

Ewa KUREK

Defosforylacja fosfobiałek w obecności frakcji komórkowych*Escherichia coli*

Дефосфорилирование фосфопротеидов в присутствии клеточных фракций

*Escherichia coli*Dephosphorylation of Phosphoproteins in the Presence of *Escherichia coli*
Cell Fractions

Fosfobiałka są klasą kwaśnych białek zawierających fosforan związany estrowo z seryną lub treoniną łańcucha peptydowego, a w pewnych wypadkach — amidowo poprzez N-3 histydyny (10). Wiele danych uzyskanych w doświadczeniach na materiale zwierzęcym wskazuje na udział tych połączeń w tak ważnych procesach, jak aktywacja materiału genetycznego, oksydacyjna fosforylacja, aktywny transport. Pewna grupa fosfobiałek posiada aktywność enzymatyczną — fosfatazy, fosforylasy, transforylasy (8). W komórkach bakteryjnych stwierdzono także obecność fosfobiałek. Na aktywną rolę tych połączeń w komórkach mikroorganizmów może wskazywać fakt zmniejszania się ilości fosforu fosfobiałkowego w komórkach wraz z przejściem ich z logarytmicznej fazy wzrostu do stacjonarnej (13). U zwierząt defosorylację fosfobiałek przeprowadza fosfataza fosfobiałkowa, natomiast, jak przebiega ten proces u mikroorganizmów, nie zostało wyjaśnione (6). Celem tej pracy jest określenie możliwości enzymatycznego rozkładu fosfobiałek w komórce *E. coli*.

MATERIAŁY I METODY

Hodowla bakteryjna. Szczep *E. coli* K-12 Hfr 82 met⁻ namnażano na podłożu płynnym zawierającym w 1000 ml: 7,0 g K₂HPO₄, 3,0 g KH₂PO₄, 0,5 g cytrynianu sodu, 0,1 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 4,0 g glukozy, 20 mg L-metioniny. pH doprowadzono 1 N NaOH do 7,2. Hodowlę przeprowadzono w 37° z napowietrzaniem. Namnażanie przerywano w środku fazy logarytmicznego wzrostu. Masę bakteryjną zbierano przez wirowanie i przemycano dwukrotnie buforem 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2.

Frakcjonowanie materiału komórkowego. Sferoplasty otrzymane metodą lizozymową wg Flessela i współaut. (3) zawieszano w wodzie redestylowanej i po ich pęknięciu oddzielano membrany cytoplazmatyczne od zawartości wnętrza komórki przez wirowanie przy 20 000×g przez 15 min. W celu rozpuszczenia błon cytoplazmatycznych stosowano SDS wg metod Bishopa i współaut. (1). SDS usuwano przez sączenie na ko-

Tab. 1. Skład mieszanin inkubacyjnych użytych do badań nad enzymatycznym rozkładem fosfobiałek i P-seryny
Composition of incubation mixtures used to assay enzymatic hydrolysis of phosphoproteins and P-serine

Substrat Substrate	Składniki mieszaniny inkubacyjnej Components of incubation mixture	Skład mieszaniny inkubacyjnej Composition of incubation mixture				
		t = 60 min		t = 0 min.		
P-seryna P-serine	fosfoseryna phosphoserine	+	+	+	+	+
	Mg ⁺⁺	+	+	+	+	+
	kw. askorbinowy ascorbic acid	+	+	+	+	+
	frakcja enzymatyczna enzymatic fraction	+	+	+	+	+
	bufor boranowy borate buffer 0,05 M	+	+	+	+	+
Kazeina albo fosfobiałka z <i>E. coli</i> Casein or phosphoproteins from <i>E. coli</i>	kazeina casein	+	+	+	+	+
	fosfobiałka <i>E. coli</i> phosphoproteins <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+
	Mg ⁺⁺	+	+	+	+	+
	kw. askorbinowy ascorbic acid	+	+	+	+	+
	frakcja enzymatyczna enzymatic fraction	+	+	+	+	+
	bufor bursztynianowy succinic buffer 0,05 M	+	+	+	+	+
	0,90 μM P	+	+	+	+	+
	0,10 μM P	+	+	+	+	+
	5,00 μM	+	+	+	+	+
	0,50 μM	+	+	+	+	+
kontrola --- controls						

