

Halina BRZUSZKIEWICZ-ŻARNOWSKA,
Anna KORNAS, Tomasz BORKOWSKI

Izoakceptorowe fenyloalanylo-tRNA w mózgu cieląt*

Изоакцепторные фенилаланиль-tRNA мозга телят

The Isoacceptors of Phenylalanyl-tRNAs of the Calf Brain

Istnieje wiele informacji wskazujących na fakt, że mitochondria są zdolne do semiautonomicznej syntezy białka, różniącej się od tego procesu zachodzącego w cytozolu organizmów eukariotycznych (21). Stwierdzono między innymi, że mitochondria i chloroplasty zawierają tRNA i aminoacyl-tRNA syntetazy różniące się od cytozolowych (1, 3, 8, 9, 12, 17). W poprzedniej naszej pracy wykazaliśmy, że mitochondria izolowane z mózgu cieląt zawierają mniejszą ilość izoakceptorowych glutamyl-tRNA w porównaniu z cytozolem (5). Opierając się na znanych faktach dotyczących struktury izoakceptorowych tRNA^{Fen} (25) przeprowadzono w niniejszej pracy badania nad rozmieszczeniem fenyloalanylo-tRNA w mitochondriach i cytozolu mózgowi cielęcych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenia przeprowadzono na świeżych mózgach cielęcych otrzymanych z Zakładów Mięśnych w Lublinie. Z wypreparowanych skrawków kory mózgowej sporządzano 10% homogenat w 0,44 M roztworze sacharozy w 0,01 M buforze Tris-HCl pH 7,2 z dodatkiem 5 mM soli sodowej EDTA. Homogenizację przeprowadzono w homogenizatorze typu Potter-Elvehjem z teflonowym pistlem. Mitochondria izolowano na drodze różnicowego wirowania wg metody Lövtrupa (19). Postmitochondrialny supernatant po osadzeniu frakcji mikrosomalnej przez wirowanie przy 105000 × g w ciągu 1,5 godz. stanowił frakcję cytozolową. Do badań stosowano radioaktywne preparaty:

[¹⁴C (U)]-L-phenylalanine, akt. właśc. 0,33 Ci/mmol, firmy UVVVR Prague, Czechoslovakia.

(³H)-L-phenylalanine, akt. właśc. 20 Ci/mmol, firmy Amersham, England.

Otrzymywanie tRNA cytozolowego i mitochondrialnego

Do postribosomalnego supernatantu dodawano octanu potasu do stężenia 2% oraz 2 objętości etanolu. Po przechowaniu w ciągu 12 godz. w temp. -20°C wytra-

* Praca była częściowo dotowana przez PAN w ramach problemu węzłowego 09.3.1.

cone białko i kwasy nukleinowe oddzielano na drodze wirowania. Nukleoproteidowy precipitat cytozolowy, podobnie jak osady mitochondrialne, zawieszano w 0,14 M NaCl w buforze 0,01 M Tris-HCl pH 7,2, poddawano ekstrakcji fenolowej w obecności 0,5% SDS zgodnie z wcześniej opisanymi metodami (2, 3, 4, 7).

Preparaty mitochondrialnych i cytozolowych kwasów nukleinowych rozdzielało wstępnie przez precipitację wysokocząsteczkowego RNA chlorkiem sodowym (6) lub na kolumnach z metyloowaną albuminą (20). Frakcje eluujące się 0,4 M NaCl po precipitacji etanolem traktowano jako totalne preparaty tRNA.

Otrzymywanie aminoacyl-tRNA syntetaz

Osad mitochondrialny zawieszano w buforze 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 z dodatkiem 0,15 M KCl, 1 mM EDTA i 1 mM 2-merkaptoetanolu, poddawano działaniu ultradźwięków w sonikatorze prod. MSE, przy maksymalnej amplitudzie, 4×1 min., temp. 0°C. Rozbite mitochondria wirowano przez 70 min. przy $100\,000 \times g$. Supernatant wysalano siarczanem amonu do 60% nasycenia. Osad wirowano przy $10\,000 \times g$ przez 30 min., rozpuszczano w 0,05 M buforze Tris-HCl pH 7,5 z dodatkiem 1 mM 2-merkaptoetanolu i poddawano dializie przez 20 godz. wobec tego samego buforu. Białka enzymatyczne zagęszczano za pomocą dializy wobec polietylenoglikolu w substancji.

