
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PAOLO TORTORA, GIOVANNI LUCCHINI, ANNASTELLA
GAMBINI, PAOLO CROSTI, RENATO BIANCHETTI

**Dipendenza dell'inizio della sintesi di catene
peptidiche dalla disponibilità del donatore di formile
in mitocondri isolati di *Saccharomyces cerevisiae***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 57 (1974), n.3-4, p.
268-274.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_57_3-4_268_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia vegetale. — *Dipendenza dell'inizio della sintesi di catene peptidiche dalla disponibilità del donatore di formile in mitocondri isolati di Saccharomyces cerevisiae* (*). Nota di PAOLO TORTORA, GIOVANNI LUCCHINI, ANNASTELLA GAMBINI, PAOLO CROSTI e RENATO BIANCHETTI, presentata (**) dal Corrisp. E. MARRÈ.

SUMMARY. — The dependence of mitochondrial protein synthesis initiation upon the formylation of initiator met-tRNA was investigated in experiments in which the rate of formyl-methionyl-peptidyl-puromycin derivatives formation was measured in the presence or absence of the appropriate formylating agent. The presence on N¹⁰-formyl-THFA increases several times the amount of ¹⁴C-Met incorporation in the initial peptides: in addition, when N¹⁰-¹⁴C-formyl-THFA was supplied, a remarkable amount of radioactivity was recovered bound to N-terminal methionine. Other experiments in which the deformylating activity on formyl-peptides was measured, allowed the conclusion that formyl group and methionine are incorporated in stoichiometric amounts. Thus, the formylation of the initiator met-tRNA is an absolute requirement for the peptide chain initiation in mitochondria. The biological significance of this requirement is discussed.

INTRODUZIONE

Recenti studi [1, 2, 3, 4] hanno evidenziato il ruolo del formil-metionil-tRNA_F come tRNA iniziatore nella sintesi delle catene peptidiche nei ribosomi mitocondriali.

La dimostrazione diretta di tale ruolo del metionil-tRNA_F formilato nel meccanismo di inizio, proviene da esperimenti in cui i mitocondri isolati hanno mostrato la capacità di sintetizzare derivati metionil-puromicinici, formilati in posizione N-terminale [5]. Altri esperimenti hanno dimostrato che la sintesi di tali peptidi è dipendente da puromicina, e procede a velocità costante per un periodo di tempo abbastanza lungo: ciò ha consentito la messa a punto di un sistema per la misura quantitativa della reazione d'inizio nei mitocondri [6].

Questo lavoro descrive una serie di esperimenti in cui tale sistema di misura dell'inizio è stato utilizzato allo scopo di verificare sia la natura del donatore di formile implicato nella formilazione del tRNA iniziatore, sia il grado di dipendenza della sintesi di peptidi iniziali dallo stato di formilazione di tale tRNA.

(*) Laboratorio di Fisiologia Vegetale, Istituto di Scienze Botaniche, Università di Milano, Centro di Studio del C.N.R. per la Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante, Milano (Italia).

(**) Nella seduta del 28 maggio 1974.

MATERIALI E METODI

1) *Preparazione dei mitocondri.*

I mitocondri erano preparati [7] da sferoplasti di *Saccharomyces cerevisiae* cresciuto su terreno contenente lattato quale principale fonte di carbonio [8]. Alternativamente, preparazioni di mitocondri venivano effettuate rompendo le cellule di lievito, risospese in tampone isotonic (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,4 M mannitolo), mediante passaggio in French-Press a 2000-3000 psi e successiva blanda potterizzazione dell'omogenato. Dopo centrifugazione a $800 \times g$ per 10', il sovrantante veniva centrifugato a $12.000 \times g$ per 20'. La frazione $800-12.000 \times g$ veniva risospesa in tampone analogo a quello usato per i mitocondri preparati da sferoplasti (0,1 M Hepes pH 7,5; 0,2 mM EDTA; 10 mM K_2HPO_4 ; 0,65 M mannitolo) e lavato 2-3 volte con lo stesso tampone.

