

Alicja PASZKOWSKA

### Inkorporacja aminokwasów do mitochondriów mózgowych *in vitro*

Включение аминокислот в белки митохондрия мозга *in vitro*

The Incorporation of Amino Acids into Brain Mitochondrial Proteins *in vitro*

W naszych dotychczasowych badaniach nad charakterystyką mitochondrialnych kwasów nukleinowych (3, 4), stwierdzono między innymi, że mitochondria mózgowe charakteryzują się dużą zawartością tRNA i aktywnością aminoacylo-tRNA syntetaz (5). Wykazano różnice w ilości izoakceptorowych glutamyl-tRNA między układem cytozolowym a mitochondrialnym mózgu (5). Fakt ten może sugerować różnice w przebiegu cytozolowej i wewnątrzmitochondrialnej biosyntezy białka w tkance mózgowej.

Obecnie istnieje wiele danych wskazujących na różnice między wewnątrzmitochondrialną a cytozolową biosyntezą białka, zarówno w tkankach roślinnych, jak i zwierzęcych (11, 16, 30, 32, 40, 41). Dotyczą one między innymi efektu działania takich inhibitorów, jak chloramfenikol i cykloheksimid (2, 10, 16, 23, 25, 26, 31, 32, 33, 37). Natomiast wyniki dotyczące działania innych inhibitorów, otrzymane w pracach różnych autorów są niejednakowe (13, 14, 17, 26, 30, 66).

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad efektem działania kilku inhibitorów na inkorporację aminokwasów do białek mitochondrialnych mózgu wołu w warunkach *in vitro*.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia prowadzono na świeżych mózgach wołowych. Do badań używano głównie korę mózgową, którą oddzielano od pozostałych elementów anatomicznych. Sporządzano 10% homogenat kory mózgowej w roztworze 0,3 M mannitolu w buforze 0,01 M Tris-HCl o pH 7,2 z dodatkiem 0,5 mM wersenianu dwusodowego i 4 µg/ml PVS. Z homogenatu mózgu izolowano mitochondria metodą Clarka i Nicklasa (12). Wszystkie czynności wykonywano w temp. 0—4°C, z użyciem szkła i odczynników sterylnych.

### Inkubacja mitochondriów z radioaktywnym aminokwasem

Podstawowa mieszanina inkubacyjna zawierała: 0,3 M mannitol, bufor 20 mM Tris-HCl o pH 7,4, 10 mM octan magnezu, 40 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 mM  $K_2HPO_4$ , 10 mM bursztynian potasu, 6 mM 2-merkaptoetanol, 2 mM ADP, 1-1,5 mg białka mitochondrialnego oraz 0,5  $\mu$ C/ml radioaktywnego aminokwasu. Ponadto w skład mieszaniny inkubacyjnej wchodziła mieszanina wszystkich aminokwasów (z wyjątkiem znakowanego), o składzie podanym przez Roodyna (40). Objętość końcowa mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 1 ml. Czas inkubacji 20 min. w temp. 37°C.

Inkubację prowadzono w obecności różnych inhibitorów. Stosowano następujące stężenia: cykloheksimid — 100  $\mu$ g/ml, emetyna — 500  $\mu$ g/ml, puromycyna — 100  $\mu$ g/ml, bromek etydyny — 10  $\mu$ g/ml, chloramfenikol — 100  $\mu$ g/ml. Próba kontrolna nie zawierała inhibitora. Czas inkubacji 20 min. w temp. 37°C.

Po inkubacji mieszaninę sprowadzano do temp. 0°C i białko precypitowano równą objętością 10% TCA z dodatkiem 10 mM nieznakowanego aminokwasu. Po 15 min. białka oddzielano na drodze wirowania i przemywano kilkakrotnie zimnym 5% TCA, zgodnie z metodami wcześniej opisanymi (32, 37).

### Sonikacja mitochondriów

Homogenną zawiesinę mitochondriów w podstawowej mieszaninie inkubacyjnej, ale nie zawierającej w swoim składzie bursztynianu potasu i ADP, dezintegrowano w sonikatorze produkcji MSE, przy maksymalnej amplitudzie w czasie 30 sek. w temp. 0°C. Do układu inkubacyjnego zawierającego mitochondria dezintegrowane stosowano dodatek 2 mM ATP zamiast bursztynianu i ADP.

