

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXV, 29

SECTIO D

1980

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

Wiesława OGRODNIK

**Inkorporacja znakowanych aminokwasów do subcelularnych struktur
mózgu królika**

Инкoрпoрация радиоактивных аминокислот в субцеллулярные фракции мозга
кроликов

The Incorporation of Labelled Amino Acids into the Subcellular Fractions of the
Rabbit Brain

Reakcja aktywacji aminokwasów i wiązania ich ze specyficznymi nośnikowymi RNA może stanowić jedną z kluczowych pozycji regulacyjnych biosyntezy białka w mózgu. Wyniki poprzednich prac wykonywanych w naszym laboratorium wykazały, że mózg odznacza się szczególnie wysoką aktywnością glutamyl-tRNA syntetazy, zlokalizowanej zarówno w cytosolu, jak i w mitochondriach (3, 4, 6, 9). Wydawało się zatem interesujące porównanie wyników badań *in vitro* z procesami przebiegającymi *in vivo*.

W niniejszej pracy przeprowadzono więc określenie stopnia wbudowania kwasu glutaminowego i leucyny do białek struktur subkomórkowych w różnym czasie po dokomorowym wprowadzeniu znakowanych aminokwasów. Ponadto przez izolowanie kwasów nukleinowych z poszczególnych frakcji subkomórkowych i oznaczenie ich radioaktywności próbowano wykazać obecność radioaktywnego aminoacyl-tRNA.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

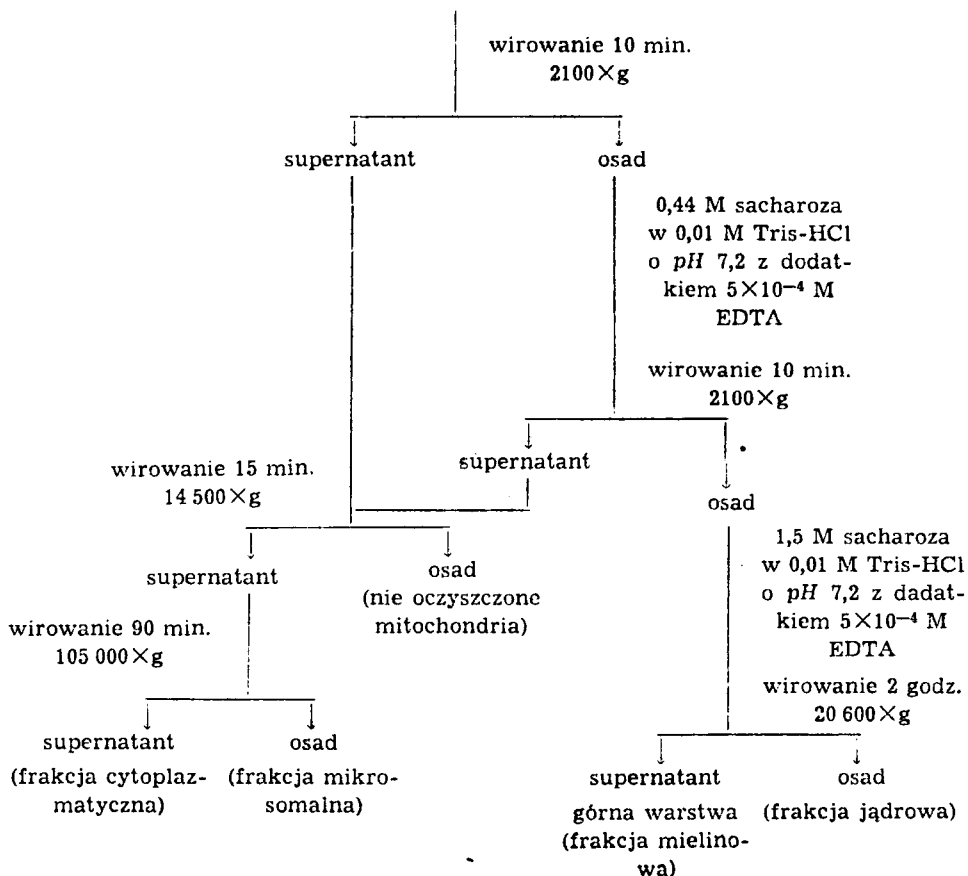
Dojrzałym królikom w stanie narkozy podawano bezpośrednio do czwartej komory radioaktywny aminokwas w ilości 50 μCi na jedno zwierzę doświadczalne. Następnie zwierzęta zabijano po upływie 3, 6 lub 13 godzin, wypreparowywano mózg, z którego przygotowywano 10% homogenat sacharozy.

