

Ma r i a S Z W A J

Charakterystyka radioaktywnych produktów częściowej hydrolizy białek rybosomalnych

Характеристика радиоактивных продуктов частичного гидролиза рибосомальных белков

The Characteristic of Radioactive Products of Partial Hydrolysis of Ribosomic Proteins

Fosforylację białek rybosomalnych z udziałem fosfotransferazy białkowej wykazano w doświadczeniach prowadzonych *in vitro* i *in vivo* (3, 4, 8, 9, 12, 17, 21, 22, 24). Intensywność tego procesu jest różna w zależności od badanych organizmów i tkanek. Duże podobieństwo w dynamice fosforylacji białek rybosomalnych obserwuje się w komórkach szybko rosnących i retikulocytach królika (2, 11). W rybosomach retikulocytów około 3% fosfobiałek ulega wymianie w ciągu 1 minuty (10). W komórkach raka włośniowego Ehrlicha maksimum inkorporacji ^{32}P do rybosomalnych białek zasadowych (20) zaobserwowano już w 20 minucie inkubacji. Fosfoproteidy rybosomalne wykazują różny stopień wiązania ze strukturą rybosomu. Przemywanie rybosomów wysokimi stężeniami soli (1) powoduje usuwanie z nich około 50% ufosforylowanych białek.

Celem obecnej pracy było przebadanie produktów częściowej kwaśnej hydrolizy rybosomalnych białek otrzymanych z komórek raka włośniowego Ehrlicha.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na 9—10-dniowych komórkach raka włośniowego Ehrlicha, uzyskiwanych z przeszczepu dokonywanego na myszach białych szczepu A-Strong. Sposób przygotowywania płynów włośniowych do inkubacji podano we wcześniejszych publikacjach (6, 18, 19). Inkubację płynu włośniowego z radioaktywnym ortofosforanem (NaH_2PO_4 , 1500 μC na 100 ml płynu włośniowego) prowadzono w ciągu 2 godzin w obecności 0,2% glukozy. Dokładny opis warunków inkubacji oraz preparatykę rybosomów opisano wcześniej (19, 20).

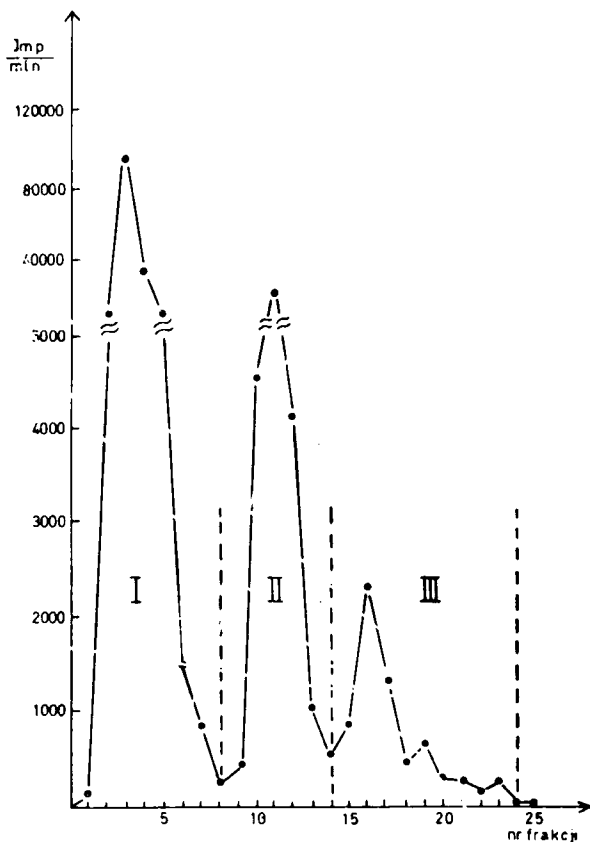
Białko rybosomalne preparowano przez ekstrakcję rybosomów 66% kwasem octowym zgodnie z metodą Wallera i wsp. (23). Po odwirowaniu nierozpuszczalnego w tych warunkach RNA supernatant dializowano trzykrotnie wobec wody destylowanej. Białko strącano kwasem trójchlorooctowym doprowadzając do 20% końcowego stężenia. Celem usunięcia kwasu trójchlorooctowego osad białek odmywano mieszaniną eter-etanol (2 : 1) zgodnie z me-

todą opisaną wcześniej (19). Następnie białko rozpuszczano w 1,5—2,0 ml wody destylowanej. W materiale tym oznaczano białko całkowite metodą Lowry (13) oraz radioaktywność w liczniku Geigera-Millera (typ BOH 45, o grubości okienka 2,8 mg/cm²), którą wyrażano w imp/min/mg białka (20).

