.* 3, 21, 1975.
- VIGNAIS P. V., STEVENS B. J., HUET J. AND ANDRÉ J. Mitochondria of *Candida utilis*. *J. Cell Biol.* 54, 468, 1972.
- WALTERS J. AND VAN OS G., The dissociation and Association behavior of yeast ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 199, 453, 1970.