Aminoacyl-tRNA syntetazy cytozolowe otrzymywano zbierając frakcje wysalające się siarczanem amonu w przedziale 25–60% nasycenia z supernatantu po wirowaniu przy $105\,000 \times g$. Dodatkowo oczyszczano mitochondrialne i cytozolowe syntetazy na drodze chromatografii na kolumnach z DEAE celulozy zgodnie z wcześniej opisaną metodą (9). Zawartość białka oznaczano ilościowo metodą Lowry (18).

Aminoacylacja tRNA

Poszczególne preparaty tRNA inkubowano w obecności ^{14}C - i ^3H -fenyloalaniny i odpowiednio homologicznego subcelularnie enzymu. Skład standardowej mieszanki inkubacyjnej: 50 μmola buforu Tris-HCl pH 7,5, 10 μmola MgCl_2 , 2,5 μmola KCl, 2 μmole ATP, 1 μmol ditiotretolu, 5–10 μCi ^{14}C - lub ^3H -Fen, 0,5–1,0 mg białka enzymatycznego, około 1,0 mg tRNA w objętości 1 ml. Czas inkubacji 30 min. w temp. 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie równej objętości 90% fenolu i przeprowadzano ekstrakcję przez 1 godz. Po odwirowaniu fazę wodną wytrącano etanolem. Osad zawieszano w buforze 0,01 M CH_3COONa , 0,01 M MgCl_2 pH 4,7 i dializowano przez 20 godz. wobec tego samego buforu.

Chromatografia na BD-celulozie

Preparaty aminoacyl-tRNA mitochondrialnego i cytozolowego (ok. 40 j.E₂₆₀) nanoszono na kolumny o wymiarach $0,9 \times 15$ cm wypełnione BD-celulozą i zrównoważone buforem octanowym. Elucję prowadzono gradientem ciągłym NaCl 0,3–0,9 M w 50 mM CH_3COONa , 10 mM MgCl_2 pH 4,5 metodą Gillama (11). Zbierano frakcje 3 ml. W końcowym etapie kolumnę przemywano alkoholowym roztworem 1 M NaCl.

Chromatografia w odwróconej fazie (RPC₅)

Rozdział w systemie RPC₅ przeprowadzono wg metody Weissa i Kelmersa (24). Voltalef-Adogen (15) zawieszano w buforze 0,01 M CH_3COONa , 0,01 M MgCl_2 pH 4,7 i przygotowywano kolumny o wymiarach $0,9 \times 30$ cm. Po przemyciu buforem octanowym zawierającym 1,5 M NaCl w celu usunięcia zanieczyszczeń kolumny równoważono buforem startowym. Próbkę aminoacyl-tRNA w ilości 20–40 j.E₂₆₀ nanoszono na kolumny i eluowano linearnym gradientem NaCl 0,3–0,9 M w 0,01 M CH_3COONa , 0,01 M MgCl_2 pH 4,7.

Pomiar radioaktywności

Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym firmy Intertechnique SL-30 z krążków bibuły wg metody Rubina (23). Próbką zawierała 20 mg PPO, 0,5 mg POPOP w 5 ml toluenu.

