

Maria SZWAJ, Tomasz BORKOWSKI

**Inkorporacja radioaktywnej lizyny do białek rybosomowych
komórek raka wysiękowego Ehrlicha**

Включение радиоактивного лизина в рибосомные белки клеток асцитной опухоли
Эхрлиха

The Incorporation of Radioactive Lysine to Ribosomic Proteins
from Ehrlich Ascites Tumor Cells

Dużą zdolność akumulacji aminokwasów wykazują tkanki embrionalna i nowotworowa. Komórki nowotworowe są metabolicznie bardzo aktywne i w porównaniu z komórkami wątrobowymi wielokrotnie intensywniej zagęszczają aminokwasy (26). Największe nagromadzenie lizyny w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha zachodzi już w pierwszych 3 min. inkubacji z aminokwasem (26).

Szybkość inkorporacji aminokwasów do różnych białek komórkowych (15, 1, 2) może więc zależeć od ich wewnątrzkomórkowego stężenia (3) i od obecności w środowisku inkubacyjnym innych aminokwasów (12, 17).

Badania wielu autorów (10, 25) oraz wyniki uzyskane w naszym laboratorium wskazują również na intensywną inkorporację ^{14}C -lizyny do białek rybosomowych bakterii i innych tkanek (19, 16).

Celem obecnej pracy było przeprowadzenie badań nad inkorporacją ^{14}C -lizyny do białek rybosomowych komórek raka wysiękowego Ehrlicha i wykazanie, że białka te intensywnie inkorporują lizynę do frakcji białek rybosomowych.

MATERIAŁ I METODY

Inkubacja zawiesiny komórek raka wysiękowego Ehrlicha z ^{14}C -lizyną. Inkubację komórek raka wysiękowego Ehrlicha z radioaktywną lizyną prowadzono na zawieszinie komórek w ich własnym osoczu. Na 100 ml płynu wysiękowego dodawano 0,1 mC ^{14}C -lizyny i inkubowano 2 godz. w 37°C z dodatkiem 0,2% glukozy (20).

Preparatyka rybosomów i białek rybosomowych. Metodyka związana z hodowlą komórek raka wysiękowego Ehrlicha, preparatyką supernatan-

tu pomitochondrialnego i rybosomów była oparta na doświadczeniach opublikowanych wcześniej (18). Całkowite białko rybosomowe otrzymywano przez ekstrakcję rybosomów 67% kwasem octowym, zgodnie z metodą podaną przez Wallera i wsp. (23). Po odwirowaniu nierozpuszczalnego RNA supernatant poddawano kilkukrotnej dializie wobec 5% kwasu octowego. Dalszą część doświadczeń dotyczącą strącania białka z dializatu prowadzono zgodnie z wcześniejszymi badaniami własnymi (18, 21).

Fracjonowanie białek rybosomowych. Preparat białka rybosomowego w ilości 10—20 mg rozpuszczano w 1,5—2,0 ml 0,02 M mrówczanu sodowego, *pH* 2,7 i frakcjonowano na kolumnie z CM-celulozy według Williamsa i wsp. (24) z niewielką modyfikacją Gąsiora i wsp. (7).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Elektroforezę prowadzono zgodnie z metodą Panyima i wsp. (13), stosując do rozdzielania 15% żel poliakrylamidowy. Stężenie mocznika w żelu wynosiło 2,5 M. Frakcje białek rybosomowych rozpuszczano w 0,9 N kwasie octowym, dodawano sacharozę (stężenie końcowe 15%) i na poszczególne żele наносzono po 50—100 µg białka. Rozdział prowadzono w ciągu 3,5 godz., w temp. pokojowej, w 0,9 N kwasie octowym, *pH* 2,7 stosując natężenie prądu 2,5 mA na pojedynczy żel. Po ukończonej elektroforezie żele zanurzano w 0,5% czerni amidowej i pozostawiano na 5 godz. Nie związany barwnik wmywano 5% kwasem octowym. Natężenie zabarwienia poszczególnych frakcji białkowych rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym oznaczano densytometrycznie przy użyciu densytometru firmy Kipp i Zone.