### Oznaczanie radioaktywności w białku mitochondrialnym

Wysuszony osad białka rozpuszczano w 1 ml 1 N NaOH z dodatkiem 0,1 ml 10% Tritonu X-100 i 10 mM nieznakowanego aminokwasu i pozostawiano na czas 1 godz. w temp. 0°C. Następnie białko precypitowano podwójną objętością 10% TCA i pozostawiano na 15 min. w temp. 0°C. Osad ponownie rozpuszczano w 1 ml 1 N NaOH i oznaczano radioaktywność metodą Braya (8) w liczniku scyntylicyjnym firmy Intertechnique model SL-200.

### Odczynniki

Do badań używano następujących odczynników specjalnych: aminokwasy, bromek etydyny (*ethidium bromide*) — Calbiochem AG, Szwajcaria, cykloheksimid, glikol etylu — Fluka AG, Buchs SG, Szwajcaria; emetyna — Merck, RFN; puromycyna, naftalen, p-dioxan — Serva, RFN; poliwinylu siarczan (PVS) — Sigma Chemical Co., USA; ficoll — Uppsala, Szwecja; PPO (2,5-diphenyloxazol) — Rennal Węgry; POPOP (1,4,di-2(5-fenylooxazolyl)benzene) — Intertechnique, Francja;  $^{14}$ C kwas glutaminowy (aktyw. specyf. 175  $\mu$ C/ $\mu$ mol),  $^{14}$ C leucyna (aktyw. specyf. 75  $\mu$ C/ $\mu$ mol),  $^{14}$ C walina (aktyw. specyf. 125  $\mu$ C/ $\mu$ mol) — UVVVP, Praga, Czechosłowacja.

## WYNIKI BADAŃ

Wstępne doświadczenia miały na celu opracowanie optymalnych warunków inkubacji *in vitro* mitochondriów, pozwalających śledzić proces biosyntezy białka. Średnie wyniki kilku doświadczeń zebrano w tab. 1.

Jak wynika z przedstawionej tabeli, zamiany — bursztynianu na  $\alpha$ -ketoglutaran oraz stężenia jonów sodu i potasu — powodowały wyraźne obniżenie inkorporacji znakowanego węglem kwasu glutaminowego. Nie obserwowano zmian inkorporacji w zależności od osmolarności mieszaniny inkubacyjnej, pochodzącej od mannitolu czy od sacharozy. Optymalne warunki wbudowywania znakowanego kwasu glutaminowego wiążą się z obecnością bursztynianu i odpowiedniego stosunku jonów  $K^+/Na^+$ .

Ponieważ kwas glutaminowy w tak złożonym układzie, jakim są mitochondria, może być wykorzystany w innych przemianach, porównywano inkorporację kwasu glutaminowego z inkorporacją dwóch alifatycznych aminokwasów: leucyny i waliny (tab. 2).

Tab. 1. Wpływ składu mieszaniny inkubacyjnej na inkorporację  $^{14}C$  kwasu glutaminowego do białek mitochondrialnych mózgu wołu  
Effect of the incubation medium composition on the incorporation of  $^{14}C$  glutamic acid into beef-brain mitochondrial proteins

Układ inkubacyjny	Liczba doświadczeń	Aktywność w imp./min./mg białka (średnia)	pmole/mg białka (średnia)	Inkorporacja %
Mieszanina inkubacyjna z bursztynianu	11	780	4,9	100
— bursztynian + $\alpha$ -ketoglutaran	6	340	2,1	42,9
— 100 mM $K^+$ , 40 mM $Na^+$ + 100 mM $Na^+$ , 40 mM $K^+$	4	386	2,4	49,0
— sacharoza + mannitol	6	788	4,9	100