X — objętość mieszaniny inkubacyjnej uzupełniono buforem do 3,2 ml o pH: 5,6 w przypadku rozkładu kazeiny, 8,0 w przypadku rozkładu P-seryny, 6,0 w przypadku rozkładu fosfobiałek *E. coli*.

X — volume of incubation mixture was supplemented with buffer to 3.2 ml pH of buffer: 5.6 for casein, 8.0 for P-serine, 6.0 for phosphoproteins from *E. coli*.

lumnie z Sephadex G-25. Rybosomy uzyskiwano zgodnie z metodą opisaną przez Kurek i współaut. (9).

Izolacja rozpuszczalnego preparatu fosfobiałkowego *E. coli*. Preparat ten przygotowywano zgodnie z metodą poprzednio opisaną (7).

Badanie fosforylacji. Fosforylację rybosomów i oznaczenie radioaktywności przeprowadzono wg procedury wcześniej przedstawionej (9).

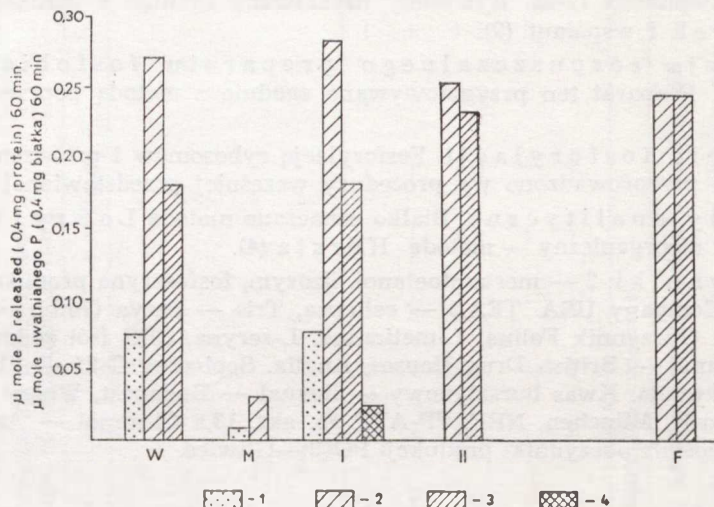
Metody analityczne. Białko oznaczano metodą Lowry i współaut. (11). Fosfor nieorganiczny — metodą Hürsta (4).

Odczynniki: 2 — merkaptoetanol, lizozym, fosfoseryna produkcji Sigma Chemical Company USA. TEAE — celuloza, Tris — Serva GmbH — Heidelberg, NRF. Odczynnik Folina, L-metionina, L-seryna, SDS (sól sodowa dodecylo-siarczanu) — British Drug Houses, Anglia. Sephadex G-25 — Pharmacia, Uppsala, Szwecja. Kwas bursztynowy — Reanal — Budapeszt, Węgry. Kazeina — Schuchardt, München, NRF. ^{32}P -ATP sp. akt. 13,8 Ci/mmol — Amersham, Anglia. Pozostałe odczynniki produkcji POCh—Gliwice.

WYNIKI

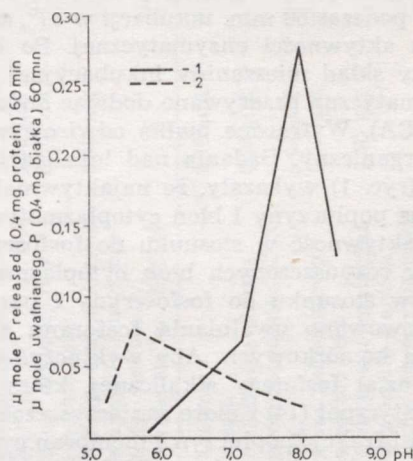
W pierwszym etapie badań jako substratów użyto: fosfoseryny, kazeiny (wzorcowego fosfobiałka o określonym składzie) oraz preparatu rozpuszczalnego fosfobiałka z *E. coli*. Źródłem aktywności enzymatycznej były następujące frakcje komórkowe: rozpuszczone membrany cytoplazmatyczne, zawartość wnętrza komórki oraz frakcje białkowe odmywające się od membran cytoplazmatycznych 0,9% NaCl.