Hydroliza białek rybosomowych. Frakcje białek rybosomowych zebrane z kolumny CM-celulozy w ilości 1000 µg hydrolizowano w 6 N kwasie solnym w ciągu 24 godz., w temp. 100°C. Kwas solny odparowywano do odczynu obojętnego, a powstałą mieszaninę aminokwasów po hydrolizie rozpuszczano w 100—200 µl wody destylowanej.

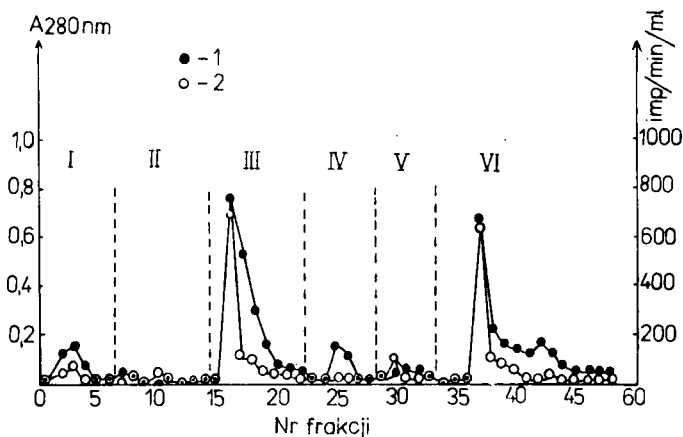
Elektrochromatografia hydrolizatu białek rybosomowych. Do jakościowych badań składu aminokwasowego hydrolizatów białka całkowitego i poszczególnych frakcji zaadaptowano metodę elektrochromatografii Fishla i Segala (6).

Na bibułę Whatman nr 3 наносzono ilościowo mieszaninę aminokwasów otrzymaną z hydrolizy 500 µg białka i rozdzielano w pierwszym kierunku elektroforetycznie w *pH* 2,2 (2,5% kwas mrówkowy i 7,8% kwas octowy). W drugim kierunku prowadzono rozdział chromatograficzny w układzie stosowanym dla rozdzielania aminokwasów zasadowych (aceton—pirydyna—*n*-butanol—woda—dwuetyloamina=15:9:15:10:16). Suche, pozbawione rozpuszczalnika chromatogramy wywoływano 0,2% ninhydriną zawierającą kwas octowy.

Ilościowe oznaczanie aminokwasów zasadowych (lizyny i argininy) oraz aminokwasów kwaśnych (kwasu glutaminowego i asparaginowego) przeprowadzono według metody Fischera i Dorfela (5) przez elucję z bibuły barwnych kompleksów aminokwasów z odczynnikami miedziowymi. Białko ilościowo oznaczano metodą Lowry i wsp. (11). Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym trójkanałowym SL 30 Intertechnique. W celu oznaczenia radioaktywności w poszczególnych próbkach białko наносzono na bibułę filtracyjną Whatman 3 MM i po wysuszeniu mierzono radioaktywność w płynie scyntylicyjnym (100 mg POPOP, 4 mg PPO rozpuszczone w 1000 ml toluenu).

WYNIKI BADAŃ

W czasie dwugodzinnej inkubacji komórek raka wysiękowego Ehrlicha z radioaktywną lizyną zachodzi inkorporacja 14 -lizyny do białek rybosomowych. Obraz rozmieszczenia radioaktywności we frakcjach uzyskanych z rozdziału białka całkowitego na kolumnie CM-celulozy przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Frakcjonowanie białek rybosomowych komórek raka wysiękowego Ehrlicha na kolumnie CM-celulozy. Na kolumnę o wymiarach $0,8 \times 8$ cm nanoszono 10–15 mg białka rozpuszczonego w 0,02 M HCOONa, pH 2,7. Elucję białek z kolumny prowadzono następującymi roztworami: FI — 0,02 M HCOONa, pH 2,7; FII — 0,1 M HCOONa, pH 2,7; FIII — 0,3 M NH_4Cl w 0,02 M HCOONa, pH 2,7; FIV — HCOOH, pH 2,0; FV — HCOOH, pH 1,7; FVI — HCOOH, 20% roztwór. Zbierano 3 ml frakcje; 1 — ekstynkcja w 280 nm, 2 — radioaktywność

