

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr Tomasz Borkowski

Katedra i III Klinika Chorób Wewnętrznych, Wydział Lekarski,

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr Witold Szewczykowski

Krystyna SIKORSKA, Tomasz BORKOWSKI

Inkorporacja ^{32}P do różnych typów mitochondrialnego, jądrowego i cytoplazmatycznego RNA

Включение ^{32}P в разные типы митохондриального, ядерного
и цитоплазматического РНК

Incorporation of ^{32}P into Various Types of Mitochondrial, Nuclear
and Cytoplasmic RNA

Występowanie kwasów nukleinowych w mitochondriach sugeruje możliwość syntezy białek kodowanych przez własny DNA. O ile szereg spostrzeżeń nagromadzono na temat metabolizmu mitochondrialnego DNA (4, 5, 7, 13, 14, 20), to niewiele jego danych odnośnie metabolizmu RNA, a tylko odosobnione prace dotyczą izolacji kwasów nukleinowych z mitochondriów tkanki nerwowej (1, 3, 6, 8). W poprzedniej pracy wykazano (17), że mitochondria tkanki mózgowej obok DNA zawierają s-RNA i r-RNA. Celem obecnej pracy było porównanie szybkości inkorporacji radioaktywnego ^{32}P do różnych typów RNA mitochondrialnego w stosunku do odpowiednich typów RNA jąder komórkowych i frakcji cytoplazmatycznej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych królikach ciężaru około 2 kg. Do jednego doświadczenia używano czterech zwierząt. Króliki wprowadzono w stan narkozy, podając powoli do żyły usznej 0,15 ml na kg wagi ciała preparatu Eunarconu, firmy Riedel. Po uzyskaniu snu narkotycznego, wykonywano dozbiornikowo injekcję ^{32}P w ilości 300 μc (na zwierzę) w formie ortofosforanu sodowego zobojętnionego do pH 7,0. Zwierzęta dekapitowano po upływie 3 lub 16 godzin. Wypreparowane mózgi królicze oczyszczano z opon i spłotów naczyniowych. Mitochondria preparowano według Løvtrup'a (10) metodą różnicowego wirowania w 0,44 M sacharozie w buforze Tris-HCl 0,01 M o pH 7,2 z dodatkiem $5 \cdot 10^{-4}$ M EDTA. Jądra otrzymywano z osadu po pierwszym wirowaniu homogenatu tkanki (2). Supernatant pozostały po osadzeniu jąder i mitochondriów stanowił „frakcję cytoplazmatyczną”, do której dodawano NaCl do stężenia 0,1 M i zadawano 2 objętościami 96% etanolu. Wytrącony osad użyto do ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Ekstrakcję czystych kwasów nukleinowych z mitochondriów, jąder i frakcji cytoplazmatycznej prowadzono w identycznych warunkach (17). Kwasy nukleinowe z poszczególnych frakcji subcelularnych rozdzielano chromatograficznie na kolumnie z metylovaną albuminą, metodą opisaną przez Mandella i Hershey'a (11). Uzyskane po rozdziale chromatograficznym frakcje RNA poddawano hydrolizie wg Schmidta i Tannhäsera (16). Pomiarów aktywności w hydrolizatach RNA dokonywano w liczniku Geiger Müllera z okienkiem mikowym w 1 ml mokrej warstwie z odległości 10 mm. Te same próby wykorzystywano następnie do oznaczeń ilościowych. Ilość RNA określano na podstawie oznaczeń fosforu całkowitego metodą Hursta (9), rybozy, w reakcji orcyndolowej (12) i pomiaru absorpcji światła w UV (19).

