

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

J ó z e f Z A J ą C

**Stymulujący wpływ nukleotydów adenylowych na wbudowywanie
[³²P] ortofosforanu do białek w izolowanych mitochondriach mózgowych**

Стимулирующий эффект адениловых нуклеотидов на инкорпорацию
[³²P] ортофосфата в белки изолированных мозговых митохондрий

The Stimulating Effect of Adenine Nucleotides on the Incorporation of [³²P] Orthophosphate into Proteins of Isolated Brain Mitochondria

Modyfikacja aktywności niektórych enzymów za pośrednictwem ich fosforylacji i defosforylacji stanowi ważny mechanizm regulacji procesów metabolicznych (4). Obecnie szczególne zainteresowanie budzi również fosforylacja i defosforylacja błon biologicznych jako modulacja ich funkcji (3). Rola fosforylacji frakcji białkowych kwasolabilnej i kwasostabilnej w mitochondriach jest poznana jedynie fragmentarycznie i ostateczne jej sprecyzowanie wymaga jeszcze wszechstronnych badań.

ADP jest inhibitorem fosfotransferazy ATP: białko (EC 2.7.1.37; 8). Hamuje także fosforylację białek w mitochondriach mózgowych przy udziale [γ -³²P] ATP (Z a j ą c, w przygotowaniu), ale wybitnie stymuluje inkorporację [³²P] ortofosforanu do białek w tych organellach. Podobnie stymulują ten proces AMP i ATP.

W obecnym doniesieniu wykazano, że nukleotydy adenyłowe tylko w zakresie małych stężeń najefektywniej stymulują wbudowywanie [³²P] ortofosforanu do frakcji białkowych mitochondriów mózgowych.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki specjalne. Tris-(hydroksymetylo)-aminometan (Serwa, Heidelberg, RFN), ATP i albumina: osocza wołu V frakcja (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA), ADP i AMP (Boehringer, Mannheim, RFN). Pozostałe odczynniki o czystości p.a. dostarczone były przez Biuro Obrotu Odczynnikiemi w Gliwicach. [³²P] ortofosforan pochodził z Instytutu Badań Jądrowych w Świerku.

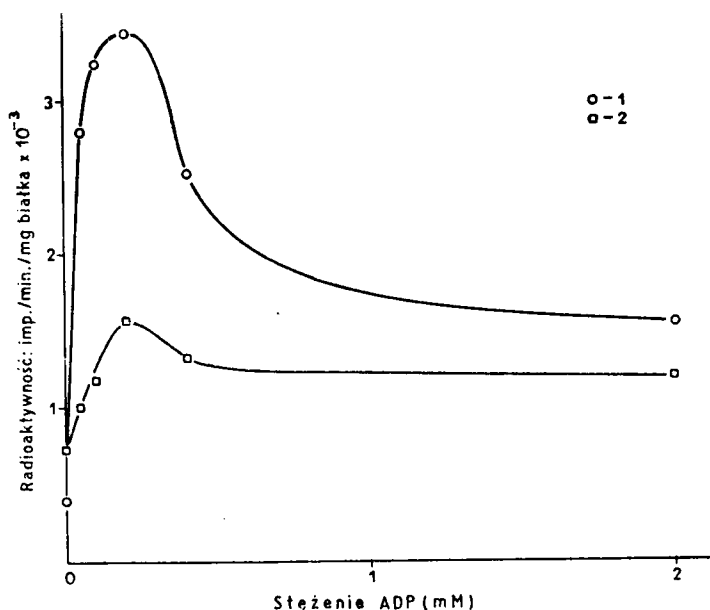
Mitochondria z mózgu królików otrzymywano według Lovtrup a i Z e l a n d e r a (6) z tą różnicą, że 0,44 m roztwór sacharozy używany w tej procedurze

zawierał 5 mM EDTA. Czystość mitochondriów otrzymanych tą metodą zbadano wcześniej (2). Fosforylację białka śledzono za pomocą inkorporacji [^{32}P]ortofosforanu. Piętno frakcji kwasolabilnej (fosfohistydynowej, P-His) oznaczano według Biebera i wsp. (1), a kwasostabilnej (fosfoserynowej, P-Ser) jak opisane poprzednio (11). Radioaktywność mierzono przy pomocy licznika GM o grubości okienka 3 mg/cm². Białko oznaczano metodą biuretową (5); jako wzorca użyto albuminę z osocza wołu.