Fractionation of ribosomal proteins of Ehrlich Ascites tumor cells on the CM-cellulose column $0,8 \times 8$ cm. 10–15 mg of protein dissolved in 0,02 M sodium formate, pH 2,7 was put in 1,0–1,5 ml on the column. The eluents for particular fractions: FI — 0,02 M sodium formate, pH 2,7; FII — 0,1 M sodium formate, pH 2,7; FIII — 0,3 M ammonium chloride in 0,02 M sodium formate, pH 2,7; FIV — formic acid, pH 2,0; FV — formic acid, pH 1,7; FVI — formic acid, 20% solution. 3 ml fractions were collected: 1 — extinction 280 nm, 2 — radioactivity

Jak wynika z oznaczenia, najwyższą radioaktywność stwierdza się we frakcji III. W pozostałych frakcjach aktywności są mniejsze.

W wyniku oznaczenia stosunku lizyny do argininy oraz stosunku aminokwasów zasadowych do kwaśnych dla badanych frakcji białek rybosomowych stwierdzono, że najwięcej lizyny występuje we frakcji III, IV i V. Również frakcja III, gromadząca średnio 60% białek wyjściowych, zawiera najwięcej aminokwasów zasadowych (tab. 1).

W białku całkowitym i frakcjach białkowych oznaczono radioaktywność wyrażaną w imp/min/mg białka i w imp/min/ μ mol lizyny. We frakcji

Tab. 1. Zawartość aminokwasów zasadowych i kwaśnych w różnych frakcjach białek rybosomowych komórek raka wysiękowego Ehrlicha

The content of basic and acid aminoacids in various fractions of ribosomic proteins of Ehrlich Ascites tumor cells

Frakcje białkowe	$\frac{\text{Lys}}{\text{Arg}}$	$\frac{\text{Lys}+\text{Arg}}{\text{Asp}+\text{Glu}}$
Białko całkowite	1,18	1,12
Frakcja II	—	—
Frakcja III	1,37	1,08
Frakcja IV i V	1,43	0,93
Frakcja VI	1,05	0,85

II, zawierającej średnio około 1% białka wyjściowego, nie stwierdzano radioaktywności, a najwięcej lizyny inkorporuje się do białek frakcji III (tab. 2).

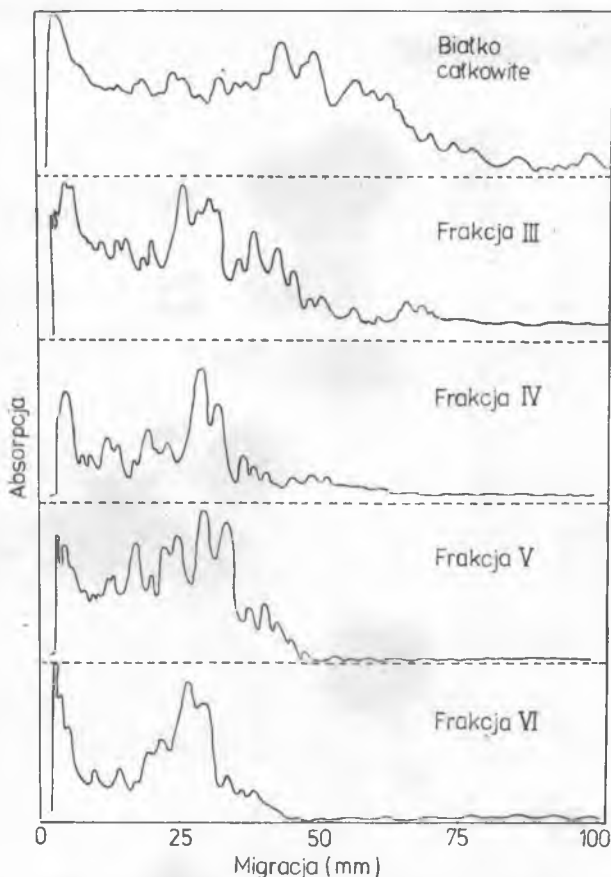
Każdą z badanych frakcji białkowych poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym (ryc. 2). Wszystkie badane białka podczas elektroforezy migrowały do katody. Najdłuższą drogę rozdzielu uzyskano dla białka całkowitego i białek frakcji III. Podczas elektroforezy białko całkowite dzieliło się na 28 oddzielnych pasm, a białko frakcji III na 26. Pozostałe frakcje migrowały wolniej i wykazywały mniejszą liczbę indywidualnych pasm.

