

Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Chemii Podstawowych, Wydział Farmaceutyczny,
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Tomasz Borkowski

Józef ZAJĄC

Endogenna fosforylacja białek w błonach mitochondrialnych z mózgu cielęcia

Эндогенное фосфорилирование белков митохондриальных мембран из мозга
теленка

Intrinsic Protein Phosphorylation in the Mitochondrial Membranes of a Calf Brain

Modulacja aktywności niektórych enzymów za pośrednictwem ich fosforylacji i defosforylacji jest jednym z mechanizmów regulowania procesów metabolicznych (4). Taką modyfikację białek stwierdzono również w obrębie genomu (1) i w rybosomach (3), ale dotychczas nie sprecyzowano bliżej jej roli zarówno w procesie transkrypcji, jak i translacji. Jeszcze mniej wiadomo na temat roli fosforylacji i defosforylacji białek strukturalnie związanych z błonami biologicznymi. Sugeruje się najogólniej, że taka modyfikacja części struktur błon odgrywa rolę głównie w ich funkcji transportowej (2).

W naszym doniesieniu wykazano, że błony mitochondrialne z mózgu również efektywnie i szybko ulegają piętnowaniu przy udziale [γ - 32 P] ATP, a dłuższa inkubacja powoduje znaczny spadek wbudowanej radioaktywności. Świadczy to, że błony mitochondrialne z mózgu posiadają aktywność fosfotransferazy ATP: białko (EC 2.7.1.37) i fosfohydrolazy fosfoproteidowej (EC 3.1.3.16) oraz białka ulegające fosforylacji i defosforylacji.

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki specjalne. Tris-(hydroksymetyl)-aminometan i 2-merkaptioetanol pochodziły z firmy Serva (Heidelberg RFN), ATP, heksokinaza z drożdży (typ III) i albumina z osocza wołu V frakcja były firmy Sigma (St. Louis, Mo., USA).

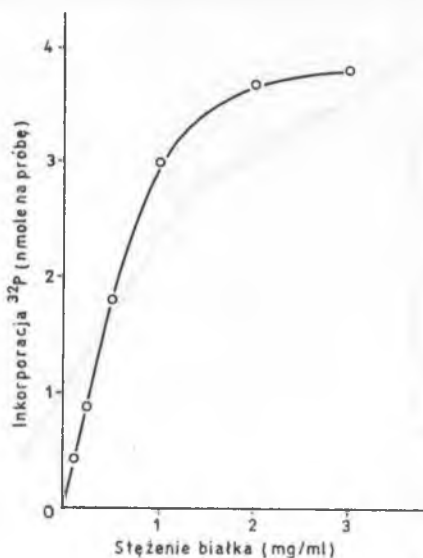
[γ - ^{32}P] ATP o aktywności właściwej 2,3 Ci/mmol pochodził z firmy Amersham (Anglia). Pozostałe odczynniki o czystości p.a. pochodziły z Biura Obrotu Odczynniki w Gliwicach.

Mitochondria z kory mózgowej cielęcia otrzymywano według Lovtrupa i Zelandera (8) z tą różnicą, że 0,44 M roztwór sacharozy używany w tej metodzie zawierał 5 mM EDTA. W celu otrzymania frakcji błon mitochondria z 32 g istoty szarej mózgu zawieszano w 30 ml mieszaniny zawierającej: 0,05 M — trisHCl, pH 7,5; 0,14 M — KCl; 1 mM — EDTA oraz 1 mM — 2-merkaptetanol i poddawano dezintegracji w aparacie ultradźwiękowym firmy MSE, No 7100 o mocy 100 W przy maksymalnej amplitudzie. Dezintegrację przeprowadzano czterokrotnie po 1 minucie z przerwami na chłodzenie, ażeby temperatura utrzymywała się około 0°. Mitochondria po dezintegracji wirowano 30 min przy 2×10^4 xg. Osad przemyto trzykrotnie, zawieszając go w 35 ml 5 mM EDTA o pH 7,4 na 30 min w temp. 0°, po czym wirowano jak wyżej. Tak otrzymaną frakcję błon zawieszano w wodzie destylowanej, uzyskując stężenie około 10 mg białka/ml i przechowywano w stanie zamrożonym w -20°. Białko oznaczano metodą biuretową (5), jako wzorca użyto albuminy z osocza wołu.