WYNIKI BADAŃ

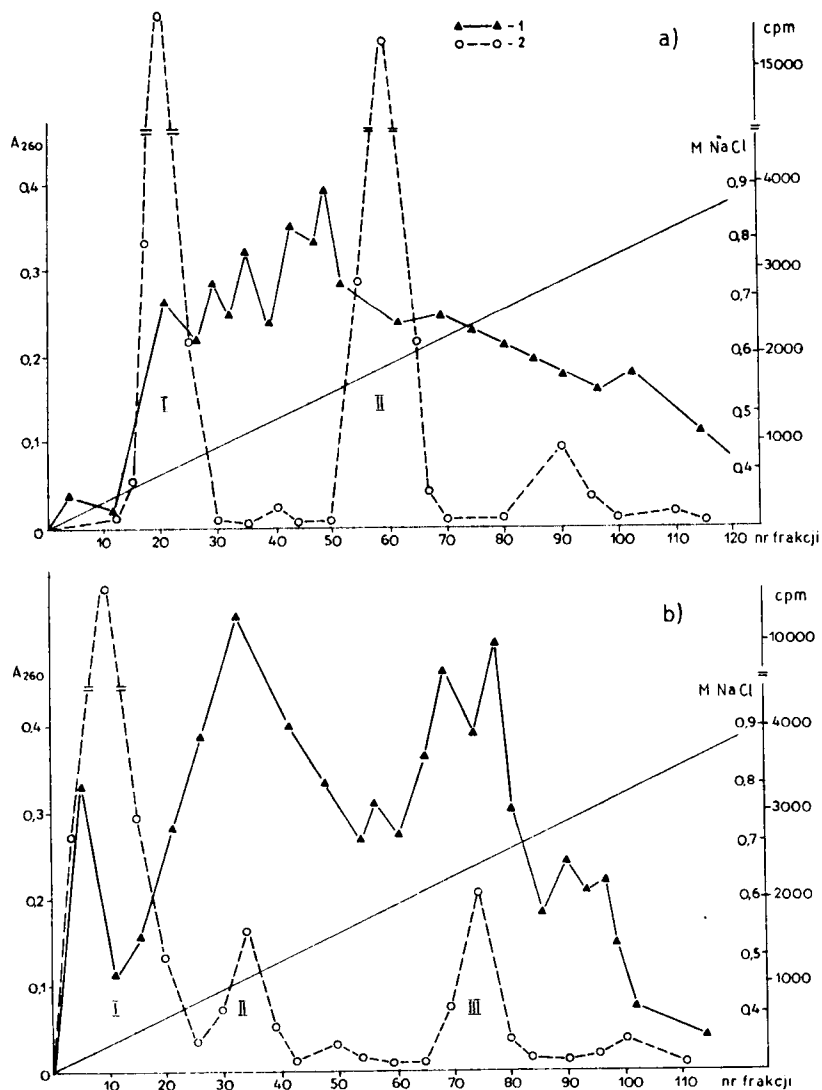
Preparaty ^{14}C -fenyloalanylo-tRNA mitochondrialne i cytozolowe rozdzielane na kolumnach z BD-celulozy różniły się między sobą (ryc. 1). Krzywa absorpcji przy 260 nm wykazuje obecność jednej frakcji eluującej niskimi stężeniami NaCl w tRNA mitochondrialnym. W tRNA cytozolowym oprócz tej frakcji występuje szereg frakcji przy stężeniu 0,5—0,8 M. W obydwu analizowanych preparatach wykazywano obecność niewielkich ilości tRNA wymywanych z kolumny 1M NaCl z dodatkiem etanolu.

Zasadnicze różnice dotyczą ilości szczytów radioaktywnych w chromatogramach tRNA mitochondrialnego i cytozolowego. W tRNA mitochondrialnym występują 2, a w tRNA cytozolowym 3 wyraźne radioaktywne frakcje, przy czym w obydwu preparatach znaczna ilość radioaktywności skupiona była we frakcji wymywanej wysokim stężeniem NaCl. Podobne różnice wykazywały preparaty tRNA mitochondrialnego i cytozolowego podczas chromatografii w odwróconej fazie (ryc. 2).

W tRNA mitochondrialnym występowały 2 główne frakcje radioaktywne i 3 w tRNA cytozolowym. W obydwu analizowanych preparatach obok głównych frakcji charakteryzujących się wysoką aktywnością występowały w różnych punktach chromatogramów niewielkie wzrosty radioaktywności, które mogą być traktowane jako wahania tła. Dla ustalenia relacji między izoakceptorowymi fenyloalanylo-tRNA obecnymi w cytozolu i mitochondriach mózgowych przeprowadzono analizę rozdziału połączonych preparatów tRNA. Preparat mitochondrialny aminoacylowano ^3H -fenyloalaniną, a cytozolowy ^{14}C -fenyloalaniną w obecności subcelularnie homologicznych aminoacyl-tRNA syntetaz. Połączone preparaty rozdzielano w systemie RPC_5 (ryc. 3). Jak wynika z ryc. 3, w obrazie chromatograficznym występują 2 szczyty radioaktywności ^3H -fenyloalaniny i 3 szczyty ^{14}C -fenyloalaniny. Dwom szczytom mitochondrialnego fenyloalanylo-tRNA odpowiadają dwa szczyty w preparacie cytozolowym. Dodatkowy trzeci szczyt radioaktywności fenyloalanylo-tRNA cytozolowego nie posiada swego odpowiednika w preparacie mitochondrialnym.