Tab. 2. Inkorporacja ^{14}C -Lys do frakcji białek rybosomowych komórek raka wysiękowego Ehrlicha

The incorporation of ^{14}C -Lys to the fraction of ribosomic proteins of Ehrlich Ascites tumor cells

Frakcje białkowe	Imp/min/mg białka	Imp/min/ μmol lizyny
Białko całkowite	2900	7630
Frakcja II	—	—
Frakcja III	2790	5246
Frakcja IV	1320	
Frakcja V	2270	2100
Frakcja VI	1420	1850

Wyniki rozdzielu elektrochromatograficznego hydrolizatu białka całkowitego przedstawia ryc. 3. Na elektrochromatogramie białka całkowitego stwierdza się intensywne plamy aminokwasów zasadowych: lizyny i argininy, a także kwasów glutaminowego i asparaginowego. W hydrolizacie białka całkowitego wykryto śladowe ilości histydyny, które nie są uwidocznione na chromatogramie.

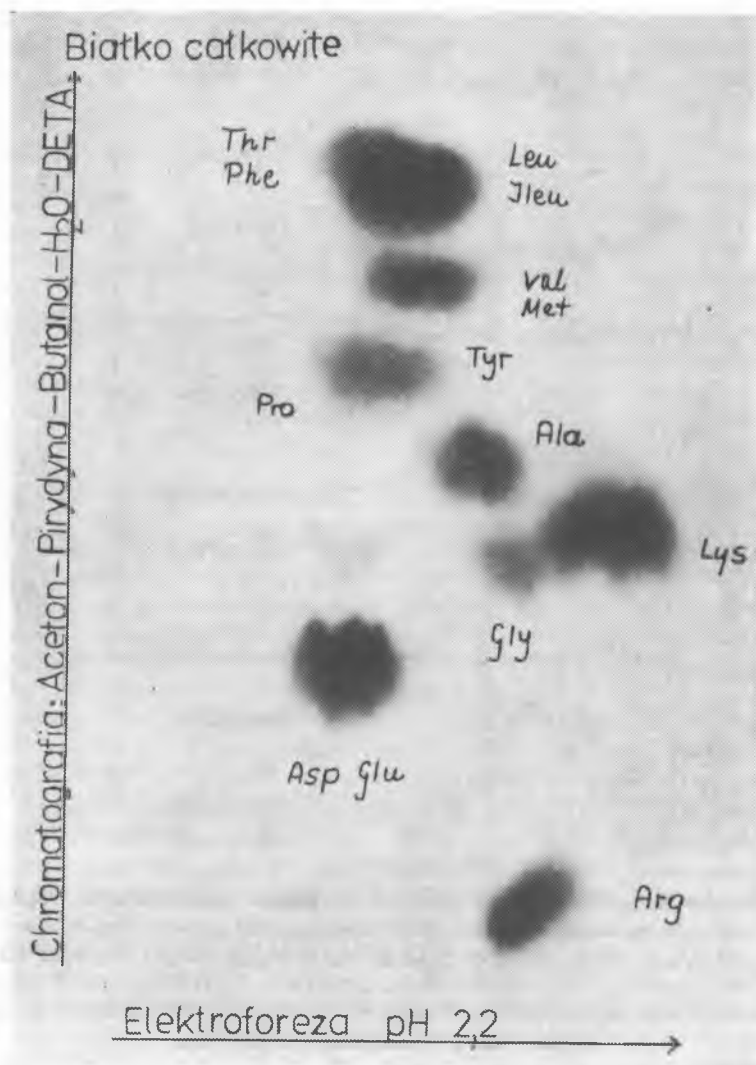


Ryc. 2. Krzywe densytometryczne preparatów białek rybosomowych rozdzielonych elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym. Rozdział prowadzono w 0,9 N kwasie octowym, pH 2,7, w temp. pokojowej 3,5 godz., stosując natężenie prądu 2,5 mA na żel. Natężenie poszczególnych pasm w żelu oznaczano densytometrycznie przy użyciu densytometru firmy Kipp-Zone. Absorbencję mierzono przy użyciu filtra D, przy napięciu 2 mV, 10 mm/min i 50 mm/min

Densitometric curves of ribosomal proteins preparations fractionated electrophorically on polyacrylamide gel. Electrophoresis was conducted at room temp. in 0,9 N acetic acid, pH 2,7, for 3.5 h. at constant current intensity of 2.5 mA/gel. To demonstrate the colour intensity of the individual protein bands densitometric measurements with Kipp-Zone densitometer were made (Filtr D, voltage 2 mV, 10 mm/min and 50 mm/min)

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Dzięki zastosowaniu metody elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym udało się w ostatnich latach zidentyfikować obecność 55 indywidualnych białek w rybosomach komórek bakteryjnych (8). Oznac-



Ryc. 3. Elektrochromatografia hydrolizatu białka rybosomowego całkowitego komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Na bibułę Whatman nr 3 nanoszono hydrolizat białkowy, otrzymany z hydrolizy 500 μ g białka rybosomowego. W pierwszym kierunku prowadzono elektroforezę w pH 2,2 (2,5% HCOOH i 7,8% CH₃COOH), a w drugim kierunku — rozdział chromatograficzny w układzie: aceton—pirydyna—n-butanol—woda—dwuetyloamina (15 : 9 : 15 : 10 : 16). Chromatogramy wywoływano 0,2% roztworem ninhydryny z 2% kwasem octowym