Do śledzenia fosforylacji błon użyto [γ - ^{32}P] ATP. Błony (1 mg białka) inkubowano w mieszaninie zawierającej: 30 mM — trisHCl, pH 7,4; 31 mM — MgCl_2 i 1 mM — [γ - ^{32}P]ATP (1 μCi na próbę). Objętość próby 0,5 ml, temperatura inkubacji 30°, jeśli nie podano inaczej. Reakcję rozpoczynano dodaniem błon do mieszaniny inkubacyjnej ogrzanej do 30°, a po 3 min. przerywano dodając 4,5 ml zimnego 10% kwasu trójchlorooctowego. Osad przemywano trzy razy 4 ml 10% kwasu trójchlorooctowego, przy czym podczas drugiego przemywania osad zawieszony w kwasie trójchlorooctowym ogrzewano 5 min. w 80°. Następnie osad przemyto dwa razy 5 ml mieszaniny metanol—eter (1:1) i oznaczano w nim radioaktywność przy użyciu licznika GM o grubości okienka 3 mg/cm². Na podstawie aktywności właściwej użytego [γ - ^{32}P]ATP obliczano ilość wbudowanego fosforanu i wyniki podano w nmolach na mg białka.

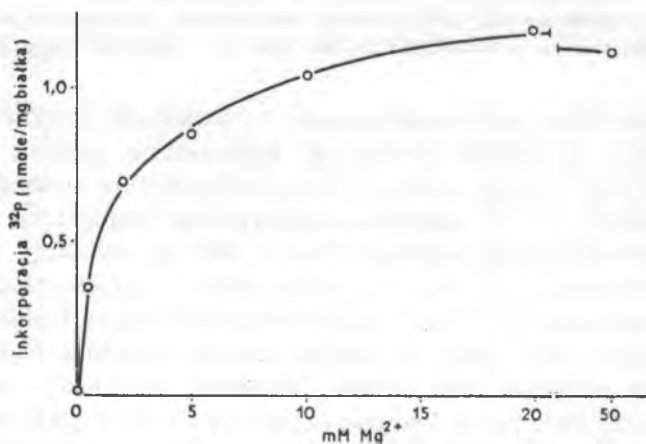
OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy użyciu [γ - ^{32}P] ATP wykazano, że błony z mitochondriów mózgowych ulegają fosforylacji. W warunkach przeprowadzonych doświadczeń inkorporacja fosforanu była proporcjonalna do stężenia białka w zakresie do 1,5 mg/ml (ryc. 1) i niemal całkowicie zależna od obecności Mg^{2+} w mieszaninie inkubacyjnej (ryc. 2). Maksymalna fosforylacja błon zachodzi dopiero powyżej 10 mM Mg^{2+} i nie ulega większym zmianom przy wzroście stężenia do 50 mM. Pod tym względem błony mitochondrialne z mózgu wykazują podobieństwo do błon mikrosomalnych z wątroby szczura (6). Natomiast Weller i Rodnigt (11) stwierdzili, że błony mikrosomalne i synaptosomalne z mózgu wołu ulegają maksymalnej fosforylacji już wobec 1 mM Mg^{2+} . Moret i inni (10) stosowali 6 mM Mg^{2+} do badania fosforylacji błon z mitochondriów wątroby, nie precyzując bliżej, jakie było optymalne stężenie. Fosforylacja błon w 0° jest niemal całkowicie zahamowana, ale efektywnie wzrasta w miarę podwyższenia temperatury. Nieciągłość wykresu Arrheniusa (ryc. 3)



Ryc. 1. Wpływ stężenia białka na fosforylację błon mitochondrialnych. Warunki inkubacji jak podano w tekście

