

HIDROXILACION DE LA PROLINA Y DE LA LISINA EN LA BIOSINTESIS DE COLAGENO (*)

Proline and lysine hydroxylation in collagen biosynthesis.

ALFONSO CORONADO, ELVIRA MARDONES y JORGE ALLENDE.

Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile.

Recibido para su publicación el 22 de Abril de 1964.

RESUMEN

En un sistema libre de células que contiene amino-acil-sRNA-sintetasas (enzimas de pH 5) y ácido ribonucleico de transferencia (sRNA) obtenidos de embriones de pollo y prolina- C^{14} se aísla un aminoacil- C^{14} -sRNA. El análisis cromatográfico de los productos de la hidrólisis alcalina de este compuesto demostró la presencia de prolina y de hidroxiprolina marcadas. La hidroxiprolina representó el 20% del total de la actividad incorporada en el sRNA.

Experimentos análogos realizados con lisina- C^{14} demostraron la aparición de hidroxilisisina en proporción de un 5% del total de la actividad incorporada en el sRNA.

El sRNA del hígado de rata y de la levadura en iguales condiciones que el sRNA de embrión de pollo se muestran capaces de incorporar lisina- C^{14} , pero no se obtiene el hidroxiaminoácido correspondiente.

En condiciones anaeróbicas, la hidroxilación de la prolina disminuyó a menos de un 5%. El prolil-sRNA aislado en estas condiciones y reincubado en presencia de oxígeno en el sistema de embrión de pollo mencionado, se mostró susceptible de ser hidroxilado, en tal forma que se obtuvo prolina e hidroxiprolina en proporción semejante a los testigos.

Estos resultados sugieren que los procesos de hidroxilación de la prolina y de la lisina que ocurren en la biosíntesis del colágeno, tienen un lugar en la etapa en que estos aminoácidos se encuentran unidos al sRNA y que esta hidroxilación es dependiente de un sRNA específico que se encuentra en las preparaciones de embrión de pollo y no en las otras preparaciones ensayadas. Estos resultados hacen pensar en que existen por lo menos dos sRNA para la prolina y dos para la lisina y que sólo uno de ellos permite la hidroxilación. Esto implicaría una ambigüedad de uno de los codones en la clave genética de la prolina y de la lisina, el cual podría incorporar indiferentemente el aminoácido o su respectivo hidroxiaminoácido.

INTRODUCCIÓN

Hace algunos años Stetten *et al* (1) encontraron que en ratas jóvenes la administración de prolina N^{15} determinaba la aparición de hidroxiprolina marcada en las proteínas corporales. Posterior-

mente se demostró que la hidroxiprolina N^{15} era veinte veces menos efectiva que la prolina como precursora de la hidroxiprolina del colágeno (2). Estos hechos, que han sido ampliamente confirmados por diferentes autores (3, 4, 5), indican que la hidroxiprolina del colágeno deriva esencialmente de la prolina sin pasar por el estado de hidroxiprolina libre.

La importancia de este descubrimiento reside en que constituye una excepción

(*) Esta investigación fue financiada, en parte, por la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Proyecto 62-26) y por la Fundación Rockefeller (Grant 60038), según un programa conjunto, y en parte por la Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, Proyecto 64.

Abreviaturas que aparecen en el texto: sRNA, ácido ribonucleico de transferencia; ATP, adenosin 5' trifosfato; CTP, citidin 5' trifosfato; TRIS, tris (hidroximetil)-aminometano; DNasa, desoxiribonucleasa; RNasa, ribonucleasa; mRNA, ácido ribonucleico mensajero; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPkinasa, fosfoenolpiruvatoquinasa.

con respecto a lo que se observa generalmente en la síntesis de proteínas, la que se realiza comúnmente a partir de los aminoácidos libres que las constituyen (5). El único caso semejante hasta ahora encontrado es la hidroxilisina del colágeno, la que se forma a partir de lisina y no de la hidroxilisina libre (7,8).

La mayor parte de los trabajos mencionados han sido realizados en animales enteros, pero en los últimos años se ha trabajado con éxito sistemas *in vitro*, utilizando preparaciones tales como cortes de tumor inducido por carrageenan en cobayos (9), cortes de cartílago (10) y más recientemente Peterkofsky *et al.* (11, 12, 13, 14) han informado de un sistema libre de células obtenido de embrión de pollo capaz de hidroxilar e incorporar la prolina en una proteína que tiene muchas propiedades físicas y químicas semejantes al colágeno.