Aktywność enzymatyczną określano na podstawie ilości fosforanu nieorganicznego uwolnionego podczas 60 min. inkubacji w 37°, substratu z frakcją białkową będącą źródłem aktywności enzymatycznej. Po licznych próbach ustalono najefektywniejszy skład mieszaniny inkubacyjnej dla każdego substratu (tab. 1). Reakcję enzymatyczną przerywano dodając do próbek 1 ml 40% kwasu tróchlorooctowego (TCA). Wytrącone białko odwirowywano. W supernatancie oznaczano fosfor nieorganiczny. Badania nad lokalizacją aktywności enzymatycznych w komórce (ryc. 1) wykazały, że najaktywniejsze były frakcje wnętrza komórkowego oraz popłuczyny I błon cytoplazmatycznych. Obie te frakcje wykazywały wysoką aktywność w stosunku do fosfoseryny i znacznie niższą do kazeiny. Preparaty rozpuszczonych błon cytoplazmatycznych wykazywały niewielką aktywność w stosunku do fosfoseryny i bardzo niską w stosunku do kazeiny. Nie obserwowano uwalniania fosforanu z kazeiny w obecności popłuczyn II membran komórkowych. Aby wykluczyć w obserwowanym rozkładzie fosfoseryny udział fosfatazy alkalicznej, która jest zlokalizowana w przestrzeni peryplazmatycznej (14) i może zanieczyszczać zarówno frakcję wnętrza komórkowego, jak i frakcję popłuczyn I membran cytoplazmatycznych, wykonano dodatkowe doświadczenia w obecności L-seryny w końcowym stężeniu 10 mM. L-seryna jest swoistym inhibitorem fosfatazy fosfoserynowej i w tym stężeniu powoduje zahamowanie aktywności oczyszczonego preparatu enzymatycznego w 98% (12). L-seryna nie wywierała wpływu na aktywność preparatu handlowego fosfatazy alkalicznej w stosunku do fosfoseryny. Aktywność frakcji komórkowych w stosunku do fosfoseryny była hamowana przez ten aminokwas.



Ryc. 1. Enzymatyczny rozkład P-seryny i fosfoproteinek w obecności frakcji komórkowych; substraty: 1 — kazeina, pH 5,6, 2 — P-seryna, pH 8,0, 3 — P-seryna + L-seryna, 4 — fosfoproteiny *E. coli*, pH 6,0, frakcje komórkowe: W — cytoplazma, M — rozpuszczone membrany cytoplazmatyczne, I, II — popłuczyny membran komórkowych, F — fosfataza alkaliczna (preparat handlowy)

Enzymatic hydrolysis of P-serine and phosphoproteins in the presence of cellular fractions; substrates: 1 — casein, pH 5,6, 2 — P-serine, pH 8,0, 3 — P-serine + L-serine, 4 — phosphoproteins from *E. coli*, pH 6,0; cellular fractions: W — cytoplasm, M — dissolved cytoplasmic membranes, I, II — cytoplasmic membranes wash, F — alkaline phosphate (Koch Light Labor.)