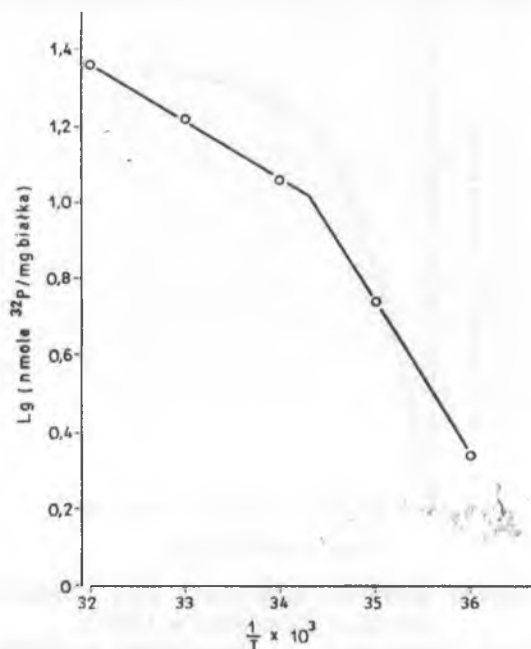
The effect of protein concentration on mitochondrial membranes phosphorylation. Incubation conditions were as described in the text



Ryc. 2. Wpływ stężenia Mg^{2+} na fosforylację błon mitochondrialnych. Warunki inkubacji jak podano w tekście

The effect of Mg^{2+} concentration on mitochondrial membranes phosphorylation. Incubation conditions were as described in the text

może być spowodowana zależnością fosforylacji błon od innych procesów w nich zachodzących (7) bądź również zmianą ich konformacji, wywołaną zmianami temperatury.

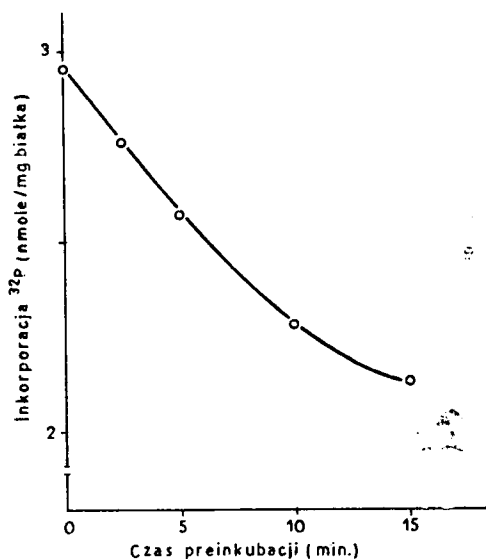


Ryc. 3. Wpływ temperatury na fosforylację błon mitochondrialnych. Warunki inkubacji jak podano w tekście. T — temp. bezwzgl.

The effect of temperature on mitochondrial membranes phosphorylation. Incubation conditions were as described in the text. T — absolute temperature

Preinkubacja błon mitochondrialnych z nieradioaktywnym ATP powinna obniżyć i w istocie obniża ich piętnowanie podczas inkubacji z $[\gamma\text{—}^{32}\text{P}]$ ATP (ryc. 4). Ale nawet 15 min. preinkubacja z nieradioaktywnym ATP, podczas której następuje maksymalna fosforylacja błon, powoduje zahamowanie piętnowania tylko w 30%, co świadczy o tym, że w błonach równolegle odbywa się fosforylacja i defosforylacja białek. Zatem w błonach mitochondriów mózgowych, poza kinazą białkową i białkami ulegającymi fosforylacji, występuje jeszcze fosfataza fosfobiałkowa jako integralny składnik tego układu. Wyraźne, ale niezbyt duże obniżanie piętnowania błon przez wstępną inkubację z nieradioaktywnym ATP przemawia za tym, że defosforylacja jest wolniejszym procesem niż fosforylacja, przynajmniej w warunkach przeprowadzanych doświadczeń *in vitro*.