Como todos los trabajos mencionados son concordantes en el sentido que tanto la hidroxiprolina como la hidroxilisina libres no constituyen intermediarios en la síntesis del colágeno, es necesario aceptar que sus precursores, la prolina y la lisina, deben hidroxilarse en alguna de las etapas del proceso de síntesis.

Estudios recientes parecen demostrar que la molécula de colágeno se sintetiza de acuerdo con el esquema propuesto para la biosíntesis de las proteínas en general (9, 11, 12, 13, 14). Por lo tanto, la hidroxilación podría suceder ya sea cuando el aminoácido ha sido activado y se encuentra formando parte del complejo aminoacil-adenilato-enzima, ya sea cuando ha sido transferido al ácido ribonucleico soluble formando un aminoacil-sRNA o, por último, cuando ha sido incorporado en la cadena polipeptídica.

Respecto a esta última posibilidad, se ha tratado infructuosamente de encontrar una proteína o polipéptido semejante al colágeno pero sin hidroxiprolina (15, 16). Sin embargo, trabajos recientes de Peterkofsky *et al.* (14) parecen demostrar indirectamente que la hidroxilación de la prolina durante la síntesis del colágeno podría suceder después de su incorporación en la cadena polipeptídica.

Por otra parte, los estudios acerca de la incorporación de prolina en el colágeno del granuloma producido por carrageenan en cobayos escorbúticos (17, 18), así como la presencia de hidroxiprolina no unida a proteína, que se observa durante la inhibición que ocasiona el corti-

sol en la biosíntesis del colágeno en cortes de cartílago (10) y durante la inhibición que produce la puomicina sobre la síntesis del colágeno en tejido óseo en animales enteros (19), sugieren fuertemente que la hidroxiprolina se encuentra unida a un intermediario en una etapa previa a la formación de la molécula de colágeno.

Finalmente, Manner y Goul (20), Kalf (21) y nuestro grupo (22, 23, 24, 25) han informado haber aislado en un sistema de embrión de pollo un hidroxiprolil-sRNA y un hidroxilisil-sRNA, a partir de prolina y lisina marcadas con C^{14} .

MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones de pollo fueron donados gentilmente por el Departamento de Virología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Chile.

El ATP, el glutatión reducido, el TRIS (Sigma 121) y la ninhidrina se obtuvieron de Sigma Chemical Co; la prolina- C^{14} (33 mc/mmole), de Nuclear Chicago Corp; la lisina- C^{14} (140 mc/mmole), de Schwartz Bio Research Inc.; la prolina, la hidroxiprolina, la lisina y la hidroxilisina, de Mann Chemical Co; el 2-Mercaptoetanol, de Eastman Kodak Co; el acetato de magnesio, el n-butanol, el ácido acético, el fenol y el resto de los reactivos generales, de E. Merck, y la resina Dowex 50-x8, de Bio-Rad Laboratories.

Preparación de enzimas de pH 5. Todas las operaciones se realizaron entre 0° y 4°C. En cada preparación se emplearon 12 a 30 embriones de pollo de 9 a 12 días cuyo peso varió entre 2 y 5 g.

Inmediatamente después de extraídos, los embriones se lavaron con mezcla de homogenización y se homogenizaron en un aparato Lourdes durante 30 segundos con dos volúmenes de la siguiente mezcla: amortiguador TRIS pH 7,8 0,01 M; acetato de magnesio 0,01 M; cloruro de potasio 0,06 M, y mercaptoetanol 0,006 M. El homogenizado se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se centrifugó nuevamente a 105.000 g durante 120 minutos. Este nuevo sobrenadante se precipitó a pH 5,2 con ácido acético 1 N, y se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos. El precipitado de esta centrifugación se suspendió con un homogenizador manual de vidrio en la siguiente mezcla: amortiguador TRIS pH 7,8 0,01 M, acetato de magnesio 0,01 M, cloruro de potasio 0,06 M, y glutatión 0,03 M. El pH se ajustó a 7,5 con amortiguador TRIS pH 7,5 2 M.

La concentración final de proteína de la preparación fue de 20 a 25 mg por ml.

Preparación de sRNA. Se extrajo de embriones de pollo de 12 días de edad, aplicando el procedimiento propuesto por Rosenbaum y Brown (26) con las siguientes modificaciones: la preparación después de la ex-

tracción con fenol se precipitó con dos volúmenes de etanol 95% a -20°C , se dejó durante 6 horas a -20°C y se centrifugó a 15.000 g durante 20 minutos. El precipitado se extrajo con cloruro de sodio 1 M a 0°C durante la noche, luego se centrifugó a 15.000 g y el sobrenadante se precipitó nuevamente con etanol 95% a -20°C . Se dejó durante 6 horas aproximadamente a -20° y se centrifugó en la forma ya indicada. Este último precipitado se secó y se disolvió en agua bidestilada y se digirió con DNasa (20 μg por ml) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Finalmente se dializó contra agua bidestilada durante la noche.