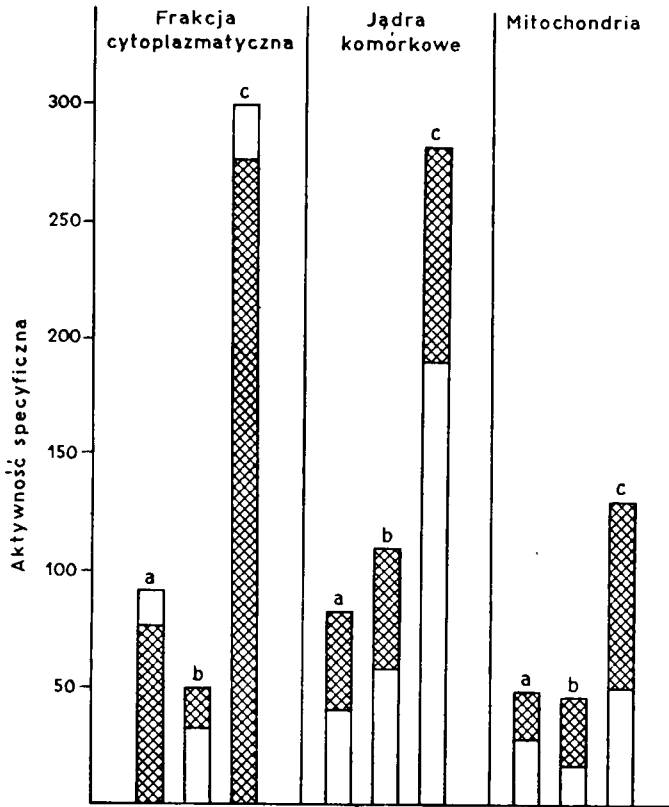
WYNIKI BADAŃ

Stopień inkorporacji ^{32}P do RNA wyrażano za pomocą aktywności specyficznej (imp/min/ μg P-RNA). Aktywność specyficzną określano dla s-RNA, r-RNA oraz frakcji RNA eluującej się z kolumny 1,5 M NaCl w roztworze 0,2 M NH_4OH . Oznaczenia przeprowadzono w trzech frakcjach subcelularnych: mitochondrialnej, jądrowej i cytoplazmatycznej. Średnie wartości obliczone na podstawie kilku doświadczeń zestawiono w tabeli 1 oraz przedstawiono graficznie na ryc. 1

Tab. 1. Aktywności specyficzne poszczególnych typów RNA frakcji mitochondrialnej, jądrowej i cytoplazmatycznej po 3 i 16-godzinnej inkorporacji ^{32}P
Specific activities of individual types of RNA of the mitochondrial, nuclear and cytoplasmic fraction after 3 and 16 hours of the incorporation of ^{32}P

Frakcje subcelularne	Aktywność specyficzna imp./min/ μg P-RNA					
	Okres inkorporacji — 3 h			Okres inkorporacji — 16 h		
	s-RNA	r-RNA	Frakcja RNA eluowana 1,5 M NaCl 0,2 n NH_4OH	s-RNA	r-RNA	Frakcja RNA eluowana 1,5 M NaCl 0,2 n NH_4OH
Mitochondria	28	14	50	49	48	130
Jądra komórkowe	41	56	190	82	110	283
Frakcja cytoplazmatyczna	91	32	300	77	51	276

Jak wynika z przedstawionych danych istnieją duże różnice w aktywnościach właściwych poszczególnych typów RNA odpowiednich frakcji subcelularnych. We frakcji mitochondrialnej aktywność właściwa



Ryc. 1. Aktywności specyficzne trzech typów RNA we frakcji mitochondrialnej, jądrach komórkowych i cytoplazmie po 3 (jasne) i 16 (czarne) godzinnej inkorporacji ^{32}P . Wartości aktywności specyficznej wyrażano w imp./min./ μg P-RNA; a — s-RNA, b — r-RNA, c — frakcja RNA eluowana z kolumny chromatograficznej 1,5 M NaCl w 0,2 n NH_4OH

Specific activities of three types of RNA in the mitochondrial fraction, nuclei and in cytoplasm after 3 (white) and 16 (black) hours of the incorporation of ^{32}P . Values of specific activity were given in imp./min/ μg P-RNA; a — s-RNA, b — r-RNA, c — RNA fraction eluted with 1.5 M NaCl in 0.2 n NH_4OH from the chromatographic column

s-RNA przewyższa aktywność r-RNA tylko w eksperymentach krótkoczasowych. Po 16 godzinnej inkorporacji ^{32}P , aktywności właściwe obydwu typów RNA są sobie równe. Natomiast frakcja RNA elująca się z kolumny chromatograficznej 1,5 M NaCl w roztworze amoniaku posiada aktywność właściwą kilkakrotnie wyższą od pozostałych rodzajów RNA. We frakcji jądrowej obserwuje się w zależności od czasu inkorporacji regularny wzrost aktywności właściwych wszystkich trzech typów RNA. Inaczej kształtują się wartości te we frakcji cytoplazmatycznej.

Tu bowiem aktywność właściwa s-RNA jest już wysoka po 3-godzinnej inkorporacji ^{32}P . We wszystkich badanych frakcjach subcelularnych zasługuje na uwagę frakcja RNA, która eluuje się wysokim stężeniem chlorku sodu, a której aktywność właściwa jest stale najwyższa. Należy również podkreślić, że aktywności właściwe poszczególnych typów RNA frakcji mitochondrialnej są zawsze niższe od RNA z frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki z doświadczeń nad inkorporacją ^{32}P do różnych typów RNA pozwalają sugerować, że synteza kwasów nukleinowych odbywa się również w mitochondriach. Wskazuje na to obecność w mitochondriach frakcji RNA szybkoiętującej się. W naszych warunkach doświadczalnych uzyskiwano ją w rozdziale chromatograficznym drogą elucji 1,5 M NaCl w roztworze amoniaku.