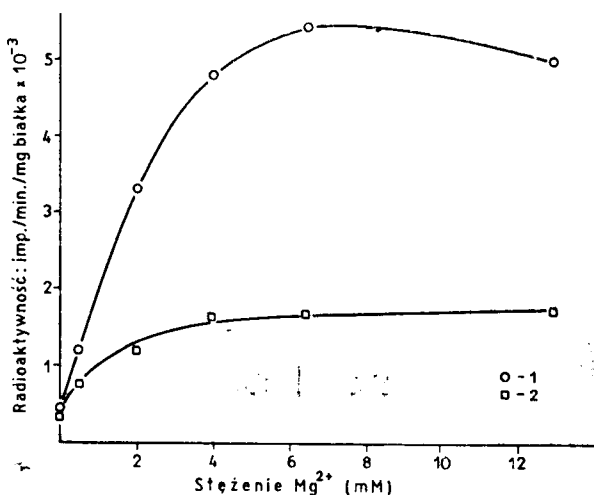
OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wybitna stymulacja piętnowania białek w mitochondriach mózgowych przy udziale [^{32}P] ortofosforanu przez nukleotydy adenyłowe spowodowana jest głównie wzrostem syntezy [γ - ^{32}P] ATP (Zajac, w przygotowaniu). Chociaż ostateczny mechanizm tej stymulacji jest zasadniczo taki sam w przypadku wszystkich nukleotydów adenyłowych, to przebieg inkorporacji [^{32}P] ortofosforanu do frakcji białkowych w zależności od stężenia poszczególnych nukleotydów jest różny. Ale we wszystkich przypadkach najefektywniejszą stymulację obserwuje się w określonym przedziale niskiego stężenia. Jest to spowodowane hamującym działaniem nukleotydów adenyłowych w wyższych stężeniach na fosforylację białek.

ADP kompetencyjnie hamuje kinazę białkową (8). Mimo to jego stymulujący wpływ na fosforylację białek w mitochondriach (ryc. 1) jest



Ryc. 1. Wpływ stężenia ADP na piętnowanie frakcji białkowych (1, P-Ser; 2, P-His) w obecności [^{32}P]ortofosforanu. Mieszanina inkubacyjna (7): 33 mM — trisCl (pH 7,4), 63 mM — sacharoza, 50 mM — KCl, 6,5 mM — MgCl₂, 10 mM — NaF, 10 mM — 2-oksoglutaran; końcowa objętość próby 2 ml; temperatura inkubacji 30°. Mitochon-



Ryc. 2. Wpływ stężenia Mg^{2+} na piętnowanie frakcji białkowych (1, P-Ser; 2, P-His) w obecności $[^{32}P]$ ortofosforanu i 0,2 mM ADP. Stężenie $[^{32}P]$ ortofosforanu: 0,05 mM ($1,33 \times 10^7$ imp./min); mitochondria: 7 mg białka; czas inkubacji 5 min. Pozostałe warunki inkubacji i skład mieszaniny były jak podano w doświadczeniu przedstawionym na ryc. 1

Effect of Mg^{2+} concentration on the labelling of protein fractions (1, P-Ser; 2, P-His) in the presence of $[^{32}P]$ orthophosphate and 0.2 mM ADP. The composition of incubation mixture and conditions of incubation were as described in fig. 1 except that mitochondria equivalent to 7 mg of protein and 0.05 mM $[^{32}P]$ orthophosphate (1.33×10^7 c.p.m.) were used

dominujący i najbardziej efektywny dla stężenia 0,2 mM. Dalszy wzrost stężenia ADP powoduje dosyć duże zmniejszanie piętna obydwu frakcji białkowych, ale znaczny efekt stymulujący utrzymuje się nawet w obecności 2 mM ADP. Udział ADP w defosforylacji białek (9) i obniżanie piętna na tej drodze może mieć większe znaczenie jedynie w przypadku frakcji fosfohistydynowej (11).