La concentración de la solución se determinó por su densidad óptica a 260 $m\mu$, aceptando que 20 unidades de D.O. equivalen a 1 mg de sRNA por ml de solución.

Mezcla de incubación. Las incubaciones se llevaron a cabo directamente en los tubos de centrifuga a 37°C durante 30 minutos. El volumen de incubación varió en los diversos experimentos.

Cada mililitro de la mezcla contenía las siguientes cantidades de substancias: amortiguador TRIS pH 7,0, 30 μmoles ; ATP, 2 μmoles ; acetato de magnesio, 5 μmoles ; glutatión, 2 μmoles ; sRNA, 1 mg y enzimas de pH 5 entre 6 y 10 mg.

La concentración y la actividad específica de la prolina C^{14} y de la lisina C^{14} fueron diferentes en los diversos experimentos.

La reacción se detuvo al final del tiempo de incubación agregando dos volúmenes de una solución fría de etanol al 67% con cloruro de sodio 0,5 M. La mezcla se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 0°C y el precipitado se lavó por resuspensión cuatro veces en la solución etanol-sal.

El precipitado final se disolvió en hidróxido de amonio 1,5 N y en una alícuota de esta solución se midió la radioactividad en un contador de flujo.

En algunos experimentos, la incubación se detuvo con fenol saturado en agua y se siguió el método de Gierer y Schram (27) para extraer el RNA de la preparación.

Separación y medición de prolina e hidroxiprolina. El precipitado final obtenido de la incubación se hidrolizó con hidróxido de amonio 2N a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, previa neutralización con ácido clorhídrico, se precipitó con la solución etanol-sal antes mencionada y con la misma solución se lavó por resuspensión hasta que no existiera radioactividad en los sobrenadantes.

El precipitado se disolvió nuevamente en hidróxido de amonio y una alícuota se colocó en el contador para comprobar que no existía radioactividad. En caso contrario, la operación se repitió hasta obtener ausencia de radioactividad.

Los sobrenadantes de la precipitación y de los lavados se juntaron y se evaporaron a sequedad; luego se disolvieron en aproximadamente 5 ml de agua bidestilada y se acidificaron a pH 2,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. Se agregaron como portadores, prolina e hidroxiprolina no marcadas, 10 μmoles de ca-

da una, y se les retiraron las sales en una columna de Dowex 50-X8 forma H de la cual se eluyeron con hidróxido de amonio 2N. Este eluido se volvió a concentrar por evaporación y se sometió a cromatografía en papel.

Para la cromatografía se usó papel Whatman N 1 y como solvente una mezcla de n-butanol, ácido acético, agua (63 : 27 : 10). Se corrió en forma descendente durante 12 horas. Previo revelado e identificación por medio de ninhidrina e isatina de los testigos marginales, que dieron R_f 0,41 para prolina y R_f 0,27 para hidroxiprolina, el papel se cortó en bandas y se eluyó con agua bidestilada durante la noche. Los eluidos se concentraron por evaporación y su radioactividad se midió en un contador de flujo.

En otra serie de experimentos, los sobrenadantes desprovistos de sales y concentrados fueron analizados con respecto a su contenido de prolina e hidroxiprolina, usando una columna de Dowex 50-X8 forma Na^+ según el método de Moore y Stein (28).

La recuperación final del número total de cuentas medidas inicialmente en los sobrenadantes fue, en todos los experimentos, alrededor de un 50%. Sin embargo, en las cromatografías en papel el número de cuentas eluidas de las bandas correspondientes a las manchas de prolina e hidroxiprolina representaban el 94% del total de cuentas recuperables de todo el papel.

Separación y medición de lisina e hidroxilisina. En los experimentos con lisina se procedió esencialmente con igual metodología, sólo que en la separación final de los aminoácidos se usó el método de Piez (29).

RESULTADOS

Estudio del sistema de incubación.

Al comienzo de este trabajo se partió de los datos publicados por Berg *et al.* (30) acerca de la incorporación de aminoácidos en el ácido ribonucleico de transferencia; pero ensayos progresivos nos indujeron a modificar el sistema adaptándolo a las condiciones óptimas para embrión de pollo, que son las que aparecen expuestas en Material y Métodos.