DYSKUSJA

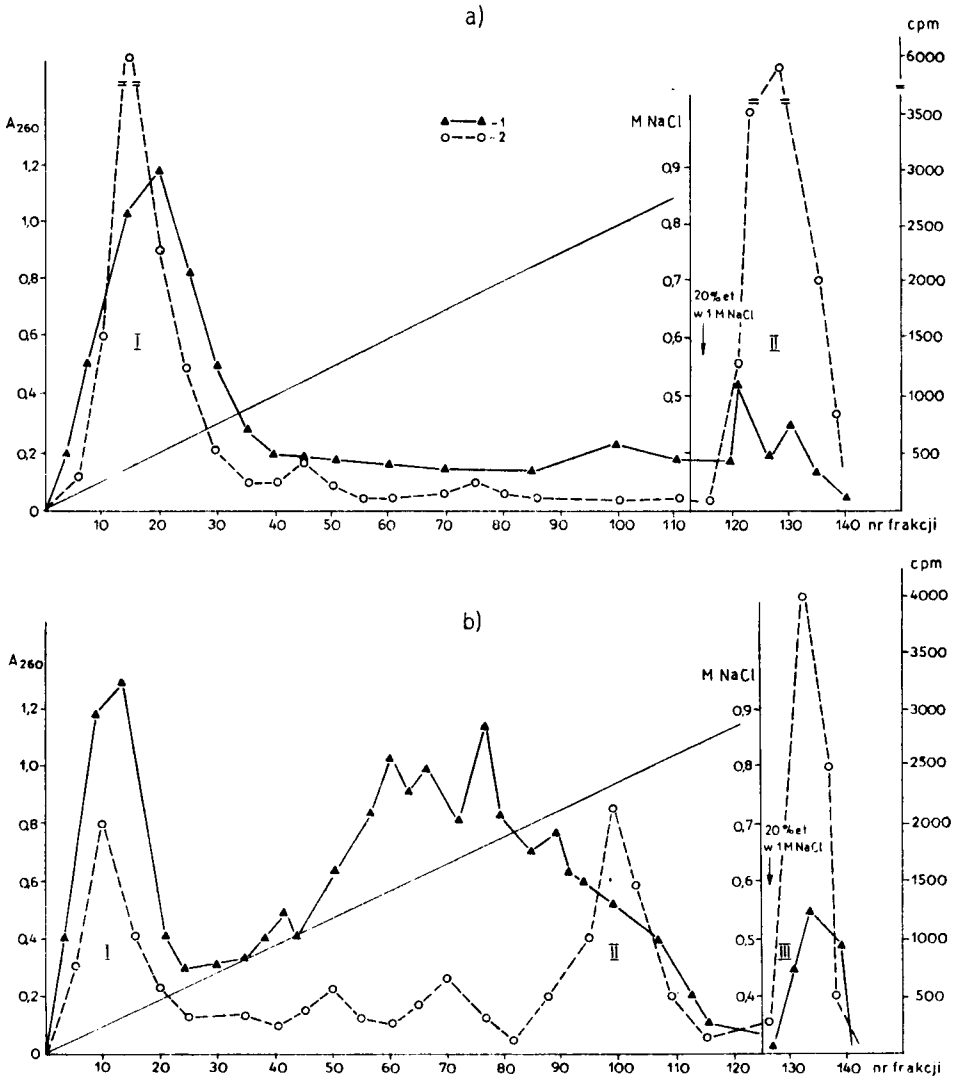
Obecność hipermodyfikowanego nukleotydu (zasada Y) pozwala na różnicowanie fenyloalanylo-tRNA (22). Z dotychczasowych informacji wynika, że organizmy prokariotyczne oraz organelle eukariotów nie posia-



Ryc. 1. Rozdział chromatograficzny kwasów nukleinowych w systemie RPC₅; a — tRNA mitochondrialny, b — tRNA cytozolowy, 1 — absorpcja przy 260 nm, 2 — aktywność w cpm

Chromatographic separation of ribonucleic acids in RPC₅ system; a — mitochondrial tRNA, b — cytoplasmic tRNA, 1 — extinction at 260 nm, 2 — activity in cpm