Do hydrolizy stosowano około 30 mg białka rybosomalnego o aktywności średnio 3000 imp/min/mg białka. Hydrolizę białka prowadzono w 2N kwasie solnym, opierając się na badaniach opublikowanych wcześniej (20) z tą różnicą, że zastosowano krótszy, 10-godzinny czas hydrolizy. Dalsza część postępowania, związana z oczyszczaniem hydrolizatu na kolumnie Dowex-50 (H⁺) oraz rozdziałem elektroforetycznym i oznaczeniem radioaktywności na elektroforogramach, była powtórzeniem wcześniejszych badań (20).

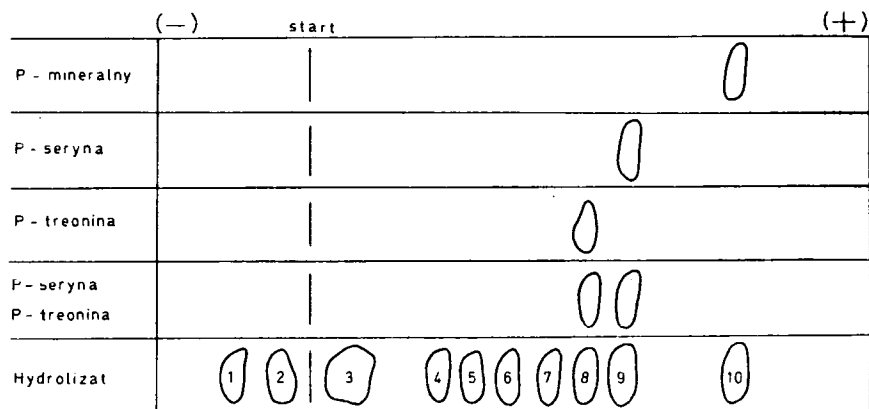
WYNIKI BADAŃ

10-godzinna hydroliza białek rybosomalnych w kwasie solnym dawała mieszaninę produktów ich degradacji, w skład których wchodziły fosfopeptydy, P-seryna, P-treonina, peptydy, aminokwasy i fosforan mineralny. Materiał ten bez wstępnego frakcjonowania nie nadawał się do badań elektroforetycznych. W celu oczyszczenia hydrolizatu głównie z fosforanu mineralnego materiał frakcjonowano na kolumnie Dowex-50 (H⁺). Wyniki rozdziału przedstawia ryc. 1. W poszczególnych frakcjach zebranych z kolumny oznaczono radioak-



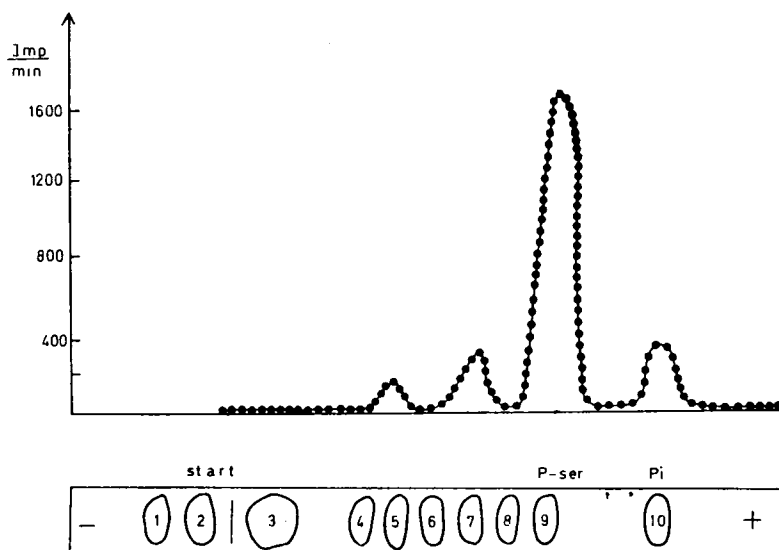
Ryc. 1. Rozdział hydrolizatu białka rybosomalnego na kolumnie Dowex-50 (H⁺)
The separation of the ribosomal protein hydrolysate on Dowex-50 (H⁺) column

tywność. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami (20) frakcji szczytowej I (1—8), zawierającej głównie fosforan mineralny, nie brano pod uwagę. Pozostały materiał zebrany we frakcjach od 8 do 25 łączono i użyto do badań elektroforetycznych. Detekcję związków przeprowadzono przy pomocy reakcji ninhydrynowej lub testem molibdenowym (16). Wyniki rozdzielania elektroforetycznego przedstawia ryc. 2. Jak wynika ze schematu, na elektroforogramie wystę-