La actividad de las enzimas de pH 5 varió en las diferentes preparaciones; pero, en general, se obtuvo una carga de 0,03 a 0,12 μmoles de aminoácidos marcados por miligramo de sRNA. Hay que considerar, sin embargo, que las preparaciones enzimáticas contienen una cantidad apreciable, que no hemos determinado, de prolina, lo que implica una dilución del isótopo y, por otra parte, la preparación de sRNA de embrión de pollo puede no ser lo suficientemente pura,

lo que induciría a error en la apreciación de la cantidad colocada en el sistema.

En estas condiciones, considerando como 100 la actividad máxima del sistema, la incorporación de radioactividad en el material precipitable con etanol depende esencialmente de la preparación de enzimas de pH 5, del sRNA agregado y del ATP. (Tabla I). La pequeña cantidad de cuentas incorporadas en ausencia de sRNA adicionado, puede atribuirse a la presencia de sRNA en la preparación de enzimas de pH 5, lo que es un hecho conocido (31). Por este motivo se practicó una incubación en presencia de RNasa, y no se encontraron cuentas detectables en el material precipitado.

Formación de hidroxiprolil-sRNA.

En los primeros experimentos realizados se usó una prolina C¹⁴ de una actividad específica de 10,8 y el sRNA marcado se aisló por el método de Gierer y Schram ya mencionado, con el objeto de reconocer que el producto marcado obtenido en la reacción se comportaba como ácido ribonucleico. (Tabla II, experimentos 1 y 2). Sin embargo, la gran pérdida de marcación, comparada con la radiactivi-

TABLA I

Incorporación de Prolina-C¹⁴ en Acido Ribonucleico de Transferencia.

Medio de incubación	Incorporación %
Sistema completo (*)	100
Sistema completo sin ATP	50
Sistema completo sin PEP, PEPkinasa	91
Sistema completo sin ATP, PEP, PEPkinasa	0
Sistema completo sin CTP	92
Sistema completo sin sRNA	5
Sistema completo con RNasa	0

(*) Sistema completo (contenido por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μmoles; ATP 2 μmoles; acetato de magnesio 5,0 μmoles; glutatión 2,0 μmoles; PEP 4,2 μmoles; PEPkinasa 20,0 μg; CTP 0,8 μmoles; prolina C¹⁴ (33 mc/mmol) 1,2 mμmoles; sRNA de embrión de pollo 1,0 mg; enzimas de pH 5 de embrión de pollo 6 mg.

Volumen incubado, 1,0 ml.
Incubación, 30 minutos a 37°C.

TABLA II

Hidroxilación de Prolina C¹⁴ en el Sistema de Embrión de Pollo.

	Prolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina %
Experimento 1	552	140	20,2
Experimento 2	171	39	18,5
Experimento 3	623	158	20,0
Testigo (Sobrenadante de la incubación)	1944	4	0,2

Medio de incubación (contenido por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μmoles; ATP 2,0 μmoles; acetato de magnesio 5,0 μmoles; glutatión 2,0 μmoles; prolina C¹⁴ (10,8 mc/mmol) en experimentos 1 y 2, (33 mc/mmol) en experimento 3, 1,2 mμmoles; sRNA 1,0 mg; enzimas de pH 5: 4,0 a 6,0 mg.
Volumen incubado, 10,0 ml.
Incubación, 30 minutos a 37°C.

dad del producto aislado por precipitación con la solución de etanol-sal, nos hizo desistir del método de extracción por fenol.

El análisis de la hidrólisis alcalina del producto formado, aislado por uno u otro método, dio resultados equivalentes, encontrándose en la hidroxiprolina C¹⁴ aproximadamente el 20% del total de las cuentas recuperadas.

Formación de hidroxilisil-sRNA.

Los experimentos ya descritos fueron repetidos usando lisina C¹⁴ de 140 mc/mmol. Se encontró hidroxilisina C¹⁴ equivalente a un 5% del total de las cuentas recuperadas. (Tabla III).

Incorporación e hidroxilación de lisina C¹⁴ en sRNA de diferentes orígenes.

Estudiando la especificidad del sistema con relación al sRNA de diferentes orígenes, se encontró que el sistema de embrión de pollo era capaz de incorporar lisina C¹⁴ en el sRNA de levadura, obtenida del comercio, y que, por el contrario, el sRNA de hígado de rata incorporaba muy poco o nada. El sRNA obtenido de estas incubaciones se analizó previa hidrólisis alcalina, y no se encontró hi-

TABLA III

Hidroxilación de Lisina C¹⁴ en el Sistema de Embrión de Pollo.