Otrzymywanie struktur subkomórkowych

W celu otrzymania struktur subkomórkowych przeprowadzono różnicowe wirowanie homogenatu w 0,44 M roztworze sacharozy. Metoda ta pozwoliła otrzymać pięć frakcji subkomórkowych, a mianowicie frakcję jądrową, mitochondrialną, mieliniową, mikrosomalną i cytosolową (5). Dodatkowemu oczyszczaniu poddano frakcję jądrową poprzez wirowanie w 1,5 M roztworze sacharozy (5) oraz frakcję mitochondrialną poprzez wirowanie w gradiencie ficollu (10).

SCHEMAT OTRZYMYWANIA STRUKTUR SUBCELULARNYCH Z TKANKI MÓZGU

10% homogenat tkanki w 0,44 M sacharozie w 0,01 M buforze Tris-HCl o pH 7,2 z dodatkiem 5×10^{-4} M EDTA



Ekstrakcja kwasów nukleinowych

Każdą z wymienionych struktur dokładnie scharakteryzowano, oznaczając zawartość kwasów nukleinowych i białka. W tym celu przeprowadzono ekstrakcję kwasów nukleinowych nie zobojętnionym fenolem (22). Następnie po strąceniu etanolem białek i kwasów nukleinowych, w fazie wodnej i fenolowej oznaczano ilość

ciowo zawartość kwasu rybonukleinowego metodą orcynolową (17) oraz zawartość kwasu dezoksyrybonukleinowego metodą Burtona (7), a zawartość białka metodą Lowry (16).

Oznaczanie radioaktywności

Tak scharakteryzowane struktury subkomórkowe mózgu królika były przedmiotem badań izotopowych. Oznaczono radioaktywność białek (19) oraz kwasów nukleinowych (12) poszczególnych frakcji.

Frakcjonowanie kwasów nukleinowych

Następnie przystąpiono do poszukiwania metabolitu pośredniego w biosyntezie białka, jakim jest aminoacyl-tRNA. W tym celu kwasy nukleinowe rozdzielano na żelu poliakrylamidowym (18). Pasma lokalizacji tRNA eluowano i oznaczano radioaktywność (12). Przeprowadzono także rozdział kwasów nukleinowych na kolumnie z metylowaną albuminą według Suoeki i Chonga (23). Poszczególne frakcje eluowano roztworem chlorku sodu w gradiencie skokowym od 0,2 do 0,8 M. W końcowej fazie kolumnę przemywano 1,5 M roztworem NaCl z dodatkiem amoniaku. Poszczególne frakcje strącano podwójną objętością 96% etanolu. Po oddzieleniu kwasów nukleinowych od etanolu oznaczano radioaktywność (12).

WYNIKI BADAŃ

Pierwsza seria badań dotyczyła charakterystyki frakcji subkomórkowych mózgu. Charakterystykę tę oparto o ilościowe oznaczanie zawartości RNA, DNA i białka w poszczególnych strukturach komórki. W tab. 1 umieszczono wyniki zbiorcze dla 5 frakcji subkomórkowych. Jak wynika z przedstawionych wartości, we frakcji jądrowej dominuje kwas dezoksyrybonukleinowy, którego zawartość wynosi 115,2 μg P-DNA, a kwas rybonukleinowy występuje w ilości 59,4 μg P-RNA na 1 g świe-