Ryc. 2. Elektroforogram hydrolizatu białka rybosomalnego, P-seryny i P-treoniny po rozfrakcjonowaniu na kolumnie Dowex-50 (H⁺)

The Electropherogram of the hydrolysate of ribosomic protein, P-serine and P-threonine after separation on a Dowex-50 (H⁺) column



Ryc. 3. Elektroforogram hydrolizatu białka rybosomalnego po rozfrakcjonowaniu na kolumnie Dowex-50 (H⁺)

The electropherogram of the hydrolysate of ribosomic protein after separation on a Dowex-50 (H⁺) column

poważo 9 pasm ninhydrynopozytywnych (1—9 i dwa pasma (9, 10) molibdenopozytywne. Pasma 9, o dużej radioaktywności, położeniem odpowiadało wzorcowej P-serynie. Pasma 8, tylko ninhydrynopozytywne, aktywnością niewiele różniącą się od próby kontrolnej lokalizacją wskazywało na P-treoninę. Natomiast pasmo 10, również radioaktywne, położeniem odpowiadało wzorcowemu fosforanowi mineralnemu. Dokładny obraz rozmieszczenia radioaktywności na elektroforogramie przedstawia ryc. 3, z której wynika, że największa radioaktywność występuje w wolnej P-serynie. Niewielkie dwa szczyty radioaktywności zlokalizowane na elektroforogramie przed P-seryną mogą pochodzić od fosfopeptydów, które wykazują dodatkową reakcję z ninhydryną. Niewielka radioaktywność przypadająca na P-treoninę zlokalizowana jest w szczycie radioaktywnym najbliższym P-seryny. Ponieważ, jak stwierdzono, największe piętno w badanym hydrolizacie przypada na wolną ^{32}P -serynę, w dalszych doświadczeniach przeprowadzono oddzielny rozdział elektroforetyczny frakcji II i III. Wyniki badań przedstawiono w tab. 1. Jak wynika z tabeli, 83% radioaktywności zlokalizowanej we frakcji II wymywającej się z kolumny po fosforanie mineralnym przypada na wolną P-serynę. Frakcja III skupia głównie fosfopeptydy, chociaż około 50% radioaktywności przypada również na wolną P-serynę. W analizie elektroforetycznej frakcji II i III oddzielnie nie udało się wykazać ilościowo wolnej P-treoniny. Najprawdopodobniej skupia się ona we frakcji fosfopeptydowej.

Tab. 1. Rozkład aktywności we frakcjach z kolumny Dowex-50 (H^+) po rozdziale elektroforetycznym
Distribution of the radioactivity in the fractions from the Dowex-50 (H^+) column after separation by electrophoresis

Frakcje z kolumny	aktywność %		
	P-peptydy	P-seryna	P-mine- ralny
Frakcja II	9,82	82,8	7,22
Frakcja III	47,00	53,00	—

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Do ekstrakcji całkowitych białek rybosomalnych stosuje się najczęściej metodę degradacji termicznej RNA kwasem trójchlorooctowym (1, 5, 10) oraz metodę ekstrakcji na zimno kwasem octowym (14, 15, 23). W naszych doświadczeniach sprawdzono obie metody ekstrakcji całkowitych białek rybosomalnych. Okazało się, że po ekstrakcji 66% kwasem octowym otrzymany materiał białkowy lepiej rozpuszczalny jest w wodzie i rozcieńczonym kwasie solnym. Ponadto hydrolizaty uzyskanych obiema metodami preparatów białkowych po rozfrakcjonowaniu na kolumnie Dowex-50 dawały podobne profile radioaktywności. Dlatego przyjęto do dalszych badań technikę ekstrakcji całkowitych białek rybosomalnych kwasem octowym.

W białku rybosomalnym obok radioaktywnej P-seryny stwierdzono niewielką ilość radioaktywnej P-treoniny. Oprócz tego wykryto inne radioaktywne produkty degradacji białka rybosomalnego. Ich mniejsza ruchliwość elektroforetyczna wskazuje, że są to połączenia radioaktywne o masie cząsteczkowej większej od P-seryny. Mogą to być fosfopeptydy posiadające w łańcuchu

jedną resztę P-seryny, gdyż jak wykazał Heald w swoich doświadczeniach stosując elektroforezę wysokonapięciową do rozdzielania badanych hydrolizatów fosfobiałek z dodatkiem wzorcowej fosfityny (7), fosfopeptydy posiadające jedną resztę P-seryny migrują wolniej od P-seryny.

