

Síntesis de proteínas por cloroplastos *in vitro* usando luz como fuente de energía

David E. Griffiths y José A. Lozano *

School of Molecular Sciences. University of Warwick, Coventry (England), y Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Murcia (España)

(Recibido el 22 de septiembre de 1969)

D. E. GRIFFITHS and J. A. LOZANO, *Protein Synthesis by Chloroplasts in vitro Using Light as a Source of Energy*. R. esp. Fisiol., 62, 83-88. 1970.

Light can be used as a source of energy in the protein synthesis carried out by isolated chloroplasts from young pea leaves. The light dependent incorporation requires photophosphorylation cofactors: ADP, Pi, PMS, isoascorbate.

The optimum concentrations of Mg^{+2} (12 mM), K^{+} (150 mM), mercaptoethanol (16 mM), C^{12} -aminoacids mixture (7 μ g/ml of each one), were similar to the optimum concentrations in the dark incorporation using an ATP-generating system. Chloramphenicol and Ribonuclease inhibitions were also similar in both systems.

Broken chloroplasts do not incorporate significantly C^{14} -leucine into protein.

Desafortunadamente existen muy pocos datos referentes a la síntesis de proteínas por cloroplastos aislados que realicen fotofosforilación, o sea usando luz como fuente de energía en lugar de un sistema añadido generador de ATP.** Por otra parte, algunos de los datos disponibles son bastante dispares.

GOFFEAU y BRACHET (2) y GNAMAN y KAHN (1), con cloroplastos de algas, hallaron que la luz no estimulaba la incorporación de aminoácidos. Sin embargo, SPENCER (9), con cloroplastos de espinacas, demostró que podían incorporar aminoácidos sin ATP añadido cuando se le suministraban los componentes de un sistema de fotofosforilación: ADP, fosfato, piocianina y luz. La luz, por sí sola, no tenía efecto sobre la síntesis de proteínas. Más recientemente, RAMÍREZ *et al.* (7), también con cloroplastos de espinacas,

mostraron que incorporaban aminoácidos solamente a expensas de un proceso endógeno, inducido por la luz, que tenía las características de una fotofosforilación cíclica, no inhibida por la presencia de DCMU, y señalaron que la incorporación, usando el sistema luminoso, era superior a la obtenida usando un sistema externo generador de ATP. Posteriormente, estos mismos investigadores han señalado que

* Beneficiario de una Beca de la Fundación Juan March durante la realización de parte de este trabajo.

** Abreviaturas: ATP = ácido adenosintrifosfórico. DCMU = 3-(3, 4'-diclorofenil)-1-1-dimetil urea. GTP = ácido guanosintrifosfórico. CTP = ácido citidintrifosfórico. UTP = ácido uridintrifosfórico. ADP = ácido adenosindifosfórico. PMS = metosulfato de fenazina. Pi = fosfato.

el óptimo de incorporación lo obtenían con la presencia de iones magnesio 3 mM, iones potasio 170 mM y de una mezcla de aminoácidos, mientras que la adición de GTP o de cofactores de la fotofosforilación no produjo estimulación.

Material y métodos

El procedimiento de aislamiento de los cloroplastos procedentes de hojas jóvenes de guisantes, así como las demás técnicas utilizadas, han sido descritas en otro trabajo (6).

El medio de incubación, con un volumen de 0,3 ml, de ellos 0,2 ml consistentes en la preparación de cloroplastos lavados, contenía: tampón tris pH 7,8 y 0,05 M; cloruro magnésico, 12 mM; cloruro potásico, 150 mM; mercaptoetanol, 16 mM; GTP, CTP y UTP, 0,13 mM en cada uno de ellos; ADP 1 mM; fosfato dipotásico, 8 mM, metosulfato de fenazina, 60 mM; isoascorbato, 10 mM; mezcla de los 20 aminoácidos, excepto leucina, 2 μ g de cada uno de ellos. La incubación comenzó por la adición de la C^{14} -leucina. La iluminación se realizó con lámparas Mazda Flood Light de 150 w, obteniéndose una iluminación aproximada de 170.000 lux. La temperatura se conservó constante a 25° C.