The electrochromatography of the hydrolysate of the total ribosomal proteins of Ehrlich ascites tumor cells. On Whatman's No 3 paper put on hydrolysate after hydrolysis of 500 μ g ribosomal protein. Electrophoresis in the first direction was conducted in formate buffer pH 2.2 (2.5% formic acid and 7.8% acetic acid) and for chromatographic separation the following system was used: acetone : pyridine : n-butanol : water : diethylamine (15 : 9 : 15 : 10 : 16). The chromatograms were stained with 0.2% ninhydrin solutions contained 2% acetic acid

czenie dokładnej liczby białek rybosomowych posiada istotne znaczenie w badaniach nad strukturą i funkcją tych organelli (9).

W naszych badaniach zastosowanie frakcjonowania białek na kolumnie z CM-celulozy i elektroforezy jednokierunkowej podyktowane było koniecznością dokonania porównania z wcześniejszymi badaniami nad fosforylacją białek rybosomowych (22). Okazuje się, że frakcje białek rybosomowych migrujących wolniej w żelu poliakrylamidowym w mniejszym stopniu inkorporowały radioaktywny fosforan (22).

Prowadząc w identycznych warunkach doświadczenia z ^{14}C -lizyną stwierdzono, że białka frakcji III z kolumny CM-celulozy, które w warunkach elektroforezy wędrują najszybciej, wykazują również najwyższy stopień inkorporacji lizyny. A zatem białka zawarte w tej frakcji mogą być traktowane jako metabolicznie aktywne, gdyż inkorporują intensywnie zarówno fosforan, jak i lizynę. Trzeba ponadto stwierdzić, że białka tej frakcji są silnie zasadowe, co może tłumaczyć ich duże zapotrzebowanie na lizynę. Podobnie w doświadczeniach prowadzonych na białkach rybosomowych mózgow króliczych stwierdzono najwyższy stopień inkorporacji radioaktywnej lizyny *in vivo* do frakcji najbardziej zasadowej białek rybosomowych (16).

W porównaniu z wcześniej publikowanymi badaniami w niniejszej pracy zastosowano postępowanie ekstrakcyjne i frakcjonowanie tego typu, że można było uzyskać znacznie lepszą wydajność w otrzymywaniu białek rybosomowych.