	Lisina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxilisina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxilisina %
Experimento 1	9100	480	5.0
Experimento 2	18311	972	5.4
Testigo (Sobrenadante de la incubación)	10000	0	0

Medio de incubación (contenido por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μ moles; ATP 2,0 μ moles; glutatión 2,0 μ moles; acetato de magnesio 5,0 μ moles; lisina C¹⁴ (140 mc/mol) 1,64 m μ moles; sRNA 1,0 mg; enzimas de pH 5: 3,6 mg.
Volumen incubado, 10,0 ml.
Incubación, 30 minutos a 37°C.

droxilisina marcada, aunque en el caso de los experimentos realizados con sRNA de levadura se logró detectar una pequeña cantidad de hidroxilisina-C¹⁴, la que se atribuyó a la presencia del sRNA de embrión de pollo en las preparaciones de enzimas de pH 5. En efecto, en los experimentos con prolina-C¹⁴ habíamos observado que en ausencia de sRNA de embrión de pollo se incorporaba cierta cantidad de aminoácido marcado que des-

aparecía en presencia de RNasa. Tratando de analizar este hecho, se incubó sRNA de levadura con una preparación de enzimas de pH 5 de hígado de rata. La incorporación de lisina-C¹⁴ fue muy eficiente, pero no se encontró hidroxilisina en el análisis del producto final formado. El lisil-C¹⁴-sRNA se extrajo con fenol y se reincubó con el sistema de enzimas de pH 5 de embrión de pollo, en presencia de un exceso de lisina no marcada y tampoco se encontró hidroxilisina-C¹⁴. (Tabla IV).

Finalmente se incubó la preparación de enzimas de pH 5 con el resto del sistema en presencia de RNasa y no se encontró incorporación en el precipitado final de la incubación, ni se detectó hidroxilisina en el sobrenadante.

Obtención de un prolil-C¹⁴-sRNA en condiciones anaeróbicas y su hidroxilación en presencia de oxígeno.

Como se sabe que el sistema hidroxilante de la prolina, presente en los cortes de tejidos, utilizaba O¹⁸ molecular en el proceso de hidroxilación (17, 32, 33), se estudió el efecto de la anaerobiosis en el sistema descrito.

La incubación se hizo en tubos de Thumberg llenos con helio.

Los resultados demostraron que en anaerobiosis la aparición de la hidroxiprolina unida a sRNA fue sólo aproxima-

TABLA IV

Incorporación e Hidroxilación de Lisina C¹⁴ en sRNA de Diferentes Orígenes.

sRNA	Sistema de incubación Enz. pH 5	Lisina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxilisina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxilisina %
Embrión de pollo	Embrión de pollo	18311	972	5,4
Levadura	Embrión de pollo	20000	180	0,9
Levadura	Hígado de rata	49340	0	0
Lisil C ¹⁴ -sRNA (levadura)	Embrión de pollo	12500	0	0

Medio de incubación (concentración por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μ moles; ATP 2,0 μ moles; acetato de magnesio 5,0 μ moles; glutatión 2,0 μ moles; lisina C¹⁴ (140 mc/mmol) 1,64 m μ moles; sRNA 1,0 mg; enzimas de pH 5: 3,6 mg. En el último experimento se agregó lisina no marcada 1,0 μ mol.
Incubación: 30 minutos a 37°C.

TABLA V

Incubación Anaeróbica de Prolina C¹⁴ en el Sistema de Embrión de Pollo.

	Prolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina %
Experimento 1	1623	58	3,4
Experimento 2	1172	31	2,5
Experimento 3	2197	87	3,8
Testigos (incubación aeróbica)	623	158	20,0

Medio de incubación (concentración por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μmoles; ATP 2,0 μmoles; acetato de magnesio 5,0 μmoles; glutatión 2,0 μmoles; prolina C¹⁴ (33 mc/mmol) 1,2 mμmoles; sRNA 1,0 mg; enzimas de pH 5:6,0 mg. Volumen incubado, 10,0 ml. Incubación, 30 minutos a 37°C.

damente un 5% del total de cuentas recuperadas, mientras que en los testigos incubados en condiciones aeróbicas se encontró aproximadamente 20%. (Tabla V). La incorporación de prolina-C¹⁴ en el sRNA en anaerobiosis fue, sin embargo, igual o superior a la que se observó en los testigos. De esta manera pudimos obtener un aminoacil-sRNA marcado con prolina-C¹⁴ y con baja proporción de hidroxiprolina-C¹⁴.