Resultados

Good *et al.* (3) señalaron las buenas condiciones del tampón Hepes para usos biológicos. Con un tampón Hepes con sorbitol 0,35 M, KALBERER *et al.* (5) obtuvie-

Tabla I. Sistema luminoso. Comparación entre el medio Honda y el Hepes para el aislamiento y suspensión de los cloroplastos.

Medio	Incorporación (c.p.m./muestra)
Honda	468
Hepes	42

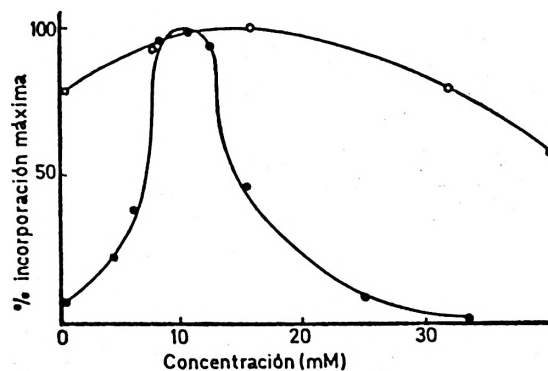


Fig. 1. Efecto del mercaptoetanol (○) y de los iones magnesio (●) sobre la síntesis de proteínas.

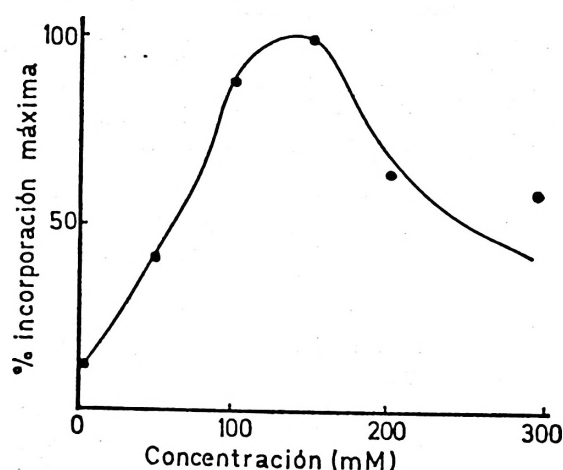


Fig. 2. Efecto de los iones potasio sobre la síntesis de proteínas.

ron unas altas velocidades de fotosíntesis en cloroplastos aislados. También RAMÍREZ *et al.* (7, 8) usaron este tampón en sus trabajos de síntesis de proteínas por cloroplastos. En nuestro sistema (tabla I), el medio Honda rindió muchos mejores resultados que el Hepes (5).

La dependencia del sistema luminoso respecto a la adición de mercaptoetanol e iones magnesio fue similar a la encontrada por nosotros (6) en el sistema oscuro (con sistema generador de ATP). En la figura 1 se puede observar tal dependencia,

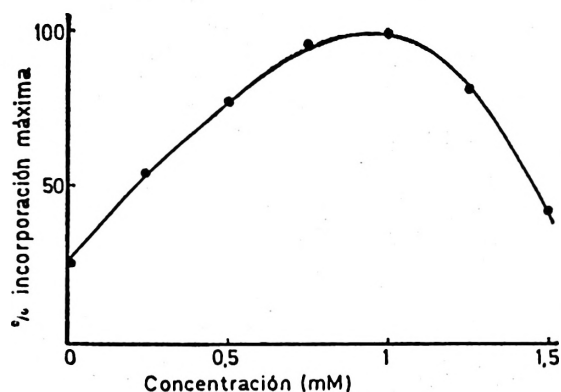


Fig. 3. Influencia del ADP sobre la síntesis de proteínas.