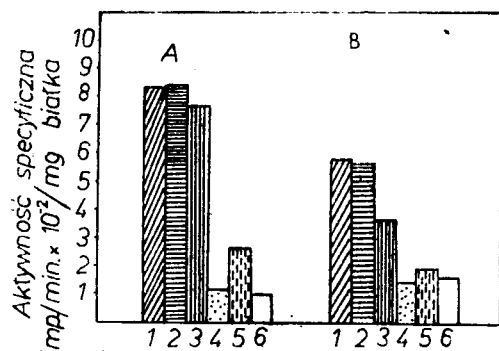
Tab. 2. Inkorporacja radioaktywnych aminokwasów do białek mitochondrialnych mózgu wołu  
The incorporation of isotopically labelled amino acids into beef-brain mitochondrial proteins

Badany aminokwas	Liczba doświadczeń	Aktywność w imp./min./mg białka	pmole/mg białka	pmole/mg białka (średnia)
$^{14}C$ kwas glutaminowy	11	570—888	4,2—5,6	4,9
$^{14}C$ leucyna	6	1370—1964	10,9—15,6	13,3
$^3H$ leucyna	4	1000—1370	8,9—12,2	10,6
$^{14}C$ walina	3	370—528	2,6—3,8	3,2

Okazało się, że leucyna inkorporuje się 2-, 3-krotnie intensywniej aniżeli kwas glutaminowy. Walina natomiast podlegała słabszej inkorporacji aniżeli kwas glutaminowy.

Zasadniczym celem badań było ustalenie, które ze znanych inhibitorów hamują wewnątrzmitochondrialną biosyntezę białka w badanym układzie. Mając na celu uwzględnienie penetracji inhibitorów do wnętrza mitochondriów, doświadczenia prowadzono na nienaruszonych mitochondriach oraz dezintegrowanych ultradźwiękami.

Otrzymane wyniki, dotyczące wpływu stosowanych inhibitorów na inkorporację kwasu glutaminowego do białek mitochondrialnych mózgu wołu, przedstawiono na ryc. 1. Okazuje się, że występują pewne róż-



Ryc. 1. Wpływ inhibitorów na inkorporację  $^{14}\text{C}$  kwasu glutaminowego do białek mitochondrialnych mózgu wołu; A — mitochondria nienaruszone, B — mitochondria dezintegrowane ultradźwiękami; 1 — mitochondria bez inhibitora (kontrola), 2 — mitochondria (m.)+cykloheksimid, 3 — m.+emetyna, 4 — m.+puromycyna, 5 — m.+chloramfenikol, 6 — m.+bromek etydyny  
Effect of the protein synthesis inhibitors on the incorporation of  $^{14}\text{C}$  glutamic acid into beef-brain mitochondrial proteins; A — intact mitochondria, B — sonicated mitochondria; 1 — mitochondria without inhibitors (control), 2 — mitochondria (m.)+cycloheximide, 3 — m.+emetine, 4 — m.+puromycin, 5 — m.+chloramphenicol, 6 — m.+ethidium bromide

nice w hamowaniu procesu w obu typach mitochondriów. W układzie mitochondriów dezintegrowanych ultradźwiękami obserwowano obniżenie inkorporacji kwasu glutaminowego o 30%. Cykloheksimid, typowy inhibitor cytoplazmatycznego procesu biosyntezy białka, nie wywierał wpływu hamującego. Emetyna w niewielkim stopniu, bo tylko o 11,8%, hamowała biosyntezę w mitochondriach nienaruszonych. Natomiast wywierała znaczny wpływ hamujący w układzie mitochondriów dezintegrowanych i obniżała inkorporację o 42%. Puromycyna, chloramfenikol i bromek etydyny powodowały znaczne zahamowanie wewnątrzmitochondrialnej biosyntezy białka w obu typach preparatów mitochondrialnych. Chloramfenikol nie wykazywał większych różnic w hamowaniu procesu w obu omawianych układach. Puromycyna i bromek etydyny okazały

się bardziej efektywne w układzie mitochondriów nienaruszonych. Przebadano również wpływ inhibitorów na wbudowywanie  $^3\text{H}$  leucyny i  $^{14}\text{C}$  waliny. Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 3.

Podobnie jak w doświadczeniach z kwasem glutaminowym, cykloheksimid nie miał wpływu hamującego. Emetyna niewiele obniżała inkorporację  $^3\text{H}$  leucyny o 11,8%, a  $^{14}\text{C}$  waliny o 18,7%. Pozostałe inhibitory działały analogicznie jak w obecności kwasu glutaminowego.