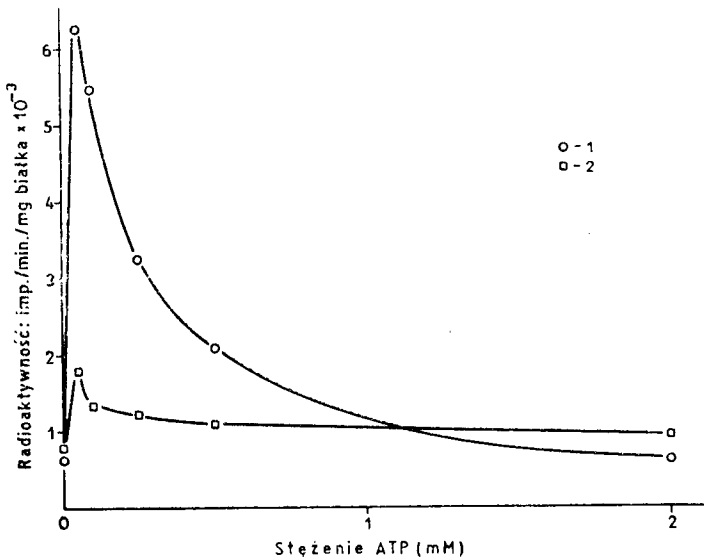
Z ryc. 2 wynika, że Mg^{2+} są niezbędnymi składnikami mieszaniny inkubacyjnej, aby w obecności dodanego ADP fosforylacja białek w mito-

dria (7,7 mg białka) preinkubowano 1,5 min, dodawano $[^{32}P]$ ortofosforan (0,1 mM; $1,05 \times 10^7$ imp./min) i po 10 min inkubację przerywano dodaniem 8 ml zimnego 0,3 M kwasu trójchlorooctowego zawierającego 3 mM — KH_2PO_4

Effect of ADP concentration on the labelling of protein fractions (1, P-Ser; 2, P-His) in the presence of $[^{32}P]$ orthophosphate. Incubation mixture (7): 33 mM — trisCl (pH 7.4), 63 mM — sucrose, 50 mM — KCl, 6.5 mM — $MgCl_2$, 10 mM — NaF, 10 mM — 2-oxoglucuronate; temperature of incubation 30°. Mitochondria (7.7 mg of protein) were preincubated for 1.5 min, then $[^{32}P]$ orthophosphate (0.1 mM; 1.05×10^7 c.p.m.) was added and after a further 10 min the reaction was stopped by adding 8 ml of cold 0.3 mM — trichloroacetic acid containing 3 mM — KH_2PO_4

chondriach zachodziła efektywnie. Maksymalne piętnowanie białek uzyskuje się już wobec 6,5 mM Mg^{2+} . Większe stężenie Mg^{2+} powoduje tylko nieznaczny wzrost piętna P-His, natomiast niewielkie obniżenie radioaktywności P-Ser. Wybitnie stymulujący wpływ dodanego jedynie w niewielkich stężeniach ATP na piętnowanie białek w mitochondriach przy udziale $[^{32}P]$ ortofosforanu (ryc. 3) spowodowany jest tym, że ulega on rozkładowi pod wpływem ATPazy do ADP i zwiększa syntezę $[\gamma-^{32}P]$ ATP, nie obniżając istotnie jego aktywności właściwej ani aktywności właściwej $[^{32}P]$ ortofosforanu. Natomiast ostatnie dwa efekty odgrywają coraz większą rolę w miarę wzrostu stężenia dodanego ATP, co znajduje odbicie w wyraźnym spadku wbudowywania piętna ^{32}P do frakcji białkowych. Mniejszy spadek piętna frakcji fosfohistydynowej niż fosfoserynowej w zakresie większych stężeń dodanego ATP świadczy o tym, że przynajmniej niektóre białka tej frakcji są mniej dostępne dla egzogenego ATP.

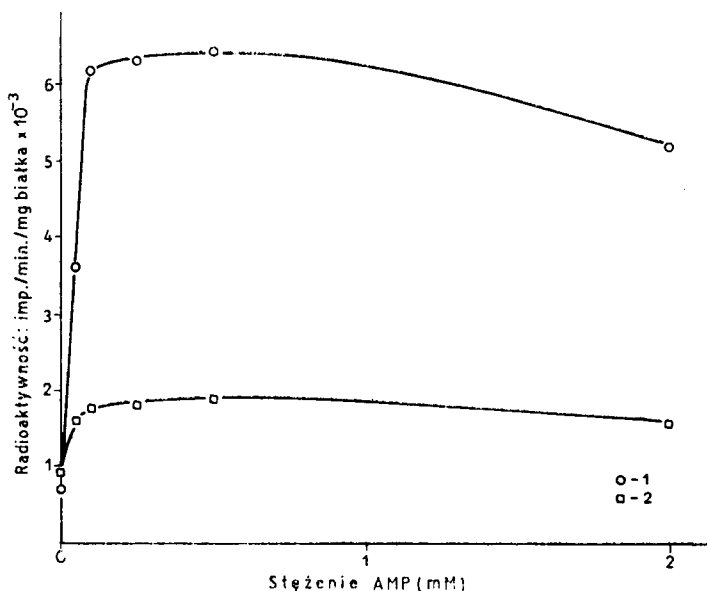
AMP ulegając fosforylacji do ADP i ATP (10) również efektywnie stymuluje piętnowanie białek w mitochondriach przy udziale $[^{32}P]$ orto-