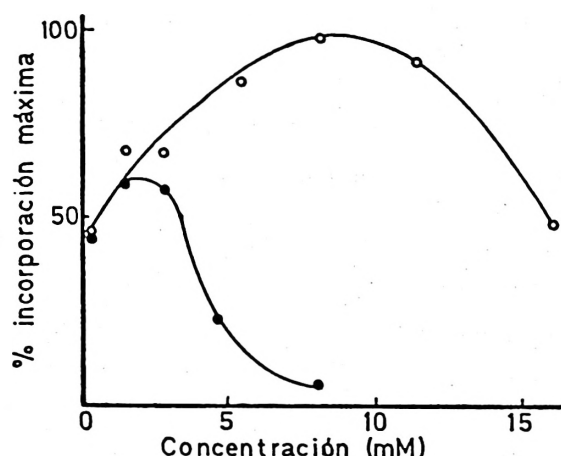


Fig. 4. Efecto de la adición de fosfato (○) o pirofosfato (●) sobre la síntesis de proteínas.

mientras que en la figura 2 se señala que el óptimo de iones potasio fue 150 mM en lugar de 100 mM en el caso del sistema oscuro.

Se necesitaron cofactores de la fotofosforilación: ADP, fosfato y metosulfato de fenazina (PMS), tal como se señala en las figuras 3, 4 y 5, respectivamente. En la figura 4 se puede comprobar que, a diferencia de lo que ocurre con cloroplastos de espinacas (5), la adición de pirofosfato tuvo peores resultados que la de fosfato, quizás porque en cloroplastos de guisantes

no actúe una pirofosfatasa tan activa como en espinacas (4). La presencia de isoascorbato mM en el medio de incubación produjo un notable aumento en la actividad del sistema de síntesis de proteínas (fig. 5). Sin embargo, la adición de 2,6-diclorofenolindofenol hasta una concentración final de 2 mM, bajó el nivel de proteínas radioactivas sintetizadas hasta el 65 % del valor normal.

Al igual que en el sistema oscuro, la síntesis de proteínas se incrementó por la presencia en el medio de incubación de los tres nucleótidos GTP, CTP y UTP en concentración 0,13 mM (fig. 6), aun cuando el tipo de dependencia (forma de la gráfica) sea algo distinta en ambos sistemas, pero la concentración óptima coincidió.

También la adición de una mezcla de aminoácidos estimuló de modo semejante a como sucedió con el sistema oscuro, la síntesis de proteínas (fig. 6).

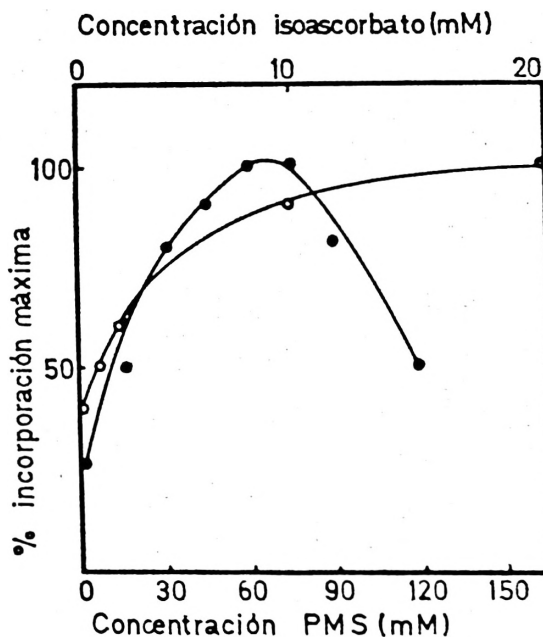


Fig. 5. Dependencia de la adición de metosulfato de fenazina (PMS) (●) y de isoascorbato (○) para la síntesis de proteínas.

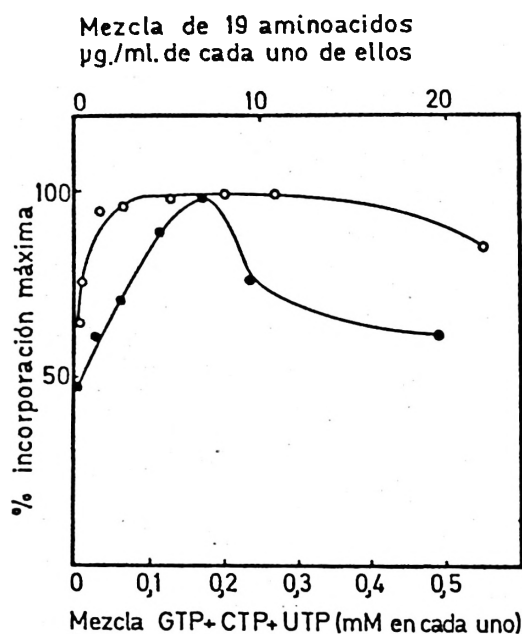


Fig. 6. Efecto de la adición de la mezcla GTP + CTP + UTP (O) o de la mezcla de C^{12} -aminoácidos (●) sobre la síntesis de proteínas.