Tab. 3. Wpływ inhibitorów na inkorporację kwasu glutaminowego, leucyny i waliny do białek mitochondrialnych mózgu wołu  
Effect of the protein synthesis inhibitors on the incorporation of glutamic acid, leucine and valine into beef-brain mitochondrial proteins

Układ inkubacyjny	$^{14}\text{C}$ kwas glutaminowy		$^3\text{H}$ leucyna		$^{14}\text{C}$ walina	
	pmole/mg białka	inkorporacja %	pmole/mg białka	inkorporacja %	pmole/mg białka	inkorporacja %
Mieszanka inkubacyjna (podstawowa)	5,1	100	10,6	100	3,2	100
+cykloheksimid	5,2	102	10,7	101	3,2	100
+emetyna	4,5	88,2	9,4	88,7	2,6	81,3
+puromycyna	0,7	13,7	2,9	27,4	0,5	15,6
+chloramfenikol	1,8	35,3	4,3	45,3	1,7	53,1
+bromek ctydyny	0,6	11,8	1,8	16,9	0,5	15,6

#### DYSKUSJA

W niniejszych badaniach mitochondria otrzymane z mózgu wołu wykazywały cechy układu metabolicznie aktywnego, o czym świadczyły kontrola oddechowa i współczynnik P/O. Posiadały również zdolność wbudowywania  $^{14}\text{C}$  kwasu glutaminowego do białek. Okazało się, że dla uzyskania inkorporacji kwasu glutaminowego niezbędny jest dodatek do mieszaniny inkubacyjnej bursztynianu. W obecności  $\alpha$ -ketoglutaranu obserwowano wyraźne zahamowanie tego procesu. Fakt ten stoi w sprzeczności z wynikami innych autorów (9, 36), którzy najlepsze wyniki inkorporacji uzyskali wobec  $\alpha$ -ketoglutaranu. Przyczynę tych rozbieżności można upatrywać w tym, że kwas glutaminowy może w obecności  $\alpha$ -ketoglutaranu podlegać procesowi transaminacji. Proces ten może interferować w wykorzystaniu kwasu glutaminowego do biosyntezy białka. Natomiast w pracach wyżej cytowanych autorów używano aminokwasów, które, być może, w mniejszym stopniu podlegały procesowi transaminacji.

Istotny wpływ na wielkość inkorporacji  $^{14}\text{C}$  kwasu glutaminowego miała obecność kationów jednowartościowych. Nasze obserwacje, dotyczące stymulującego działania jonów potasu, są zgodne z badaniami innych autorów (9, 24, 36).

Mając na uwadze szerokie możliwości metaboliczne kwasu glutaminowego, starano się uzyskać pewne informacje co do niskiej inkorporacji tego aminokwasu do białek mitochondrialnych, przez porównanie inkorporacji innych aminokwasów. Okazało się, że walina inkorporowała się słabiej niż kwas glutaminowy, natomiast leucyna była wbudowana intensywniej. Średnia wartość inkorporacji leucyny wynosiła 10—13 pmoli na 1 mg białka i była to wartość zgodna z wynikami innych autorów (9, 20, 36). Fakt ten może być dodatkowym argumentem potwierdzającym dobór właściwego środowiska inkubacji dla badania wewnątrzmitochondrialnej biosyntezy białka.

Jak wynika z przeglądu badań innych autorów, istnieją wyraźne różnice między poglądami na temat inhibitorowego działania chloramfenikolu i cykloheksimidu na wewnątrzmitochondrialną biosyntezę białka (1, 15, 20, 22, 29). Nasze badania wykazały, że ta biosynteza w mózgu jest wrażliwa na działanie chloramfenikolu i nie hamuje jej cykloheksimid. Kontrowersyjne wyniki, otrzymane przez różnych autorów, są spowodowane niejednakowym stopniem czystości używanych do doświadczeń preparatów mitochondrialnych (7, 22, 24). Jeżeli mitochondria zanieczyszcza układ cytozolowy, wtedy biosynteza białka hamowana jest cykloheksimidem, a nie chloramfenikolem.