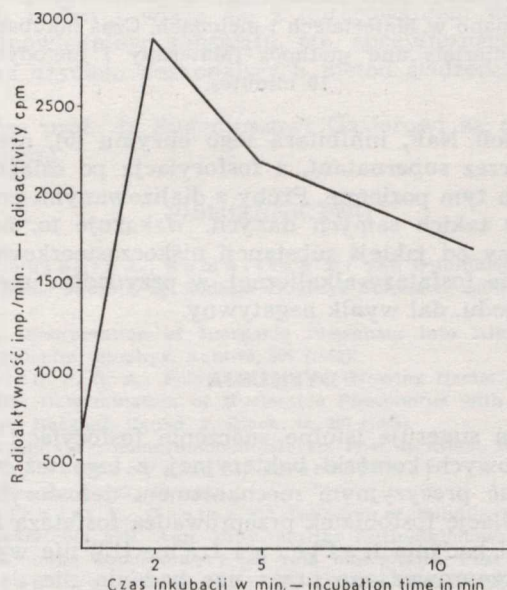


Ryc. 2. Wpływ pH na aktywność enzymatyczną; substraty: 1 — P-seryna, 2 — kazeina
Effect of pH on enzymatic activity; substrates: 1 — P-serine, 2 — casein

Do badań nad wpływem pH na uwalnianie fosforu nieorganicznego użyto frakcji najefektywniejszej w stosunku do trzech badanych substratów, tzn. popłuczyn I błon cytoplazmatycznych. Wyniki przedstawia ryc. 2. Optymalnym pH dla rozkładu fosfoseryny okazało się pH 8,0 (0,05 M bufor boranowy),

dla rozkładu kazeiny pH 5,6 (0,05 M bufor bursztynianowy), natomiast w przypadku fosfobiałek bakteryjnych bardzo niski, lecz uchwytany (0,023 μ mola P) rozkład obserwowano przy wartości pH 6,0 (0,05 M bufor bursztynianowy).

Najwyższe uwalnianie P_i z kazeiny przy wartości pH 5,6 i bardzo niski, lecz uchwytany rozkład preparatu fosfobiałek bakteryjnych w pH 6 oraz zastosowane kontrole (tab. 1) wykluczają możliwość, że obserwowana defosforylacja była nieenzymatyczna, a jedynie wynikiem działania odczynu środowiska. Defosforylację fosfobiałek bez udziału enzymów obserwuje się tylko w pH alkalicznym (10). Uzyskane wyniki sugerowały jednocześnie, że, być może, zastosowanie odpowiedniejszego substratu — preparatu natywnych fosfoproteidów bakteryjnych — i precyzyjniejszej metodyki może dać dokładniejszą odpowiedź na pytanie: czy w komórce bakteryjnej jest obecny enzym lub enzymy defosforylujące fosfobiałka. Z tego też względu w drugim etapie badań użyto jako substratu rybosomy, w których białka ufosforylowano z użyciem 32 P-ATP. Wyniki przedstawia ryc. 3. W obecności supernatantu bezrybosomo-



Ryc. 3. Kinetyka wbudowywania 32 P (32 P-ATP) w białka rybosomowe w obecności supernatantu bezkomórkowego
Kinetics of 32 P (32 P-ATP) incorporation into ribosomal proteins in the presence of ribosome-free supernatant

wego fosforylacja białek rybosomowych osiągnęła maksymalny poziom w ciągu 2 min., a następnie po 10 min. inkubacji obserwowano 50% spadek piętna w białku. Wskazywało to, że supernatant może zawierać albo aktywność defosforylującą fosfobiałka albo ATP-azę, albo inhibitor procesów fosforylacji lub fosfatazę alkaliczną.

Przeprowadzone eksperymenty wyjaśniły w pewnym stopniu ten problem (tab. 2). Przebieg kinetyki fosforylacji (ryc. 3) oraz dane przedstawione w tab. 2 wskazują, że obserwowany spadek wbudowywania 32 P do białek rybosomowych w obecności supernatantu nie jest spowodowany działaniem ATP-azy,

Tab. 2. Wpływ supernatantu bezrybosomowego i NaF na fosforylację rybosomów
Effect of ribosome — free supernatant and NaF on phosphorylation of ribosomes

Preparat rybosomowy Ribosomal preparation	Mieszanina inkubacyjna Incubation mixture	³² P-wbudowany w białko imp/min ³² P-incorporated into protein cpm
Rybosomy surowe Crude ribosomes	kompletna complete	1600
	kompletna + supernatant complete + supernatant	600
	kompletna + supernatant + NaF complete + supernatant + NaF	800
Rybosomy oczyszczone Purified ribosomes	kompletna + NaF complete + NaF	1100
	kompletna + NaF + supernatant complete + NaF + supernatant	250

Szczegóły, jak podano w Materiałach i metodach. Czas inkubacji 10 min.