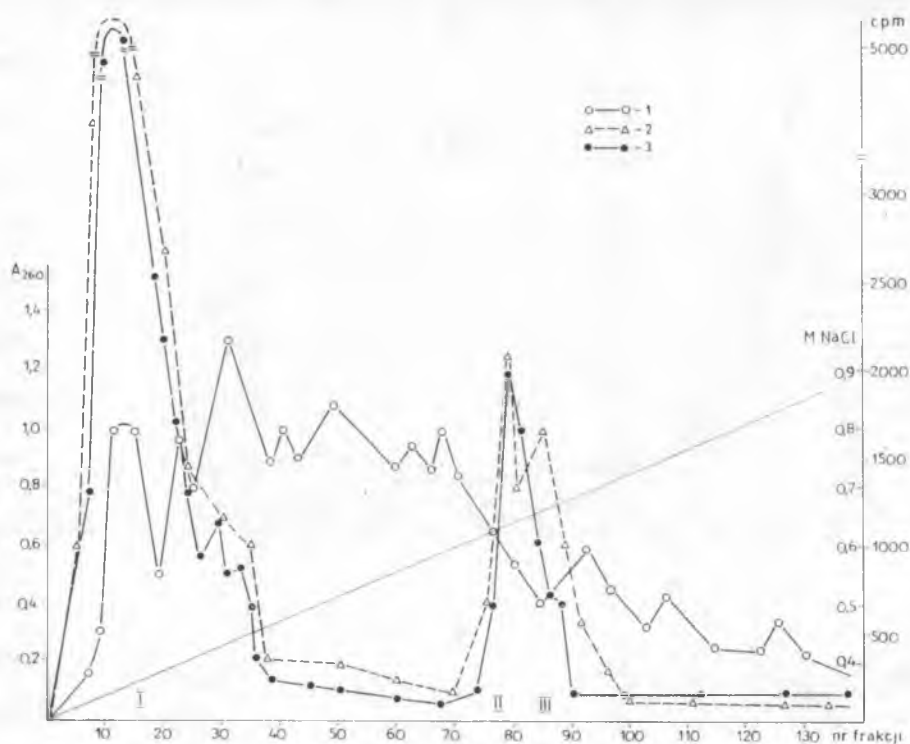
dają tRNA^{Fen} zawierającego zasadę Y (10). Ten typ tRNA^{Fen} jest charakterystyczny dla cytozolu organizmów eukariotycznych. Jednakże w badaniach nad *Drosophila melanogaster* (25) nie stwierdzono obecności tRNA^{Fen} związanych silnie na kolumnie z BD-celulozy.



Ryc. 2. Rozdział chromatograficzny kwasów nukleinowych na kolumnach z BD-celulozy; a — tRNA mitochondrialny, b — tRNA cytozolowy, 1 — absorpcja przy 260 nm, 2 — aktywność w cpm

Chromatographic separation of ribonucleic acids on BD-cellulose; a — mitochondrial tRNA, b — cytoplasmic tRNA, 1 — extinction at 260 nm, 2 — activity in cpm

W naszych doświadczeniach z rozdziałaniem fenylalanyno-tRNA na kolumnach z BD-celulozą w preparatach tRNA izolowanych z mitochondriów mózgowych również nie stwierdziliśmy obecności frakcji wymywających się wyższymi stężeniami NaCl, w przeciwieństwie do preparatów tRNA pochodzenia cytozolowego. Natomiast w obydwu preparatach otrzymy-



Ryc. 3. Co-chromatografia ^{14}C -fenyloalanylo-tRNA cytozolowego i ^3H -fenyloalanylo-tRNA mitochondrialnego w systemie RPC_5 ; 1 — absorpcja przy 260 nm, 2 — aktywność ^{14}C -, 3 — aktywność ^3H -. Patrz materiał i metody
 Co-chromatography of cytoplasmic ^{14}C -phenylalanine-tRNA and mitochondrial ^3H -phenylalanine-tRNA in RPC_5 system; 1 — extinction at 260 nm, 2 — activity ^{14}C - in cpm, 3 — activity ^3H - in cpm. See Material and Methods

waliśmy frakcje fenyloalanylo-tRNA dopiero po przemyciu kolumny BD-celulozowej 1M NaCl z dodatkiem etanolu. Tym samym preparat tRNA cytozolowego charakteryzował się obecnością 3, a preparat mitochondrialny 2 izoakceptorowych fenyloalanylo-tRNA. Fakt ten potwierdziły doświadczenia z zastosowaniem chromatografii w odwróconej fazie. Ze względu na małe ilości badanych preparatów nie udało się potwierdzić lub wykluczyć obecności zasady Y w analizowanych izoakceptorowych tRNA^{Fen}.