Ryc. 3. Wpływ stężenia ATP na piętnowanie frakcji białkowych (1, P-Ser; 2, P-His) w obecności $[^{32}P]$ ortofosforanu. Skład mieszaniny inkubacyjnej i warunki inkubacji były takie same jak podano pod ryc. 1; stężenie $[^{32}P]$ ortofosforanu: 0,2 mM ($1,09 \times 10^7$ imp./min); mitochondria: 6,6 mg białka

Effect of ATP concentration on the labelling of protein fractions (1, P-Ser; 2, P-His) in the presence of $[^{32}P]$ -orthophosphate. The composition of incubation mixture and conditions of incubation were as described in fig. 1 except that mitochondria conditions of incubation were identical as described in fig. 3 except that AMP as described in fig. 1

fosforanu już w stężeniu 0,1 mM, a jego niewielki efekt hamujący ujawnia się dopiero powyżej 1 mM (ryc. 4). ADP dodany do mieszaniny inkubacyjnej zmienia kinetykę wbudowywania [32 P] ortofosforanu do obydwu frakcji białkowych (ryc. 5). W nieobecności dodanego substratu utlenianego początkowa szybkość piętnowania P-His jest większa niż P-Ser, podobnie jak bez dodanego ADP (12), ale w czasie dalszej inkubacji piętno P-His ciągle wzrasta, podczas gdy w nieobecności dodanego ADP nie ulega zmianie. Chociaż dodany ADP w nieobecności dodanego utlenianego substratu w ostatecznym rezultacie podwyższa piętno P-Ser, to szybkość tego procesu jest wydatnie zwolniona i wykazuje liniowy charakter w czasie 10 min. W obecności dodanego utlenianego substratu stymulujący efekt ADP kilkakrotnie wzrasta i szybkość początkowa piętnowania obydwu frakcji białkowych jest jednakowa, ale w czasie dalszej inkubacji wzrost piętna P-His odbywa się znacznie wolniej niż P-Ser. Liniowa zależność piętnowania frakcji fosfoserynowej w obecności dodanego ADP w dosyć długim czasie uwarunkowana jest z jednej strony hamującym wpływem ADP na fosforylację tej frakcji białkowej i stymulacją nara-

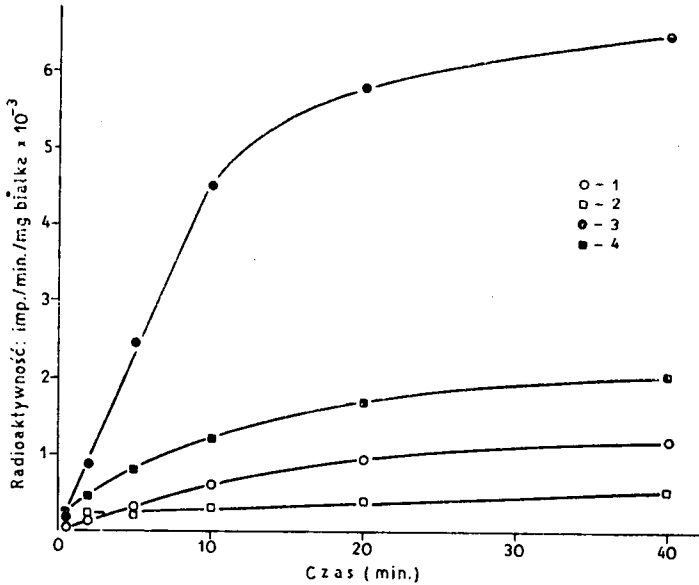


Ryc. 4. Wpływ stężenia AMP na piętnowanie frakcji białkowych (1, P-Ser; 2, P-His) w obecności [32 P]ortofosforanu. Skład mieszaniny inkubacyjnej i warunki inkubacji były identyczne jak w doświadczeniu przedstawionym na ryc. 3 z wyjątkiem użycia AMP zamiast ATP

Effect of AMP concentration on the labelling of protein fractions (1, P-Ser; 2, P-His) in the presence of [32 P]orthophosphate. The composition of incubation mixture and conditions of incubation were identical as described in fig. 3 except that AMP was used instead of ATP

stającą w miarę nagromadzania się syntetyzowanego [γ - ^{32}P] ATP. W rezultacie maksymalne piętno P-Ser jest wolniej osiągnięte w obecności dodanego ADP, ale jego wielkość kilkakrotnie przekracza wartość uzyskiwaną bez dodanego ADP.