Details as under Materials and methods (Materiały i metody). Incubation time 10 minutes.

gdyż dodatek 5 μ moli NaF, inhibitora tego enzymu (5), nie ma wpływu na efekt wywierany przez supernatant, a fosforylacja po osiągnięciu maksimum nie utrzymuje się na tym poziomie. Próby z dializowanymi preparatami supernatantu dostarczyły takich samych danych. Wskazuje to, że defosforylujący efekt nie jest zależny od jakiejś substancji niskocząsteczkowej. Test na obecność w supernatancie fosfatazy alkalicznej, w przypadku użycia jako substratu fenylofosforanu sodu, dał wynik negatywny.

DYSKUSJA

Wiele spostrzeżeń sugeruje istotne znaczenie fosforylacji białek dla regulacji procesów życiowych komórki bakteryjnej, z tego też względu komórka powinna dysponować precyzyjnym mechanizmem defosforylacji. W komórce zwierzęcej defosforylację fosfobiałek przeprowadza fosfataza fosfobiałkowa (6), natomiast u bakterii badania Raftera i Lane (13) nie wykazały obecności takiego enzymu. Przeprowadzone przez nas badania nie dały jednoznacznej odpowiedzi. Stwierdzono wyraźną obecność fosfatazy fosfoserynowej we frakcji wnętrza komórkowego i popłuczyn I błon cytoplazmatycznych. Obie te frakcje zawierały także niewielką aktywność enzymatyczną w stosunku do kazeiny. Wysłunęto przypuszczenie, że, być może, komórka bakteryjna dysponuje enzymem specyficznym dla własnych fosfobiałek i jest on strukturalnie związany z membranami cytoplazmatycznymi. Z tego też względu przeprowadzono serię doświadczeń, w których substratem był rozpuszczalny preparat fosfobiałkowy z *E. coli*, a źródłem aktywności enzymatycznej rozpuszczone błony cytoplazmatyczne. Badania te nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Niska aktywność rozpuszczonych błon cytoplazmatycznych i znikoma aktywność frakcji komórkowych w stosunku do preparatu fosfobiałek *E. coli* mogą być spowodowane w pierwszym wypadku inaktywującym działaniem SDS na aktywność enzymatyczną błon, w drugim — zmianami konformacyjnymi fosfoproteidu bakteryjnego, wywołanymi drastyczną procedurą. Użycie natywnego prepara-

tu fosfobiałkowego jako substratu i techniki izotopowej dały wyraźniejsze wyniki, wskazujące, że komórka bakteryjna prawdopodobnie zawiera enzym defosforylujący własne fosfobiałka, a wykrycie jego aktywności jest uzależnione od dysponowania odpowiednim układem doświadczalnym, tzn. głównie substratem w takiej formie, która jest najbardziej zbliżona do postaci fosfobialek, w jakiej występują one *in vivo*.

Wydaje się mało prawdopodobne, aby rozkład fosfobialek w komórkach bakteryjnych zachodził poprzez defosforylację fosfoaminokwasów uwolnionych w pierwszym etapie z białka przez enzymy proteolityczne. Przeczy takiej możliwości fakt, że wiele enzymów bakteryjnych, np. fosfataza alkaliczna z *E. coli*, występuje w dwóch formach — fosfoenzymu i enzymu pozbawionego fosforu. Defosforylacja tych enzymów nie pociąga za sobą naruszenia struktury molekuly białkowej (2). Fosfataza fosfoserynowa, obecna u *E. coli*, jest zaangażowana chyba tylko w szlaku biosyntezy seryny, co z całą pewnością stwierdzono (12).