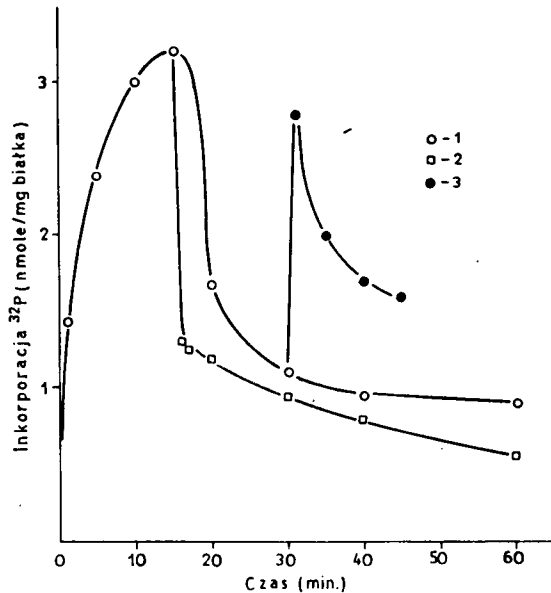
Na istnienie aktywności fosfatazy fosfobiałkowej w błonach mitochondriów mózgowych wskazuje również przebieg ich piętnowania w czasie (ryc. 5). Osiągnięte po kilkunastu minutach maksymalne piętno podczas dalszej inkubacji bardzo szybko spada, szczególnie w temp. 37° . Dodanie kolejnej porcji $[\gamma\text{—}^{32}\text{P}]$ ATP powoduje jedynie krótkotrwały wzrost



Ryc. 4. Wpływ preinkubacji błon z nieradioaktywnym ATP na ich piętnowanie przy udziale $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Próby preinkubowano z nieradioaktywnym 1 mM ATP i we wskazanych czasach dodawano $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP o dużej aktywności właściwej. Po 3 min. dalszej inkubacji reakcję przerywano. Inne warunki inkubacji jak podano w tekście

The effect of preincubation of membranes with non-radioactive ATP on their labelling in the presence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Samples were preincubated with non-radioactive 1 mM ATP and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP of high specific radioactivity was added at indicated time intervals. After 3 min of further incubation the reaction was stopped. Other incubation were as described in the text

piętna. Napiętnowane błony szczególnie szybko ulegają defosforylacji w obecności „pułapki heksokinazowej”, która bardzo efektywnie zużywa ATP. Fakt ten sugeruje, że spadek piętna białek w czasie dłuższej inkubacji spowodowany jest zużytkowaniem ATP, a także jego rozkładem przez ATPazę. W tych warunkach wzrasta również stężenie ADP, który hamuje fosforylację białek jako kompetycyjny inhibitor kinazy białkowej (9). W rezultacie tych zmian w określonej fazie inkubacji zaczyna przeważać proces defosforylacji, przebiegający dwufazowo. Najpierw obserwuje się szybki i znaczny spadek piętna, po czym następuje faza powolnej defosforylacji, która może być spowodowana stabilnością błon ufosforylowanych w określonym stopniu bądź zmianą wzajemnego, przestrzennego rozmieszczenia enzymu i substratu w warunkach doświadczalnych. Istnieje także możliwość kontrolowania stanu ufosforylowania błon przez fosfatazę strukturalnie związaną, która może mieć dostęp tylko do niektórych miejsc i fosfatazę rozpuszczalną kontrolującą inne miejsca, niedostępne dla enzymu związanego ze strukturą błony.



Ryc. 5. Wpływ różnych warunków na piętnowanie błon mitochondrialnych. A) Przebieg w czasie inkorporacji ^{32}P do błon (1). B) Wpływ „pułapki heksokinazowej” na wybudowywanie radioaktywności z napiętnowanych ^{32}P błon mitochondrialnych (2). W doświadczeniu tym po 15 min inkubacji błon (4 ml) pobrano 0,5 ml do oznaczenia piętna, a do pozostałej próby dodano 3,5 mg heksokinazy i 350 μmoli glukozy (0,35 ml). Podczas dalszej inkubacji pobierano 0,55 ml próby we wskazanych czasach do oznaczania radioaktywności pozostałej w błonach. C) Wpływ dodatkowej porcji $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP na piętnowanie błon dodanej w warunkach znacznego spadku ich radioaktywności po dłuższej inkubacji (3). Po 30 min inkubacji błon (3 ml) pobrano 0,5 ml próbę kontrolną, dodano 0,25 ml 10 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP i podczas dalszej inkubacji pobierano we wskazanych czasach 0,55 ml próby do oznaczania piętna w błonach. Temperatura inkubacji we wszystkich doświadczeniach wynosiła 37° . Pozostałe warunki inkubacji jak podano w tekście