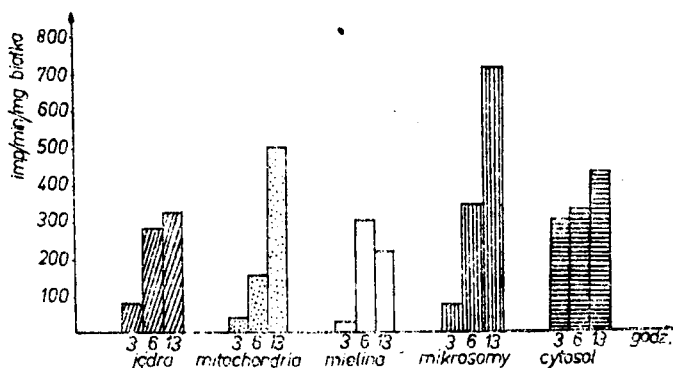
Tab. 1. Zawartość RNA, DNA i białka we frakcjach subcelularnych mózgu królika (wartości średnie na 1 g świeżej tkanki)

The contents of RNA, DNA and protein in the subcellular fractions of the rabbit brain (mean values/g wet tissue)

Frakcje subcelularne	P-RNA μg	P-DNA μg	Białko mg
Jądra	59,4	115,2	22,6
Mito-chondria	26,9	1,07	18,1
Mielina	41,6	39,6	65,2
Mikrosomy	64,0	0	13,2
Cytosol	33,9	0	22,3

zej tkanki. Mitochondria zawierają zaledwie 1,07 μg P-DNA oraz 26,9 μg P-RNA. Frakcje mikrosomalna i cytosolowa nie zawierają kwasu dezoksyrybonukleinowego. Największa ilość RNA, przypadająca na 1 g tkanki, występuje we frakcji mikrosomalnej i wynosi 64 μg P-RNA. W białkach poszczególnych frakcji subkomórkowych oznaczono radioaktywność i uzyskane wartości wyrażono w ilości impulsów na minutę na mg białka.

Na ryc. 1 przedstawiono graficznie aktywności właściwe białek różnych frakcji po inkorporacji ^{14}C kwasu glutaminowego. Można stwierdzić, że w eksperymentach 3-godzinnych nie było wyraźnych różnic w aktywnościach właściwych białek, z wyjątkiem białek frakcji cytosolowej. Po 6 godz. inkorporacji znakowanego aminokwasu jedynie wartość aktywności białek frakcji mitochondrialnej była wyraźnie niższa od pozostałych. Najwyraźniejsze różnice występowały w doświadczeniach 13-godzinnych. Białka frakcji mikrosomalnej posiadały najwyższą aktywność właściwą, niższą białka frakcji mitochondrialnej i kolejno niższą białka frakcji cytosolowej i jądrowej, a najniższą białka frakcji mielinowej.



Ryc. 1. Wpływ czasu na inkorporację ^{14}C kwasu glutaminowego do białek różnych frakcji subcelularnych mózgu królika
The influence of time on the incorporation of ^{14}C glutamic acid into the proteins of the rabbit brain subcellular fractions

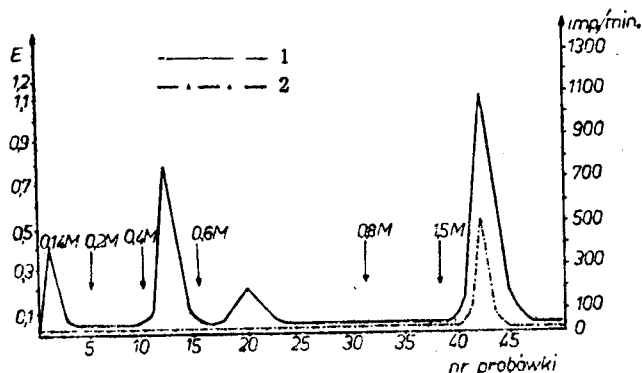
W badaniach nad inkorporacją radioaktywnych aminokwasów do białek struktur subkomórkowych zastosowano również ^{14}C leucynę. Aktywność właściwa białek po 13 godz. inkorporacji okazała się identyczna z wartościami otrzymanymi w doświadczeniu z ^{14}C kwasem glutaminowym, z wyjątkiem białek frakcji mielinowej i cytosolowej, których aktywności właściwe były znacznie wyższe (tab. 2).