Piętnowanie frakcji fosfohistydynowej jest mniej wrażliwe niż frakcji fosfoserynowej na stymulujący wpływ nukleotydów adenylowych i hamujący ich efekt w większych stężeniach. Przyczyną tego jest zarówno odmienny mechanizm ich fosforylacji, jak również kompartmentacja procesów w mitochondriach (10).

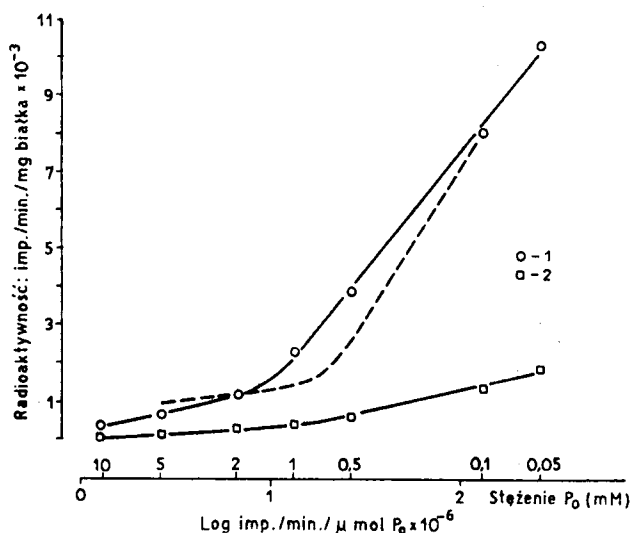


Ryc. 5. Przebieg w czasie inkorporacji [^{32}P]ortofosforanu do frakcji białkowych w obecności 0,2 mM ADP i 10 mM 2-okso-glutaranu (3, P-Ser; 4, P-His) oraz bez dodanego substratu utleniającego (1, P-Ser; 2, P-His). Stężenie [^{32}P] ortofosforanu: 0,2 mM ($1,06 \times 10^7$ imp./min); mitochondria: 7 mg białka; pozostałe składniki mieszaniny inkubacyjnej jak podano pod ryc. 1

Time-course incorporation of [^{32}P]orthophosphate into protein fractions in the presence of 0.2 mM ADP and 10 mM 2-oxoglutarate (3, P-Ser; 4, P-His) as well as without of added oxidizable substrate (1, P-Ser; 2, P-His). 0.2 mM — [^{32}P]orthophosphate ($1,06 \times 10^7$ c.p.m.) and mitochondria equivalent to 7 mg of protein were used. Other components of incubation mixture and conditions of incubation were as described in fig. 1

Przebieg piętnowania frakcji białkowych w zależności od aktywności właściwej [^{32}P] ortofosforanu w obecności dodanego ADP ma charakter dwufazowy (ryc. 6). Początkowo w miarę wzrostu aktywności właściwej [^{32}P] ortofosforanu w granicach od 10^6 do 10^7 imp./min/ μmol przy zmianie stężenia dodanego ortofosforanu z 10 mM do 1 mM obserwuje się powol-

ny wzrost piętna obydwu frakcji białkowych. Dalszy wzrost aktywności właściwej do 10^8 imp./min/ μ mol przy zmniejszeniu stężenia ortofosforanu z 1 mM do 0,05 mM powoduje znacznie większy wzrost piętna obu frakcji białkowych. W przypadku użycia ekwimolarnych stężeń dodanego ADP i ortofosforanu początkowy wzrost piętna frakcji fosfoserynowej jest jeszcze wolniejszy i rozciąga się w szerszym zakresie stężenia ortofosforanu (do około 0,5 mM). Natomiast dalszy wzrost aktywności właściwej $[^{32}\text{P}]$ ortofosforanu i towarzyszące temu zmniejszenie jego stężenia do 0,1 mM powoduje jeszcze większy wzrost piętna niż z 0,1 mM ADP. Podobnie zachowuje się również piętno P-His, ale różnice w przypadku tej frakcji białkowej są małe i nie uwidoczniło ich na rycinie.