Jak wynika z analizy elektroforetycznej, poszczególne frakcje białek rybosomowych rozdzielane na kolumnie z CM-celulozy były nadal heterogenne i stanowiły mieszaninę kilkunastu indywidualnych białek rybosomowych. Do chwili obecnej nie została definitywnie określona liczba indywidualnych białek rybosomowych w komórkach eukariotów i w zależności od sposobów ekstrakcji różni autorzy otrzymują 60—67 białek rybosomowych (14, 4).

Wydaje się, że wstępne frakcjonowanie rybosomowych białek na kolumnie z CM-celulozy może być użyteczne do uzyskania dobrego rozdziału w elektroforezie dwukierunkowej na żelu poliakrylamidowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Busch H., Dorris J. A., Anderson D. C.: Acta Un. Int. Cancer 16, 1125—1131, 1960.
2. Christensen H. N., Riggs T. R.: J. Biol. Chem. 194, 57—68, 1952.
3. Christensen H. N.: Mode of Transport of Aminoacids into Cells. A Symposium of Amino Acids Metabolism. Baltimore 1955, 65.
4. Delauney J., Schapira G.: Biochim. Biophys. Acta 259, 243—246, 1972.
5. Fisher F. G., Dorfel H.: Biochem. Zeitschrift 324, 544—566, 1953.
6. Fishl J., Segal S.: Clin. Chim. Acta 8, 399—405, 1963.

7. Gąsior E., Grankowski N., Turkowska T., Szwaj M.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio C* **23**, 1—10, 1968.
8. Kaltschmidt E., Wittmann H. G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 1276—1282, 1970.
9. Kaltschmidt E., Kohan L., Nomura M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **71**, 446—450, 1974.
10. Korner A.: *Biochem J.* **76**, 28, 1960.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
12. Minowada J.: *Japan J. Cancer Res.* **50**, 417—423, 1955.
13. Panyim S., Chalkley R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337—346, 1969.
14. Rodgers A.: *Biochim. Biophys. Acta* **294**, 292—296, 1974.
15. Samarina O. P.: *Biochimia* **26**, 61—69, 1961.
16. Sanecka-Obacz M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **21**, 709—712, 1973.
17. Szwaj M.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **20**, 61—68, 1965.
18. Szwaj M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **19**, 777—782, 1971.
19. Szwaj M., Saminski E. M., Bresler S. E.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **20**, 457—463, 1972.
20. Szwaj M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **21**, 785—789, 1973.
21. Szwaj M.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **30**, 137—142, 1975.
22. Szwaj M., Borkowski T.: *XIV Zjazd PTBioch., Lublin 3—5 IX 1976*, 34—35.
23. Waller J. P., Hariis J. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 18—23, 1961.
24. Williams R. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 427—440, 1967.
25. Zamecnik P. C., Keller E. B.: *J. Biol. Chem.* **209**, 337—354, 1954.
26. Zbarskij I. B., Pierewoszczykowa K. A.: *Biochimia* **25**, 808—813, 1960.

Otrzymano 20 IX 1978.

РЕЗЮМЕ

Исследовано включение радиоактивного лизина в рибосомные белки клеток асцитной опухоли Эхрлиха. Рибосомные белки получали путем экстракции рибосомов 67% раствором уксусной кислоты. Количество включенного ^{14}C -лизина в белки фракции полученных с КМ-целлюлозы было разное. Из исследованных белковых фракций, фракция III имела наиболее щелочный характер, а также очень интенсивно включала радиоактивный лизин в рибосомные белки. Во всех исследованных белковых фракциях превышал лизин.

SUMMARY

The results of incorporation of the ^{14}C -lysine to ribosomal proteins from Ehrlich Ascites tumor cells were presented. The proteins were extracted with 67% acetic acid. Protein fraction obtained from CM-cellulose column incorporated different amount of lysine. The protein fraction III showed the most basic character as well as the most intensively incorporated ^{14}C -lysine. In all investigated protein fractions lysine was the prevailing aminoacid.