Z wielu nagromadzonych informacji wynika, że poszczególne specyficzne tRNA wykazują różne ilości izoakceptorowych frakcji. W rozwijających się ziarnach jęczmienia wykazano aż 9 izoakceptorowych fenyloalanylo-tRNA (16). W tkankach roślinnych stwierdzono większe ilości izoakceptorowych tRNA^{Leu} i tRNA^{Met} w chloroplastach i mitochondriach niż w cytozolu (13, 14). Nasze wcześniejsze prace nad aktywnością syntetaz

mitochondrialnych i cytozolowych mózgu (3) oraz różne ilości izoakceptorowych glutamyl-tRNA w cytozolu i mitochondriach (5) łącznie z wynikami obecnej pracy pozwalają sugerować mniejsze zróżnicowanie układu mitochondrialnego w porównaniu z cytozolem w tkance mózgowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Barnett W. E., Brown D. H., Epler J. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **57**, 1775—1781, 1967.
2. Borkowski T., Sikorska K., Borkowska I.: *Macromolecules and Function of the Neuron* (Z. Lodin and S.P.R. Rose, eds), *Excerpta Medica Foundation*, Amsterdam, 187—192, 1968.
3. Borkowski T., Charęziński M.: *J. Neurochem.* **18**, 851—857, 1971.
4. Borkowski T.: *Acta Neurobiol. Exp.* **31**, 389—398, 1971.
5. Borkowski T., Brzuszkiewicz-Zarnowska H.: *J. Neurochem.* **25**, 641—644, 1975.
6. Boyadjiev S. I., Hadjiolov A. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 341—351, 1968.
7. Brzuszkiewicz-Zarnowska H., Borkowski T.: *Folia Soc. Scient. Lublin* **16**, 47—54, 1974.
8. Buck C. A., Nass M. M. K.: *J. Mol. Biol.* **41**, 67—82, 1969.
9. Charęziński M., Borkowski T.: *Acta Biochim. Polon.* **20**, 153—158, 1973.
10. Fairfield S. A., Barnett W. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 2972—2976, 1971.
11. Gilliam J., Millward S., Blew D., Tigerstrom M., Wimmer E., Tener G. M.: *Biochemistry* **6**, 3043—3056, 1967.
12. Guderian R. H., Pulliam R. L., Gordon M. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 50—65, 1972.
13. Guillemaut P., Steinmetz A., Burkard G., Weil J. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **378**, 64—72, 1975.
14. Guillemaut P., Weil J. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **407**, 240—248, 1975.
15. Hentzen D., Foerequier A., Garel J. P.: *Analyt. Biochem.* **53**, 299—303, 1973.
16. Hiatt V. S., Snyder L. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **324**, 57—68, 1973.
17. Kislev N., Selsky M. I., Norton C., Eisenstadt J. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 256—269, 1972.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
19. Lövttrup S., Zelander T.: *Expl. Cell. Res.* **27**, 468—473, 1962.
20. Mandell J., Hershey A. D.: *Analyt. Biochem.* **1**, 66—67, 1960.
21. Rabinowitz M., Swift H.: *Physiol. Rev.* **50**, 376—427, 1970.
22. Rajbhandary U. L., Chang S. H., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskinson R. M., Khorana H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **57**, 751—758, 1967.
23. Rubin I. B., Kelmers A. D., Golstein G.: *Analyt. Biochem.* **20**, 533—544, 1967.
24. Weiss J. F., Kelmers A. D.: *Biochemistry* **6**, 2507—2513, 1967.
25. White B. N., Tener G. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **312**, 267—275, 1973.

РЕЗЮМЕ

Из митохондрии и цитозола мозга телят изолировали аминокислотированный ^{14}C -фенилаланином через субцеллюлярные гомологические аминокислотил-tRNA синтетазы, и разделяли на колонках из BD-целлюлозы, а также в системе RPC.

Препарат митохондриального tRNA всегда показывал 2, а цитозолового — 3 изоакцепторных tRNA^{Fen}.

В опытах с двойной меткой обнаружено, что трем пикам радиоактивности цитозолового tRNA^{Fen} соответствовали только два пика митохондриального tRNA^{Fen}.

SUMMARY

tRNA isolated from mitochondria and cytosol of the calf brain which was aminoacylated with ^{14}C -phenylalanine in presence of subcellular homologous aminoacyl-tRNA synthetases were separated on BD-cellulose columns, as well as in the RPC₈ system.

The mitochondrial tRNA preparation always showed two and cytoplasmic one showed three tRNA phenylalanine isoacceptors.

In the experiments with the double labelling, it has been proved that three peaks of radioactivity of cytoplasmic tRNA only corresponded to two peaks of mitochondrial tRNA phenylalanine.