Ryc. 6. Zależność piętnowania frakcji białkowych (1, P-Ser; 2, P-His) od aktywności właściwej $[^{32}\text{P}]$ ortofosforanu w obecności 0,1 mM ADP oraz ekwimolarnych stężeń $[^{32}\text{P}]$ ortofosforanu i ADP (linia przerywana, P-Ser). Mitochondria: 8 mg białka; czas inkubacji 30 min; pozostałe składniki mieszaniny inkubacyjnej i warunki inkubacji jak podano pod ryc. 1. P_0 — ortofosforan

$[^{32}\text{P}]$ orthophosphate specific activity dependent labelling of protein fractions in the presence of 0.1 mM ADP (1, P-Ser; 2, P-His) as well as at equimolar concentrations of $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate and ADP (dashed line, P-Ser). Mitochondria equivalent to 8 mg of protein were used. Incubation time was 30 min. Other components of incubation mixture and conditions of incubation were as described in fig. 1. P_0 — orthophosphate

Inkorporacja znacznych ilości ^{32}P do frakcji białkowych dopiero przy małych stężeniach $[^{32}\text{P}]$ ortofosforanu i tym samym odpowiednio dużych jego aktywnościach właściwych świadczy o małych ilościach tych frakcji w mitochondriach oraz dużym powinowactwie kinazy lub kinaz białko-

wych do ATP i białek ulegających fosforylacji. Użycie poszczególnych nukleotydów adenylowych do badania fosforylacji białek w mitochondriach przy udziale [^{32}P] ortofosforanu może ułatwić uchwycenie różnic w fosforylacji indywidualnych białek w poszczególnych subfrakcjach mitochondrialnych i umożliwić sprecyzowanie ich roli w funkcji mitochondrionu. Wstępne piętnowanie białek mitochondrialnych przy udziale [^{32}P] ortofosforanu i nukleotydów adenylowych w celu dalszej ich charakterystyki jest również bardziej efektywne niż przy użyciu tylko [^{32}P] ortofosforanu czy nawet [γ - ^{32}P] ATP.

PIŚMIENNICTWO

1. Bieber L. L., Lindberg O., Duffy J. J., Boyer P. D.: *Nature*, **202**, 1316—1318, 1964.
2. Borkowski T., Sikorska K., Borkowska I.: *Macromolecules and the Function of the Neuron*, 187—192, Ed. Lodin Z. i Rose SPR, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1968.
3. DeLorenzo R. J., Walton K. G., Curran P. F., Greengard P.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 880—884, 1973.
4. Holzer 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. Lovtrup S., Zelander T.: *Exp. Cell. Res.*, **27**, 468—473, 1962.
7. Menken M., Waggoner J. G., Berlin N. J.: *J. Neurochem.*, **13**, 1241—1248, 1966.
8. Miyamoto E., Petzold G. L., Greengard P.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 179—189, 1973.
9. Pinna L. A., Clari G., Moret V.: *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 270—278, 1971.
10. Tokumitsu Y., Ui M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 325—337, 1973.
11. Zajac J.: *Acta Biochim. Polon.*, **15**, 307—315, 1968.
12. Zajac J.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. VI*, **20**, 451—455, 1972.

Otrzymano 24 IV 1975.

РЕЗЮМЕ

Адениловые нуклеотиды стимулируют инкорпорацию [^{32}P]ортофосфата в белки изолированных мозговых митохондрий. Стимулирующий эффект является максимальным в пределе малых концентраций присоединенных нуклеотидов (0,05 мМ АТФ, 0,2 мМ АДП, 0,1 мМ АМР) и быстро понижается вместе с ростом их концентраций. Только в случае АМР этот эффект удерживается в более широком пределе концентрации и только превысив 1 мМ встроенная метка незначительно понижается. Инкорпорация ^{32}P в белковую фракцию в присутствии 0,1 мМ АДП зависит от удельной активности [^{32}P]ортофосфата и наиболее эффективно протекает при концентрации неорганического ортофосфата ниже 1 мМ.

SUMMARY

Adenine nucleotides stimulated the incorporation of [32 P]orthophosphate into proteins of isolated brain mitochondria. The greatest effect was reached at a low range of concentration of added nucleotides: 0.05 mM ATP, 0.02 mM ADP, 0.1 mM AMP and rapidly decreased at higher concentrations. However, in the case of AMP a stimulating effect was maintained at a wider range of concentration and only above 1 mM a hardly marked decrease of incorporated label was observed. [32 P] Orthophosphate specific activity dependent labelling of protein fractions was most effective below 1 mM orthophosphate.