Yoshikawa (21) podaje, że przy stężeniu ponad 1 M NaCl wpływa niejednorodna frakcja, która następnie analizowana w ultrawirówce rozdziela się na dwie podfrakcje. Jedna z nich zawiera typ RNA o składzie zasad podobnym do rybosomalnego RNA, druga zaś posiada skład zasad podobny do DNA. Obydwa typy RNA stanowiły szybkoznakowaną frakcję RNA. Podobnie Scherrer i wsp. (15) donoszą o obecności szybkoznakowanej frakcji RNA o składzie zasad podobnym do r-RNA. Sugerują oni, że ten typ RNA jest prekursorem rybosomalnego RNA. W naszej pracy frakcja RNA eluowana z kolumny 1,5 M NaCl mogłaby zatem odpowiadać frakcji RNA otrzymanej przez Yoshikawę przy tym stężeniu chlorku sodu. Otrzymany skład nukleotydowy jest bowiem różny od s-RNA i r-RNA. Zwraca uwagę niski współczynnik GC/AU tej frakcji w jądrach komórkowych (17).

O szybkości syntezy RNA w mitochondriach świadczy aktywność specyficzna poszczególnych typów RNA. Wykazano, że jest ona niższa od aktywności uzyskanych dla RNA z jądra i frakcji cytoplazmatycznej. Wskazuje na to fakt, że synteza kwasów nukleinowych w mitochondriach przebiega wolniej aniżeli w jądrze komórkowym.

Doświadczenia Suyamy (18) wykazały, że synteza r-RNA może odbywać się w mitochondriach, zaś s-RNA przechodzi prawdopodobnie z cytoplazmy do mitochondriów. Z wyników uzyskanych w naszej pracy trudno wskazać miejsce syntezy obydwu typów RNA. Należy jednak zwrócić uwagę, że zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach, po 3-godzinnej inkorporacji aktywność specyficzna s-RNA przewyższa aktywność r-RNA. Po 16-godzinnej inkorporacji ^{32}P , aktywność właściwa

s-RNA w mitochondriach wzrasta, natomiast w cytoplazmie ma ona tendencje spadkowe. Fakt ten może być poparciem dla sugestii Suyamy, że s-RNA przechodzi z cytoplazmy do mitochondriów.

PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski T.: Kwasy nukleinowe w centralnym układzie nerwowym. PWN, Warszawa 1962, 46.
2. Borkowski T., Harth S., Mardell R., Mandell P.: *Nature* **192**, 456—457, 1961.
3. Borkowski T., Sikorska K., Borkowska I.: *Macromolecules and the Function of the Neuron*. Excerta Medica Foundation. Amsterdam 1968, 187—192.
4. Brewer E. N., De Vries A., Rusch H. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 686—692, 1967.
5. Chevremont M.: *Biochem. J.* **85**, 25P—26P, 1962.
6. Du Buy H. G., Mattern C. F. T., Riley F. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 298—305, 1966.
7. Guttess E., Guttess S.: *Science* **145**, 1057—1058, 1964.
8. Humm D. G., Humm J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**, 114—119, 1966.
9. Hurst R. O.: *Canadian Journal of Biochemistry* **42**, 287—292, 1964.
10. Løvtrup S., Zelander T.: *Experimental Cell Research* **27**, 468—471, 1962.
11. Mandell J., Hershey A. D.: *Anal. Biochem.* **1**, 66—77, 1960.
12. Mejbaum W.: *Z. Physiol. Chem.* **258**, 117—121, 1939.
13. Nass S.: *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 60—67, 1967.
14. Parson P., Simpson M. V.: *Science* **155**, 91—93, 1967.
15. Scherrer K., Lathan H., Darnell J. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**, 240—248, 1963.
16. Schmidt G., Tannhauser S. J.: *J. Biol. Chem.* **161**, 83—89, 1945.
17. Sikorska W. K.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin. Sec. D*, **25**, 351—364, 1970.
18. Suyama Y.: *Biochemistry* **6**, 2828—2839, 1967.
19. Tsanev R., Markov G. G.: *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 442—452, 1960.
20. Wintersberger E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 1—7, 1966.
21. Yoshikawa M., Fukada T., Kawade Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 22—26, 1964.

Otrzymano 7 IV 1970.

РЕЗЮМЕ

Проводились опыты над включением ^{32}P в разные типы РНК митохондрий, клеточных ядер и цитоплазматической фракции мозга кролика. Из опытов следует, что синтез нуклеиновых кислот происходит также в митохондриях, о чем свидетельствует присутствие быстро метящейся фракции РНК. Специфические активности отдельных

типов митохондриального РНК являются значительно ниже по отношению к соответствующим типам РНК остальных клеточных ядер и цитоплазматических фракций. Этот факт может свидетельствовать о более замедленном метаболизме нуклеиновых кислот в митохондриях.

S U M M A R Y

The experiments with the incorporation of ^{32}P into various types of RNA of the mitochondria, nuclei and cytoplasmic fractions of a rabbit brain were carried out. The experiments point out to the fact that the synthesis of nucleic acids takes place also in mitochondria, the presence of rapidly labelled RNA fraction being the proof of it. Specific activities of individual types of the mitochondrial RNA are distinctly lower than the corresponding RNA types in the remaining subcellular fractions. This may be the evidence of the slower metabolism of nucleic acids in mitochondria.