El prolil-C¹⁴-sRNA aislado se reincubó con el sistema de embrión de pollo en condiciones de aerobiosis y con un exceso de prolina no marcada, comprobándose que la prolina-C¹⁴ unida al sRNA podía hidroxilarse, pues se obtuvo una alta proporción de hidroxiprolina en los análisis finales. (Tabla VI). Es de notar que durante la reincubación una alta proporción, que varió entre un 40 y un 50%, de la actividad unida al sRNA se descargó de tal modo que pudo recuperarse en los sobrenadantes de la precipitación y en los líquidos de lavado. El análisis cromatográfico demostró la presencia de hidroxiprolina-C¹⁴, pero siempre en proporción menor que la encontrada en el análisis del aminoacil-sRNA aislado.

DISCUSIÓN

La hidroxiprolina y la hidroxilisina son aminoácidos que se encuentran casi ex-

TABLA VI

Hidroxilación de Prolil C¹⁴-sRNA en el Sistema de Embrión de Pollo.

	Prolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina C ¹⁴ c.p.m.	Hidroxiprolina %
Obtenido en incubación anaeróbica	2197	87	3,8
Reincubado en condiciones aeróbicas	893	284	24,0

Medio de incubación (concentración por ml): amortiguador TRIS pH 7,0 30,0 μmoles; ATP 2,0 μmoles; acetato de magnesio 5,0 μmoles; glutatión 2,0 μmoles; prolina no marcada 1,0 μmoles; aminoacil C¹⁴-sRNA 1,0 mg; enzimas de pH 5:6,0 mg. Volumen incubado, 5,0 ml. Incubación, 20 minutos a 37°C.

clusivamente en el colágeno. En cuanto a su biosíntesis, no se ha podido demostrar ninguna vía diversa de la hidroxilación en el curso de la formación de esta molécula. Por este motivo conviene estudiar la hidroxilación de ambos aminoácidos en conjunto con la biosíntesis del colágeno.

Estos hidroxiaminoácidos no son incorporados en el colágeno directamente, sino que a través de sus precursores, la prolina y la lisina. Por otra parte la proporción en que se encuentran el hidroxiaminoácido y su precursor dentro de la molécula de colágeno puede variar, como está demostrado por lo menos en el caso de prolina, en los casos de carencia de ácido ascórbico o en condiciones de anaerobiosis (14, 17, 18). Todos estos hechos obligan a plantear un problema de orden general, respecto a la clave que determina la secuencia de los aminoácidos dentro de la molécula de colágeno.

El hallazgo de hidroxiprolil-sRNA e hidroxilisil-sRNA en el sistema de embrión de pollo empleado en nuestros experimentos, en concordancia con lo encontrado por otros investigadores (20, 21) habla en favor de la hipótesis (10, 17, 18, 19) de que la hidroxilación de la prolina y la lisina sucedería en una etapa previa a su incorporación en la molécula de colágeno. Si esta hipótesis fuera verdadera, se plantearían dos nuevas

posibilidades, a saber: que la hidroxilación ocurra durante la etapa de la activación de los aminoácidos o bien cuando éstos han sido ya incorporados en el sRNA.

Los resultados de nuestros experimentos no nos permiten eliminar la primera posibilidad. Sin embargo, como en las incubaciones hechas en presencia de RNasa no fue posible detectar hidroxiaminoácidos marcados en el material precipitable ni en el sobrenadante de la reacción, esta posibilidad aparece muy poco probable. La misma consideración vale para la posibilidad de que existiera una reacción de hidroxilación intermedia, previa a la formación del complejo aminoaciladenilato-enzima.

En cambio, el aislamiento de los hidroxiaminoacil-sRNA, la dependencia de la reacción de hidroxilación de la presencia de sRNA y más aún de un sRNA específico que se encuentra en las preparaciones de embrión de pollo y no en las de levadura, y finalmente, el hecho de que la prolina ya incorporada en el sRNA pueda ser hidroxilada, nos inclinan a aceptar la segunda posibilidad.

El hecho de que un aminoácido unido al sRNA pueda ser transformado en otro e incorporado en la molécula de proteína empleando, por decirlo así, una clave prestada, ha sido observado en otro tipo de experimentos por Chapeville *et al.* (34), lo que demuestra además que la especificidad de la incorporación de un aminoácido en la proteína depende solamente del sRNA.

La ubicación del proceso de hidroxilación que hemos considerado más probable implicaría una situación semejante y plantearía, por lo tanto, un caso de am-

bigüedad en la clave para prolina y su correspondiente hidroaminoácido, lo mismo que para la lisina y la hidroxilisina, aminoácidos que podrían ser incorporados indiferentemente en un mismo sitio de la molécula proteica.