Rozwiązanie problemu enzymatycznej defosforylacji fosfobialek u bakterii wymaga dalszych badań i wiąże się z opracowaniem doskonalszych metod przygotowania odpowiedniego substratu, tzn. specyficznego i nie zmienionego strukturalnie, oraz użyciem doskonalszych metod śledzenia przebiegu reakcji.

Dziękuję bardzo prof. dr Eugeniuszowi Gąsiorowi za cenne rady i pomoc w redagowaniu tekstu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bishop D. G., Rutberg L., Samulsson B.: The Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Bacillus subtilis* by Sodium Dodecyl Sulphate. *European J. Biochem.* 2, 245 (1967).
2. Engström L.: Incorporation of Inorganic Phosphate into Alkaline Phosphatase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 56, 606 (1962).
3. Flessel C., Rich P. R. A.: Polyribosomes of Growing Bacteria, *Science* 158, 658 (1967).
4. Hürst R. O.: The Determination of Nucleotide Phosphorus with a Stannous Chloride — Hydrazine Sulphate Reagent. *Canad. J. Biochem.* 42, 287 (1964).
5. Kahl A.: Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan. *Post. Biochem.* 18, 199 (1972).
6. Komkova A. J., Fedorova N. A., Mierzejewski T.: Fosfoprotein-fosfataza iz śleziarki świni. *Biochemija* 28, 482 (1963).
7. Kurek E., Wajchert T., Gąsior E.: Isolation of Soluble Preparation of Phosphoproteins from *Escherichia coli*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* 26, 27 (1971).
8. Kurek E.: Fosfobiałka komórkowe i ich rola biologiczna. *Post. Biochem.* 18, 419 (1972).
9. Kurek E., Grankowski N., Gąsior E.: On the Phosphorylation of *Escherichia coli* Ribosomes. II Reaction in Cell — Free System. *Acta Microbiol. Polon. seria A* 4 (21), 177 (1972).
10. Lisowski J.: Fosfobiałka. *Post. Hig. i Med. Dośw.* 17, 619 (1963).
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.: Protein Measurement with the Folin Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
12. Pizer L. J.: The Pathway and Control of Serine Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 238, 3934 (1963).
13. Rafter G. W., Lane W. C.: Phosphoproteins in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 83, 1077 (1962).
14. Schlesinger M. J.: Secretion of Alkaline Phosphatase Subunits by Spheroplasts of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 96, 727 (1968).

РЕЗЮМЕ

Изучена энзиматическая дефосфорилирующая активность нескольких клеточных фракций *E. coli* в отношении Р-серина, казеина, растворимого препарата фосфопро- тендов *E. coli* и рибосомных белков, меченных *in vitro* ^{32}P (^{32}P -АТР). Источниками эн-

зиматической активности были: внутреннее содержание клетки (цитоплазма), фракция после промывки цитоплазматических мембран 0,9% NaCl, растворенные цитоплазматические мембраны и супернатант, не имеющий рибосомов. Можно бы сказать, что в бактериальной клетке имеет место энзиматическая дефосфорилирующая активность, специфичная для собственных нативных фосфопротеидов, которая существует в супернатанте, не имеющих рибосомов.

SUMMARY

Several cellular fractions from *E. coli* have been tested for dephosphorylating enzymatic activity. The phosphoserine, casein, soluble preparation of phosphoproteins from *E. coli*, and phosphorylated *in vitro* ribosomal proteins were used as the substrates. The cytoplasm, cytoplasmic membranes wash, dissolved cytoplasmic membranes and ribosome-free supernatant were the sources of enzymatic activity. The obtained results suggest that bacterial cells contain dephosphorylating enzymatic activity specific for their own native phosphoproteins which was found in ribosome-free supernatant.