La cinética de la síntesis de proteínas por los cloroplastos (fig. 7) mostró como nota característica que la inactivación del sistema a lo largo del tiempo fue más lenta que en el sistema oscuro, y así, entre los 60 y 80 minutos, siguió existiendo una considerable actividad, lo cual confirmaría el argumento de que al menos parcialmente la inactivación en el sistema oscuro se debía a la presencia de ATP. Desde luego, la adición al sistema luminoso de ATP 2,75 mM produjo una inhibición considerable del orden del 47 %.

Con un comportamiento más acusado que en el sistema oscuro, los cloroplastos rotos por choque hipotónico no tuvieron prácticamente ninguna capacidad sintética de proteínas.

Respecto al efecto del DCMU, fue nulo a concentración 7×10^{-7} M si la fase gaseosa era nitrógeno. Si era aire, entonces produjo una inhibición del 30 %, quizás

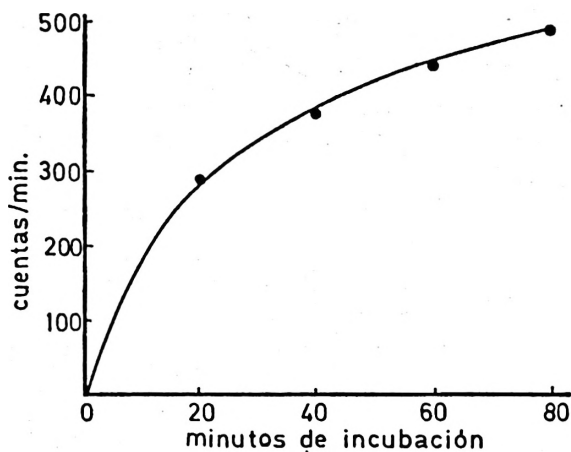


Fig. 7. Síntesis de proteínas a lo largo del tiempo de incubación.

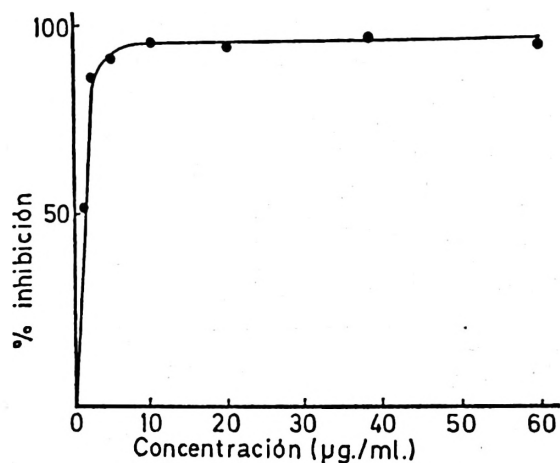


Fig. 8. Efecto inhibitor del cloranfenicol sobre la síntesis de proteínas.

debido a que al existir sustancias redox autooxidables por el oxígeno, en estas condiciones opere el sistema de fotofosforilación no cíclica inhibible por el DCMU.

Las características similares de los sistemas oscuro y luminoso fueron confirmadas también usando algunos inhibidores. Ribonucleasa inhibió el 43 % si su concentración en el sistema luminoso era 3,5 µg./ml. La inhibición por el cloranfenicol se representa en la figura 8.