Como la prolina y la lisina son aminoácidos que se encuentran ampliamente distribuidos en toda clase de proteínas y, por el contrario, la hidroxiprolina y la hidroxilisina se encuentran solamente en el colágeno, se hace indispensable postular la existencia de por lo menos dos sRNA diferentes para cada uno de estos aminoácidos; uno de los cuales no permitiría la reacción de hidroxilación y cuya clave sería universal para todas las proteínas incluyendo el colágeno, y otro que sería compatible con la reacción de hidroxilación, posterior y su clave existiría exclusivamente en el RNA mensajero que informa la secuencia de la molécula de colágeno.

Esta posible ambigüedad de la clave genética del colágeno podría no ser necesaria si en condiciones normales la reacción de hidroxilación estuviera fuertemente desplazada en el sentido de la formación de hidroxiaminoacil-sRNA.

En el esquema que aparece en la Fig. 1 se ha resumido, para mayor simplicidad, la hipótesis planteada en esta discusión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. L. Lukens de la Universidad de Yale por su ayuda y sugerencias en las etapas iniciales de este trabajo, al Dr. Guillermo Contreras del Departamento de Virología de la Escuela de Medicina por haberles proporcionado los embriones de pollo empleados en esta investigación, y a las señoritas María Matamala y Lucinda Núñez por su eficiente ayuda técnica.

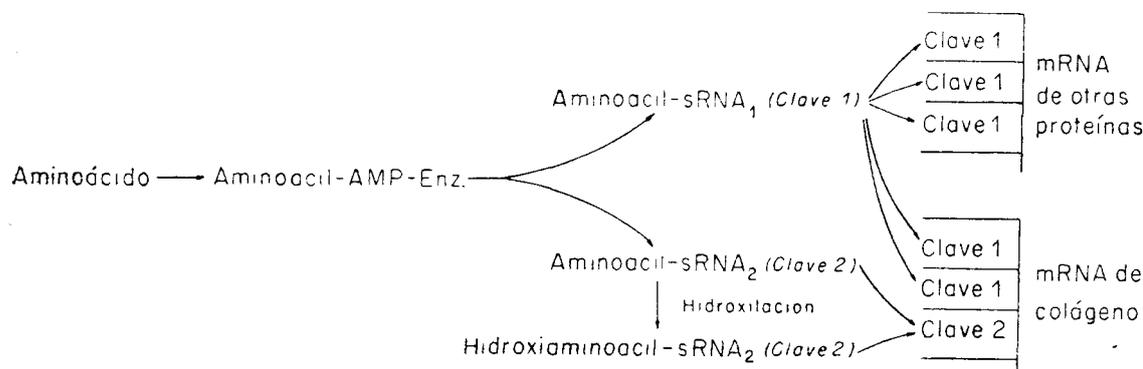


FIG. 1. Representación esquemática de la incorporación hipotética de prolina e hidroxiprolina en proteína.

SUMMARY

A cell-free system composed of aminoacyl-RNA synthetases (pH 5 enzymes) and soluble RNA from chick embryos after incubation with C^{14} -proline incorporates radioactivity into sRNA. After alkaline hydrolysis of the product chromatographic analysis of the radioactive material shows the presence of radioactive proline and hydroxyproline. The hydroxyproline counts were 20% of the total radioactivity bound to the sRNA. (Tables I and II).

Analogous experiments performed with C^{14} -lysine likewise showed the appearance of hydroxylysine (5% of the bound radioactivity) linked to the sRNA. (Table III).

When sRNA from other sources such as yeast and rat liver were utilized, incorporation of radioactivity was obtained but no hydroxyaminoacids could be demonstrated. (Table IV).

Under anaerobic conditions the amount of hydroxyproline was reduced to less than 5% of the counts. The C^{14} -prolyl-sRNA isolated after anaerobic incubation was reincubated in the presence of oxygen with the chick embryo system in the presence of added C^{12} -proline as a trapping agent against discharging of the radioactive compound. The product isolated after this incubation contained approximately 20% of hydroxyproline which is similar to the control values. (Tables V and VI).

These results suggest that the hydroxylation of lysine and proline for collagen biosynthesis occurs at the level of the aminoacyl-sRNA. The hydroxylation seems to be dependent on a specific sRNA which is present in the chick embryo system but not in yeast.

To explain these results a proposal has been made of the existence of two sRNA specific for each of these aminoacids, in only one of which could occur the hydroxylation reaction.