Mimo że w wyniku ekstrakcji fenolowej całość białek znajdowała się w fazie fenolowej, przeprowadzono kontrolne pomiary radioaktywności fazy wodnej zawierającej głównie kwasy nukleinowe. Okazało się, że

Tab. 2. Radioaktywność białek frakcji subcelularnych mózgu królika w 13 godz. po iniekcji ^{14}C leucyny i ^{14}C kwasu glutaminowego
Radioactivity of the proteins of the rabbit brain subcellular fractions after 13 hours following injection of ^{14}C leucine and ^{14}C glutamic acid

Amino- kwas	Imp./min./mg białka				
	jądra	mito- chondria	mielina	mikro- somy	cytosol
^{14}C leucyna	318,0	480,2	552,6	888,6	886,5
^{14}C kwas gluta- minowy	318,0	480,2	172,0	712,0	408,0

niezależnie od czasu inkorporacji znakowanych aminokwasów, fazy wodne wszystkich badanych frakcji subkomórkowych wykazują pewną radioaktywność. Nasunęło się przypuszczenie, że może ona pochodzić bądź z tRNA, który uległ aminoacylacji, a więc związał ^{14}C kwas glutaminowy lub ^{14}C leucynę, albo są to ślady radioaktywnego białka związanego z RNA. Aby to wyjaśnić, przeprowadzono rozdział kwasów nukleinowych na żelu poliakrylamidowym. Analizie poddano przede wszystkim kwasy nukleinowe frakcji cytosolowej i mitochondrialnej ze względu na obecność w tych frakcjach dużych ilości tRNA. Pasma lokalizacji tRNA wyeluwano i oznaczono w nich radioaktywność. Ponieważ w badanych próbach nie stwierdzono żadnych impulsów, przeprowadzono dodatkowo rozdział kwasów nukleinowych na kolumnie z metylovaną albuminą. Metoda ta w porównaniu z rozdziałem na żelu poliakrylamidowym pozwoliła rozdzielić znacznie większe ilości kwasów nukleinowych, a tym samym

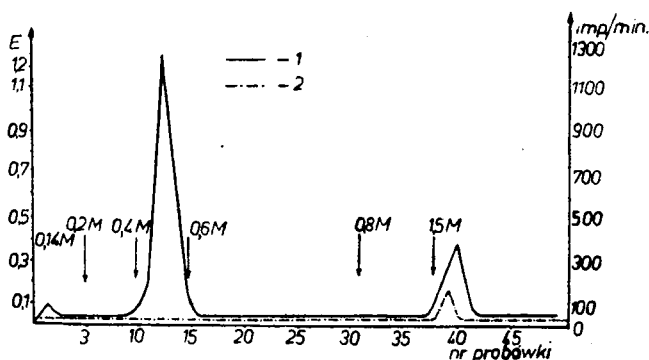


Ryc. 2. Chromatografia kwasów nukleinowych frakcji mitochondrialnej na kolumnie z metylovaną albuminą, 1 — absorpcja 260 nm, 2 — radioaktywność
Chromatography of nucleic acids of mitochondrial fractions on the methylated albumin column, 1 — absorption 260 nm, 2 — radioactivity

zwiększała się możliwość uchwycenia radioaktywności w aminoacyl-tRNA. Wyniki rozdzielania kwasów nukleinowych na kolumnie przedstawiono na ryc. 2 i 3.

Jak widać na ryc. 2 frakcja mitochondrialna zawierała dość znaczną ilość RNA eluującego się 0,4 M roztworem NaCl, bardzo małą ilość DNA, ponadto występował RNA elujący się 1,5 M roztworem NaCl z dodatkiem amoniaku. Natomiast frakcja cytosolowa zawierała dużą ilość RNA elującego się 0,4 M roztworem NaCl oraz niewiele RNA wypływającego z kolumny przy 1,5 M stężeniu NaCl z dodatkiem amoniaku (ryc. 3).

We wszystkich frakcjach wykonano pomiary radioaktywności. Okazało się, że radioaktywność występuje jedynie we frakcji eluującej się 1,5 M roztworem NaCl. Natomiast frakcja zawierająca tRNA nie wykazywała żadnej radioaktywności.