Discusión

En este sistema de cloroplastos de guisantes, las dependencias respecto a iones potasio, iones magnesio, mercaptoetanol y aminoácidos añadidos fue similar a la existente en el sistema oscuro descrito en los trabajos previos. Por otra parte, y en contraste con los datos de RAMÍREZ *et al.* (8), existe una gran dependencia respecto a la adición de cofactores de la fotofosforilación como ADP, fosfato, metosulfato de fenazina e isoascorbato. Comprobamos que tal dependencia seguía existiendo con cloroplastos aislados de hojas de tres semanas de edad. Las diferencias existentes entre los sistemas citados, el de espinacas de RAMÍREZ *et al.* (7) y el de guisantes nuestro, pueden ser diferencias propias de ellos o reflejo de las diferentes condiciones utilizadas. En el caso particular del medio de aislamiento, el tampón Hepes fue muy poco eficaz con nuestro sistema, en contraste con los buenos resultados que rindió en el sistema de espinacas. Por otra parte, las incorporaciones que hemos obtenido en el sistema luminoso han sido inferiores siempre, aproximadamente, en un 40 % a las obtenidas con el sistema oscuro. Ello, en contraste también con los datos de RAMÍREZ *et al.* (8), se podría deber a que en la preparación de cloroplastos puede existir una cierta proporción de ellos rotos o deteriorados, que al no realizar buenas fotofosforilaciones no contribuyen a la consiguiente síntesis proteínica, mientras que con el sistema oscuro el ATP es suministrado externamente, por lo cual tales cloroplastos rotos o deteriorados pueden llevar a cabo, aun con eficacia reducida, la incorporación de aminoácidos. Otra posible razón pudiera ser que nuestros resultados los obtenemos comparando los dos sistemas, luminoso y oscuro, en sus condiciones óptimas de actuación, mientras que en el caso de los cloroplastos de espinacas, RAMÍREZ *et al.* (7) no especificaron cuáles eran las condiciones óptimas de incorporación del sistema oscuro.

RAMÍREZ *et al.* (7) también señalaron que el ATP producido en la fotofosforilación cíclica era suficiente para la realización de la síntesis de proteínas. Al igual que ellos, nuestros datos confirman que en atmósfera anóxica, el DCMU no inhibe, pero si la fase gaseosa era aire, la incorporación de aminoácidos fue superior en un 15 % y en esta situación la apreciable inhibición que provocó la presencia de DCMU (30 %) se podría deber a la inhibición de una fotofosforilación no cíclica que operase a fin de reducir las sustancias redox autooxidables por el oxígeno, en cuyo caso la inhibición podría ser reflejo de una caída en la producción de ATP procedente de la fotofosforilación no cíclica o simplemente consecuencia de que en presencia de DCMU y, por tanto, inhibición del proceso no cíclico, se produzca una modificación del estado del potencial redox del medio de incubación, debido a lo cual la fotofosforilación cíclica opere con un menor rendimiento. En todo caso, sin tener la certeza de que en el sistema luminoso de incubación el factor limitante de la incorporación de aminoácidos es la velocidad de fotofosforilación, no es muy seguro poder afirmar, basados en el efecto del DCMU, que por sí sola la fotofosforilación cíclica proporciona el ATP necesario para la síntesis de proteínas por los cloroplastos.

Resumen

El sistema de síntesis de proteínas por cloroplastos de guisantes *in vitro* usando luz como fuente de energía, ha mostrado ser dependiente de cofactores de la fotofosforilación: ADP, fosfato, metosulfato de fenazina e isoascorbato. Los requerimientos de iones magnesio, iones potasio, mercaptoetanol, mezcla de aminoácidos son similares a los del sistema oscuro, así como el efecto de inhibidores como cloranfenicol y ribonucleasa.

Bibliografía

1. GNAMAN, A. y KAHN, J. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **142**, 486, 1967.
2. GOFFEAU, A. y BRACHET, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 302, 1965.

3. GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINTER, W., CONNOLLY, T. N., IZAWA, S. y SINGH, R. M. M.: *Biochemistry*, **5**, 467, 1966.
4. HEPPEL, C. A.: En *Methods in Enzymology*, Ed. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., vol. 2, pág. 570. Academic Press, Nueva York, 1955.
5. KALBERER, P. B., BUCHANAN, B. B. y ARNON, D. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 1542, 1967.
6. LOZANO, J. A. y GRIFFITHS, D. E.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 61, 1970.
7. RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. y ARNON, D. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 606, 1968.
8. RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. y ARNON, D. I.: *Congreso de las FEBS*, Madrid, Abstract núm. 905, 1969.
9. SPENCER, D.: *Arch. Biochem. and Biophys.*, **111**, 381, 1965.