This introduces a problem of possible ambiguity in the genetic code for proline and lysine in collagen biosynthesis.

REFERENCIAS

- 1.—STETTEN, M. R. y SCHOENHEIMER, R.—*J. Biol. Chem.* **153**:113, 1944.
- 2.—STETTEN, M. R.—*J. Biol. Chem.* **181**:31, 1949.
- 3.—FITTON JACKSON, S. y SMITH, R.—*J. Biophys. and Biochem. Cytol.* **144**:556, 1956.
- 4.—WOLF, G. y BERGER, C. R. A.—*J. Biol. Chem.* **230**:231, 1958.
- 5.—GREEN, N. M. y LOWTHER, D. A.—*Biochem. J.* **71**:55, 1959.
- 6.—LOFTFIELD, R. B.—*Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **8**:347, 1957.
- 7.—SINEX, M. F. y VAN SLYKE, D. D.—*J. Biol. Chem.* **216**:245, 1955.
- 8.—PIEZ, K. A. y LIKINS, R. C.—*J. Biol. Chem.* **229**:101, 1957.
- 9.—LOWTHER, D. A.; GREEN, N. M. y CHAPMAN, J. A.—*J. Biophys. and Biochem. Cytol.* **10**:373, 1961.
- 10.—DAUGHADAY, W. H. y MARIZ, I. K.—*J. Biol. Chem.* **237**:2831, 1962.
- 11.—PROCKOP, D. J.; PETERKOFKY, B. y UDENFRIEND, S.—*J. Biol. Chem.* **237**:1581, 1962.
- 12.—PETERKOFKY, B. y UDENFRIEND, S.—*Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **6**:184, 1961.
- 13.—PETERKOFKY, B. y UDENFRIEND, S.—*Federation Proc.* **21**:169, 1962.
- 14.—PETERKOFKY, B. y UDENFRIEND, S.—*J. Biol. Chem.* **238**:3966, 1963.
- 15.—ROBERTSON, W. VAN B. y SCHWARTZ, B.—*J. Biol. Chem.* **201**:689, 1953.
- 16.—GOULD, B. S. y WOESSNER, J. F.—*J. Biol. Chem.* **226**:289, 1957.
- 17.—STONE, N. y MEISTER, A.—*Nature* **194**:555, 1962.
- 18.—ROBERTSON, W. VAN B.; HIWETT, J. y HERMAN, C.—*J. Biol. Chem.* **234**:105, 1959.
- 19.—JOHNSTON, C. C., Jr.—*J. Lab. Clin. Med.* **62**:889, 1963.
- 20.—MANNER, G. y GOULD, B. S.—*Biochim. et Biophys. Acta* **72**:243, 1963.
- 21.—KALF, G.—Escuela de Medicina, Univer-

- sidad de Seaton Hall. Comunicación personal.
- 22.—CORONADO, A.—Arch Biol. Med. Exper. 1:76, 1964.
- 23.—CORONADO, A.; MARDONES, E. y ALLENDE, J.—Biochem. and Biophys. Res. Commun. 13:75, 1963.
- 24.—CORONADO, A.; MARDONES, E. y ALLENDE, J.—Arch. Biol. Med. Exper. 1:171, 1964.
- 25.—CORONADO, A.; MARDONES, E. y ALLENDE, J. y CELIS, J.—Abstracts of the Sixth International Congress of Biochemistry (New York) 1964.
- 26.—ROSENBAUM, M. y BROWN, R. A.—Analytical Biochem. 2:15, 1961.
- 27.—GIERER, A. y SCHRAM, G.—Nature 177:702, 1956.
- 28.—MOORE, S. y STEIN, W. H.—Biol. Chem. 176:367, 1948.
- 29.—PIEZ, K. A.—J. Biol. Chem. 207:77, 1954.
- 30.—BERG, P. y BERGMANN, F. H.—J. Biol. Chem. 236:1726, 1961.
- 31.—SCHWEET, R. S. en Methods in Enzymology, Vol. V, p. 726, S. P. Colowick y N. O. Kaplan Ed., Academic Press, Inc., 1962.
- 32.—PROCKOP, D. J.; KAPLAN, A. y UDENFRIEND, S.—Arch. Biochem. Biophys. 101:499, 1963.
- 33.—FUJIMOTO, D. y TAMIYA, N.—Biochem. J. 84:333, 1962.
- 34.—CHAPEVILLE, F.; LIPMANN, F.; VON EHRENSTEIN, G.; WEISBLUM, B.; RAY, W. J., Jr. y BENZER, S.—Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 48:1086, 1962.