Zastosowany kolejny inhibitor biosyntezy białka, emetyna, wykazywał działanie hamujące, zależne od penetracji do wnętrza mitochondriów. Ograniczające działanie błony mitochondrialnej na efekt emetyny w procesie biosyntezy białka wykazali też inni autorzy w badaniach przeprowadzonych na mitochondriach wątroby (17, 26). Mimo stosowania wysokich stężeń emetyny, efekt hamowania biosyntezy białka w mitochondriach mózgowych był niższy aniżeli otrzymany przez innych autorów w mitochondriach wątrobowych (10, 17, 26) czy w mitochondriach drożdżowych (26).

W doświadczeniach z inhibitorem transkrypcji — bromkiem etydyny, hamowanie wewnątrzmitochondrialnej biosyntezy białka występowało w znacznym stopniu. W preparatach dezintegrowanych mitochondriów było wyraźne, lecz mniejsze niż w mitochondriach nienaruszonych. Według Kisselewa i wsp. (29) mitochondria wątroby szczura dezintegrowane Tritonem X-100 nie wykazywały obniżonej inkorporacji znakowanego aminokwasu w porównaniu z mitochondriami nienaruszonymi. Okazuje się, że inhibitor ten hamuje nie tylko mitochondrialną transkrypcję (35, 42), lecz również i proces translacji (21), może też interferować

z tRNA (34). Badania Rogersa i Küntzela (39) oraz Gatti i wsp. (19) wykazały możliwość wiązania inhibitora ze strukturami zlokalizowanymi w błonie mitochondrialnej. Obniżenie działania inhibitorowego bromku etydyny w układzie mitochondriów dezintegrowanych ultradźwiękami stanowiły również argument dla koncepcji proponowanej przez wyżej wymienionych autorów.

Działanie puromycyny na inkorporację aminokwasów do białek mitochondrialnych zostało jednocześnie ustalone (28, 30, 36, 37, 47) i wykazano w ten sposób istnienie analogii między cytozolową a mitochondrialną biosyntezą białka (14, 16, 27, 38). W naszych doświadczeniach uzyskano zahamowanie inkorporacji wszystkich trzech badanych aminokwasów do białek mitochondrialnych mózgu wołu w obecności puromycyny. Poczynione w niniejszej pracy obserwacje posłużą do dalszych badań nad biosyntezą białka w mitochondriach synaptycznych i zlokalizowanych w perikarionie.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bachelard H. S.: *Biochem. J.* **100**, 131—137, 1966.
2. Beattie D. S., Basford R. E., Koritz S. P.: *Biochemistry* **6**, 3099—3106, 1967.
3. Borkowski T., Borkowska I., Sikorska K., Kulesza S.: *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.* **15**, 511—516, 1967.
4. Borkowski T.: *Acta Neurobiol. Exptl.* **31**, 389—398, 1971.
5. Borkowski T., Charęziński S.: *J. Neurochem.* **18**, 851—857, 1971.
6. Borkowski T., Brzuszkiewicz-Zarnowska H.: *J. Neurochem.* **25**, 641—644, 1975.
7. Bosmann H. B., Hemsworth B. A.: *J. Biol. Chem.* **245**, 365—371, 1970.
8. Bray G. A.: *Anal. Biochem.* **1**, 279—285, 1960.
9. Campbell M. K., Mahler H. R., Moore W. J., Tewari S.: *Biochemistry Easton* **5**, 1174—1184, 1966.
10. Chakrabarti S., Dube D. K., Roy S. C.: *Biochem. J.* **128**, 461—462, 1972.
11. Chatterjee S. K., Das H. K., Roy S. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 349—354, 1966.
12. Clark J. B., Nicklas W. J.: *J. Biol. Chem.* **245**, 4724—4731, 1970.
13. Constantino P., Attardi G.: *J. Biol. Chem.* **252**, 1702—1711, 1977.
14. Coote J. L., Work T. S.: *Eur. J. Biochem.* **23**, 564—574, 1971.
15. Cunningham R. D., Bridgers W. P.: *Miochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 99—105, 1970.
16. Das H. K., Chatterjee S. K., Roy S. C.: *J. Biol. Chem.* **239**, 1126—1135, 1964.
17. Gadaleta M. N., Greco M., Del Preto G., Saccone C.: *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 238—245, 1976.
18. Gaitskhoki V. S., Kisselev O. I., Klimov N. A.: *Moll. Cell Biochem.* **14**, 101—108, 1977.