Hydroliza białka rybosomalnego w kwasie solnym, prowadzona w temp. 100°, jest procesem dość drastycznym. Już po 10 godzinach hydrolizy obok znacznych ilości wolnej ³²P-seryny powstaje jeszcze więcej ³²P-fosforanu mineralnego. W naszych badaniach wcześniejszych (20) po 13 godzinach hydrolizy około 30 mg zasadowego białka rybosomalnego uzyskano tylko wolną P-serynę i duże ilości radioaktywnego fosforanu mineralnego wymywającego się, jak, wiadomo, z kolumny Dowex-50 w I szczycie radioaktywnym. W badaniach tych nie wykryto P-treoniny, która być może w przedłużonym czasie hydrolizy uległa rozkładowi. Zastosowany w obecnej pracy 10-godzinny czas hydrolizy był wystarczający dla wykazania dominującej zawartości P-seryny w całkowitym białku rybosomalnym.

PIŚMIENICTWO

1. Barden N., Labrie F.: *Biochemistry*, 12, 3096—3102, 1973.
2. Bitte L., Kabat D.: *J. Biol. Chem.*, 247, 5345—5350, 1972.
3. Blat C., Loeb J. E.: *FEBS Lett.*, 18, 124—126, 1971.
4. Eil C., Wool I. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1001—1009, 1971.
5. Gąsior E., Grankowski N., Turkowska T., Sz waj M.: *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska, Sectio C*, 23, 1—10, Lublin 1968.
6. Gąsior E., Sz waj M.: *Folia Soc. Sc. Lublinensis*, S. B, 9, 13—20, 1969.
7. Heald P. J.: *Biochem. J.*, 80, 510—514, 1961.
8. Kabat D.: *Biochemistry*, 9, 4160—4175, 1970.
9. Kabat D.: *Biochemistry*, 10, 197—203, 1971.
10. Kabat D.: *J. Biol. Chem.*, 247, 5338—5344, 1972.
11. Kennedy E. P., Smith S. W.: *J. Biol. Chem.*, 207, 153—163, 1954.
12. Loeb J. E., Blat C.: *FEBS Lett.*, 10, 105—108, 1970.
13. Lowry O. H., Rosenbrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
14. Moller W., Widdowson J.: *J. Mol. Biol.*, 24, 367—378, 1967.
15. Rodgers A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 294, 292—296, 1973.
16. Saito K., Akashi S.: *J. Biochem.*, 44, 511, 1957.
17. Stahl J., Welfle H., Bielka H.: *FEBS Lett.*, 26, 233—236, 1972.
18. Sz waj M.: *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska Sectio D*, 20, 61—68, Lublin 1965.
19. Sz waj M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 19, 777—782, 1971.
20. Sz waj M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 21, 783—789, 1973.
21. Traugh J. A., Traut R. R.: *Biochemistry*, 11, 2503—2509, 1972.
22. Traugh J. A., Mumby M., Traut R. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 373—376, 1973.
23. Waller J. P., Harris J. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 47, 18—23, 1961.
24. Walton G. M., Gill G. N.: *Biochemistry*, 12, 2604—2611, 1973.

Otrzymano 8 VII 1974.

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты электрофоретического раздела кислого гидролизата рибосомального ³²P-белка клеток асцитной опухоли Эрлиха.

В этом гидролизате при использовании электрофореза обнаружили присутствие радиоактивного фосфосерина и малое количество фосфотреонина.

Кроме этих эфиров обнаружили другие радиоактивные соединения частичного гидролиза рибосомального белка обладающие меньшей электрофоретической подвижностью. Это вероятно фосфосерин в своем составе.

С проведенных исследований следует, что в рибосомальном белке клеток асцитной опухоли Эрлиха структуральные фосфопротеиды имеют фосфат связанный особенно с серином.

•
S U M M A R Y

The results of the electrophoretic separation of ^{32}P -ribosomic protein acidic hydrolysate from Ehrlich's Ascites tumor cells were presented. In this material by means of radioactive electrophoresis P-serine and minute amounts P-threonine were found. Simultaneously other radioactive products of partial hydrolysis of ribosomic protein were detected. The electrophoretic mobility of this product was less than that of the above mentioned esters. These are most probably phosphopeptides containing one radical of the P-serine. The above investigations show, that the structural phosphopeptides of the total ribosomic proteins of Ehrlich's Ascites tumor cells contain phosphate bound mainly with serine.