Ryc. 3. Chromatografia kwasów nukleinowych frakcji cytosolowej na kolumnie z metylowaną albuminą, objaśnienia patrz ryc. 2

Chromatography of nucleic acids of the cytoplasmic fractions on the methylated albumin column, for explanation see Fig. 2

DYSKUSJA

Badania biosyntezy białka *in vivo* napotykać na duże trudności. Najwcześniej i najczęściej stosowaną metodą jest określenie inkorporacji radioaktywnych aminokwasów po ich przyżyciowym podaniu. Na podstawie aktywności właściwej dokonuje się oceny stanu dynamicznego poszczególnych narządów i tkanek. Stosunkowo wysoki współczynnik metabolizmu białkowego wykazano dla tkanki mózgu. W badaniach tych stwierdzono różnice między określonymi obszarami mózgu (1, 13), a także między poszczególnymi subfrakcjami komórkowymi (14).

Wiele kontrowersji w ocenie metabolizmu białek w mózgu wywołuje interpretacja sposobu przyżyciowego podawania znakowanych aminokwa-

sów. Najczęściej stosowana jest metoda iniekcji dożyłnej, dootrzewnowej lub dokomorowej. Ostatnio wprowadzono metodą podskórnej inplantacji wolno rozpuszczającej się pigułki zawierającej ^{14}C tyrozynę (15). Użytkiwano stałą aktywność specyficzną wolnej tyrozyny w osoczu w ciągu 5 dni. W niniejszej pracy zastosowano metodę jednorazowej iniekcji znakowanego aminokwasu do czwartej komory mózgu królika. W ten sposób starano się uniknąć wpływu bariery krwio-mózgowej na szybkość wbudowywania aminokwasów do białek mózgowych. Istnieją wprawdzie poglądy, że dokomorowe podawanie znakowanego aminokwasu nie przyspiesza procesu jego wbudowywania do białek. Przykładem tych sugestii są badania Berla (2). Jednak to fakt niezaprzeczalny, że proces syntezy białek mózgowych jest ściśle uzależniony od dynamicznego transportu aminokwasów właśnie przez barierę krwio-mózgową.

W naszych badaniach po wprowadzeniu drogą iniekcji do czwartej komory 50 μCi kwasu glutaminowego wykazano po 3 godz. radioaktywność w białkach wszystkich frakcji subkomórkowych. Najwyższą radioaktywność posiadały białka frakcji cytosolowej. Jest rzeczą znamionną, że aktywność właściwa białek frakcji cytosolowej tylko nieznacznie wzrosła w czasie przedłużonej inkorporacji nawet do 13 godz., podczas gdy w innych białkach obserwowano wyraźny wzrost aktywności właściwej. Interpretacja tych spostrzeżeń jest trudna. Brak szczególnego wzrostu radioaktywności białek frakcji cytosolowej w przedziale czasu od 3 do 13 godz. może być traktowany jako optymalne wysycenie wewnątrztkankowej puli wolnych aminokwasów radioaktywnych kwasem glutaminowym.

Wyznaczenie współczynnika metabolizmu białek mózgu jest uwarunkowane w dużym stopniu stężeniem radioaktywnego aminokwasu w ogólnej puli wolnych aminokwasów. Tymczasem istnieje duża heterogenność metaboliczna tejże puli (20). Dlatego okres półtrwania poszczególnych białek mózgowych, tylko w kontekście porównawczym do wszystkich białek, może być uważany za wyraz natężenia metabolizmu pośredniego.

Wyniki naszych doświadczeń w sposób nie budzący wątpliwości potwierdzają nierównomierne natężenie metabolizmu białkowego badanych frakcji subkomórkowych. Wyrazem tego są zmieniające się w czasie aktywności białek poszczególnych frakcji subkomórkowych. Mając na uwadze wszelkie zastrzeżenia dotyczące sposobu wyrażania metabolizmu białkowego, można z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że szybko wzrastająca, a następnie spadająca w czasie aktywność specyficzną określonej frakcji białkowej jest dowodem na jej intensywny metabolizm pośredni. W naszych badaniach jedynie białka frakcji mielinowej odpowiadają tym kryterium, to znaczy, że wykazują maksimum aktywności specyficznej

po 6 godz. Ta frakcja subkomórkowa wykazywała jednak najmniejszy stopień czystości i była wysoce heterogenna.