19. Gatti C., Houssier C., Fredericq E.: *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 65—75, 1977.
20. Gordon M. W., Deanin G. G.: *J. Biol. Chem.* **243**, 4222—4226, 1968.
21. Grivell L. A., Metz V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 125—131, 1973.
22. Haldar D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 899—904, 1971.
23. Hawley E. S., Greenawall J. W.: *J. Biol. Chem.* **245**, 3574—3583, 1970.
24. Hernandez A. G., Burdett I., Work T. S.: *Biochem. J.* **124**, 327—336, 1971.
25. Ibrahim N. G., Stuchell R. N., Beattie D. S.: *Eur. J. Biochem.* **36**, 519—527, 1973.
26. Ibrahim N. G., Burke J. P., Beattie D. S.: *J. Biol. Chem.* **249**, 6806—6811, 1974.
27. Ibrahim N. G., Beattie D. S.: *J. Biol. Chem.* **251**, 108—115, 1976.
28. Kalf G. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 350—359, 1963.
29. Kisselev O. I., Gaitshoki W. S., Neifakh S. K.: *Mol. Cell. Biochem.* **14**, 91—96, 1977.
30. Kroon A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 391—402, 1963.
31. Kroon A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 275—284, 1965.
32. Lamb A. J., Clark-Walker G. D., Linnane A. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 415—427, 1968.
33. Loeb J. W., Hubby B. G.: *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 745—748, 1968.
34. Lurgin P., Buchet-Mahieu J.: *FEBS Lett.* **12**, 244—248, 1971.
35. Mahler R. G., Perlman P. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 115—129, 1972.
36. Morgan I. G., Austin L.: *J. Neurochem.* **15**, 41—51, 1968.
37. Mockel J. J., Beattie D. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 301—310, 1975.
38. Ojala D., Attardi G.: *J. Moll. Biol.* **65**, 273—289, 1972.
39. Rogers P., Küntzel H.: *Mol. Cell. Biochem.* **14**, 87—89, 1977.
40. Roodyn D. S., Reis P. J., Work T. S.: *Biochem. J.* **80**, 9—21, 1961.
41. Truman D. E. S., Korner A.: *Biochem. J.* **83**, 588—596, 1962.
42. Zyiber E., Vesco C., Penman S.: *J. Moll. Biol.* **44**, 195—204, 1969.

Otrzymano: 5 VII 1979.

## РЕЗЮМЕ

Включение  $^{14}\text{C}$ -глутаминовой кислоты в белки митохондрии изолированных из коры мозга вола, имеющих в своем составе янтарную кислоту и  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  в отношении 5:2, происходит в количестве 5 пмоли на 1 мг белка.

Лизин включается в 2—3 раза интенсивнее в белки митохондрии мозга, чем глутаминовая кислота. Наиболее слабо включается в эти белки валин.

Циклогексимид не проявляет никакого торможения на внутримитохондриальный биосинтез белка. В опытах с эметином наблюдается большой эффект торможения в препаратах митохондрии дезинтегрированных ультразвуками. Хлорамфеникол снижает включение аминокислот в 60—70% независимо от степени повреждения морфологической структуры митохондрии. Пуромидин и бромид этидина действует более интенсивно и снижает в 80—90% внутримитохондриальный биосинтез белка.



## SUMMARY

Isotopically labelled glutamic acid, leucine and valine were incorporated into beef-brain mitochondrial proteins in a system containing succinate and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio = 5/2.

The highest extent of incorporation was found for leucine, for glutamic acid the extent of incorporation was 2—3 times lower, for valine it was the lowest.

The incorporation was diminished by some protein synthesis inhibitors: by puromycin and ethidium bromide in 80—90%, chloramphenicol in 60—70%, emetine in 10—20%, cycloheximide was without effect.