The effect of various conditions on labelling of mitochondrial membranes. A) Time-course of ^{32}P incorporation into membranes (1). Effect of "hexokinase trap" on loss of radioactivity from ^{32}P labelled mitochondrial membranes (2). In this experiment after 15 min of membrane incubation (4 ml) 0.5 ml portion was taken to determine the label, and 3.5 mg hexokinase and 350 μmoles glucose were added (0.35 ml) to the remaining mixture. During further incubation 0.55 ml samples were withdrawn at indicated time intervals in order to determine the radioactivity remaining in membranes. C) Effect of additional $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP portion on labelling of membranes, added under conditions of a marked decrease of their radioactivity during prolonged incubation (3). After 30 min of membrane incubation (3 ml) a 0.5 ml control sample was taken and 0.25 ml of 10 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP was added. During further incubation 0.55 ml samples were withdrawn for determining membrane label. In all experiments the incubation temperature was 37° . Other incubation conditions were as described in the text

PIŚMIENNICTWO

1. Allfrey V. G., Johnson E. M., Karn J., Vidali G.: Protein Phosphorylation in Control Mechanisms, 217—249, Ed. Huijing F., Lee EYC, Academic Press, New York—London 1973.
2. DeLorenzo R. J., Walton K. G., Curran P. F., Greengard P.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 880—884, 1973.
3. Gill G. N., Walton G. M., Holdy K. E., Mariash C. N., Kalstrom J. B.: Phosphorylation in Control Mechanisms, 175—197, Ed. Huijing F., Lee EYC, Academic Press, New York—London 1973.
4. Holtzer H., Duntze W.: Ann. Rev. Biochem., **40**, 345—374, 1971.
5. Jacobs E. E., Jacob M., Sanadi D. R., Bradley L. B.: J. Biol. Chem., **223**, 147—156, 1956.
6. Jergill B., Ohlsson R.: Eur. J. Biochem., **46**, 13—25, 1974.
7. Lee P., Gear A. R. L.: J. Biol. Chem., **249**, 7541—7549, 1974.
8. Lovtrup S., Zelander T.: Exp. Cells. Res., **27**, 468—473, 1962.
9. Miyamoto E., Petzold G. L., Greengard P.: J. Biol. Chem., **248**, 179—189, 1973.
10. Moret V., Clari G., Pinna L. A.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **62**, 1011—1017, 1975.
11. Weller M., Rodnight R.: Biochem. J., **132**, 483—492, 1973.

Otrzymano 7 VI 1975.

РЕЗЮМЕ

Установлено, что фракция митохондриальных мембран из мозга эффективно подвергается мечению при участии γ - ^{32}P /АТФ. Приблизительно 2/3 части включенной в белки радиоактивности потерялось во время инкубации при отсутствии γ - ^{32}P /АТФ. Предварительная инкубация мембран с намеченной АТФ понижает их способность к мечению в присутствии γ - ^{32}P /АТФ только незначительно. Полученные данные показывают, что в митохондриальных мембранах мозга наряду с белками, модифицируемыми фосфорилированием дефосфорилированием, присутствует участвующие в этом процессе энзимы: протеинкиназа и фосфопротеидфосфатаза.

SUMMARY

It has been established that the membrane fraction from brain mitochondria was effectively labelled in the presence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. About two thirds of incorporated label into proteins was lost during incubation in the absence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Membranes preincubated with non-radioactive ATP only partially lost their ability for labelling in the presence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. These data indicate that in the brain mitochondrial membranes there are proteins which undergo modification through phosphorylation and dephosphorylation, and the enzymes phosphotransferase ATP: protein and phosphoprotein phosphohydrolase catalyzing this process.