Obserwowane zatem zjawisko inkorporacji nie może być jednoznacznie interpretowane. Białka pozostałych subfrakcji komórkowych wykazywały stały i równomierny wzrost radioaktywności w ciągu 13 godz. trwania doświadczenia. Szczególnie regularnie wzrastała aktywność specyficzna białek mitochondrialnych, osiągając po 13 godz. wartość przewyższającą aktywność specyficzną białek frakcji jądrowej, cytosolowej i mielinowej. Można więc sądzić, że białka tej frakcji mają bardzo wydłużony okres półtrwania, którego określenie wymagałoby znacznie dłuższego w czasie eksperymentu. Jak powszechnie wiadomo, jednym z etapów biosyntezy białka jest tworzenie się aminoacyl-tRNA i do tego procesu potrzebne są aminokwasy. O ile śledzenie tego etapu w bezkomórkowych układach biosyntezy białka nie nastęrcza trudności, to wykrycie aminoacyl-tRNA tworzącego się *in vivo* jest szczególnie trudne.

Do obecnej chwili znane są w literaturze nieliczne doniesienia na temat izolowania powstającego *in vivo* aminoacyl-tRNA (8, 11, 21).

W naszej pracy przeprowadzono również próby izolowania aminoacyl-tRNA. Ekstrahowane z poszczególnych frakcji subkomórkowych wolne kwasy nukleinowe wykazywały w bezpośrednim pomiarze obecność radioaktywności, co mogło sugerować istnienie związanego z tRNA radioaktywnego aminokwasu. Okazało się jednak, że radioaktywność obecna w surowej frakcji kwasów nukleinowych pochodzi od zanieczyszczenia tej frakcji radioaktywnymi białkami. A zatem w stosowanych metodach postępowania doświadczalnego nie udało się wykazać powstającego niewątpliwie w procesie biosyntezy białka aminoacyl-tRNA. Prawdopodobnie etap tworzenia się i rozkładu aminoacyl-tRNA jest tak krótki, że w warunkach fizjologicznych, bez zastosowania inhibitorów, nie można tego stanu uchwycić.

PIŚMIENNICTWO

1. Austin L., Lowry O. H., Carter J. G.: The Turnover of Protein in Discrete Areas of Rat Brain. *Biochem. J.* **126**, 351—359, 1972.
2. Berl S., Frigyesi T. L.: Comparison of Cerebral Regional Metabolism of ^{14}C Leucine Following Third Ventricle and Intravenous Administration in the Cat. *J. Neurochem.* **16**, 405—415, 1969.
3. Borkowski T., Brzuszkiewicz-Zarnowska H.: Fractionation of Specific Mitochondrial and Cytoplasmic tRNAs Obtained from Calf Brain. *J. Neurochem.* **25**, 341—351, 1975.
4. Borkowski T., Chareziński M.: Activity of Aminoacyl-transfer RNA Synthetases in Brain Mitochondria. *J. Neurochem.* **18**, 851—857, 1971.
5. Borkowski T., Harth S., Maedell R., Mandel P.: Distribution of

- Ribonucleic Acid in Subcellular Fraction of Various Regions of the Central Nervous System of the Rat. *Nature* **192**, 456—457, 1961.
6. Brzuszkiewicz - Żarnowska H., Borkowski T.: Aktywność akceptorowa tRNA mitochondrialnego i cytosolowego mózgu cieląt. *Fol. Soc. Sci. Lub.* **16**, 1974, Biol. 1.
 7. Burton K.: A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.* **62**, 315—318, 1956.
 8. Butler M., Darbre A., Amstein H. R. V.: Amino Acid Attached to Transfer Ribonucleic Acid *in vivo*. *Biochem. J.* **150**, 419—432, 1975.
 9. Chareziński M., Borkowski T.: Studies on Binding of Amino Acids by Mitochondrial and Cytoplasmic tRNA from Calf Brain. *Acta Biochim. Polon.* **20**, 2, 153—158, 1973.
 10. Clark J. B., Nicklas W. J.: The Metabolism of Rat Brain Mitochondrial. Preparation and Characterization. *J. Biol. Chem.* **245**, 4724—4731, 1970.
 11. Dawey P. J., Manchester K. L.: Isolation of Labelled Aminoacyl-tRNA from Muscle Studies of the Entry of Labelled Amino Acids into Acyl Transfer RNA Linkage *in situ* and its Control by Insulin. *Biochim. Biophys. Acta* **182**, 85—97, 1969.
 12. Fricke U.: Tristol: A New Scintillation Cocktail Based on Triton X-100. *Anal. Biochem.* **63**, 555—558, 1975.
 13. Furst S., Lajtha A., Waelsch H.: Amino Acid and Protein Metabolism of the Brain. III. Incorporation of Lysine into Proteins of Various Brain Areas and their Cellular Fractions. *J. Neurochem.* **2**, 216—255, 1958.
 14. Khan A. A., Wilson J. E.: Studies of Turnover in Mammalian Subcellar Particles: Brain, Nuclei, Mitochondria nad Microsomes. *J. Neurochem.* **12**, 81—86, 1966.
 15. Lajtha A., Toth J., Fuimotoi K., Agrawal H. C.: Turnover of Myelin Proteins in Mouse Brain *in vivo*. *Biochem. J.* **164**, 323—329, 1977.
 16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256—275, 1951.
 17. Majbaun W.: Kurs praktyczny z biochemii. PWN, Warszawa 1966 — *Z. physiol. Chem.* **258**, 117—120, 1939.
 18. Peacock A. C., Dingman C. W.: Resolution of Multiple Ribonucleic Acid Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Biochemistry* **6**, 18—2, 1818—1827, 1967.
 19. Rubin J. B., Kelmers A. D., Goldstein G.: The Determination of Transfer Ribonucleic Acid by Aminoacylation. 1. Leucine and Fenyloalanine Transfer Ribonucleic Acid from *E. coli* B¹. *Anal. Biochem.* **20**, 533—544, 1967.
 20. Seta K., Sunsur M., Lajtha A.: The Rat of Incorporation of Amino Acids in to Brain Proteins during Infusion in the Rat. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 472—480, 1973.
 21. Smith D. W. E., McNamara A. L.: The Distribution of Transfer Ribonucleic Acid in Rabbit Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **249**, 1330—1334, 1974.
 22. Stanley P. G., Seese P.: Concerning the Differential Isolation of Nucleic Acid by Phenol. *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 669—673, 1965.
 23. Suoeka N., Chong T. Y.: Fractionation of Nucleic Acid with the Methylated Albumin Column. *J. Mol. Biol.* **4**, 161—172, 1962.

РЕЗЮМЕ

Зрелым кроликам подавались в четвертый мозговой желудочек радиоактивные аминокислоты. После 3, 6 и 13 часов животные были умертвлены, а из ткани мозга были получены субцеллулярные фракции. Из ядерной, миелиновой, митохондриальной, мифосомальной и цитозоловой фракции были получены нуклеиновые кислоты, которые определялись количественно. Радиоактивность определялась в белковой фракции и фракции нуклеиновых кислот. Было констатировано, что инкорпорация радиоактивных аминокислот возрастает вместе со временем. В опытах над исследованными субцеллулярными фракциями было замечено, очень быструю инкорпорацию глютаминовой кислоты леуцина в белки цитозоловой фракции. Путем хроматографического анализа было показано, что метка находящаяся во фракции нуклеиновых кислот происходит от загрязнений радиоактивными белками.

SUMMARY

Radioactive amino acids were injected into the fourth ventriculum of adult rabbits. After 3, 6 and 13 hours the animals were killed and tissue subcellular fractions were prepared from their brains. Nucleic acids were extracted and quantitatively determined from nucleic, myelin, mitochondrial, microsomal and cytoplasmic fractions. The radioactivity was determined in the protein and nucleic acid fractions. It was found out that the incorporation of radioactive amino acids increased in relation to time. In the analysed subcellular fractions a very rapid incorporation of glutamic acid and leucine into cytoplasmic proteins was observed. The chromatographic analysis of the nucleic acids showed that radioactivity in the nucleic acid fractions depended on a radioactive protein contamination. Radioactive aminoacyl-tRNA was not found in the nucleic acid fractions, extracted from different subcellular fractions.