I due diversi sistemi di preparazione dei mitocondri non diedero risultati apprezzabilmente diversi sia per quanto riguarda la capacità di sintesi dei peptidi iniziali, sia riguardo alla loro contaminazione batterica. Conteggi effettuati su frazioni mitocondriali, insemenate su Bacto Plate Count Agar Difco, diedero una contaminazione batterica media di $5 \times 10^3-5 \times 10^4$ batteri per ml di preparazione mitocondriale.

2) *Reagenti e substrati.*

L'attività specifica della metionina $1-^{14}C$ era di $57 \mu Ci/\mu Mole$. La fonte del gruppo formile, quando non marcato, era l'acido N^{10} -formil-tetraidrofolico $100 \mu M$, ottenuto da leucovorina commerciale (acido N^5 -formil-tetraidrofolico) mediante trattamento successivo acido-base [9]; l'acido $N^{10-3}H$ -formil-tetraidrofolico venne sintetizzato da 3H -formiato e acido tetraidrofolico usando N^{10} -formil-tetraidrofolico sintetasi (E.C. 6.3.4.3.) parzialmente purificata da foglie di spinacio [10]. Il prodotto della reazione fu poi purificato su colonna DEAE-cellulosa [11] e conservato a $-20^\circ C$ in 0,1 N mercaptoetanolo a pH 2.

3) *Estrazione e misura dei peptidi sintetizzati.*

I derivati peptidil-puomicinici sintetizzati venivano estratti tre volte con tre volumi di etil-acetato dopo aver portato l'incubato a pH 7,8 mediante aggiunta di 0,5 ml di NH_4HCO_3 0,3 M. Tale procedura assicura un recupero di circa il 95 % della formil-metionil-puomicina, ed altre estrazioni non aumentano sensibilmente il recupero di altri peptidi [6].

La rilevante quantità di radioattività presente negli estratti in etil-acetato, anche al tempo zero, veniva significativamente abbassata sottoponendo l'amminoacido marcato a ripetuti lavaggi con etil-acetato prima di fornirlo agli incubati.

La radioattività incorporata nei peptidi iniziali ed estratta con etil-acetato, veniva valutata mediante conteggio col metodo della scintillazione in fase liquida.

I campioni destinati alla analisi elettroforetica venivano portati a secco in corrente di azoto e applicati su carta; gli elettroferogrammi erano tagliati in strisce larghe 1 cm la cui radioattività era valutata col metodo sopracitato.

ESPERIMENTI E RISULTATI

Mitocondri isolati di lievito, pretrattati con puromicina, e incubati in un sistema completo per l'incorporazione di amminoacidi in presenza di un donatore del gruppo formile, sono in grado di sintetizzare derivati peptidil-puromicinici con formil-metionina all'N-terminale [5].

Come già precedentemente pubblicato [6], la concentrazione usata di puromicina, mentre determina un rapido e completo blocco dell'allungamento delle catene peptidiche, non inibisce il meccanismo d'inizio. Di conseguenza l'incorporazione di metionina esclusivamente in peptidi iniziali viene assicurata da un breve pretrattamento dell'incubato (5 min.) in assenza di metionina marcata.

TABELLA I

Effetto dei diversi sistemi formilanti sulla formazione di peptidi iniziali da parte di mitocondri isolati, in presenza di puromicina.

μmoli incorporate/mg di proteine mitocondriali/20 minuti.

CONDIZIONE DI INCUBAZIONE	Gruppo ^3H -formile	Metionina $1-^{14}\text{C}$
Mezzo di incubazione completo, meno il donatore di formile	—	7
+acido N^5 -formil-tetraidrofólico	—	12
+ acido N^{10-3}H -formil-tetraidrofólico	71	80
+ ^3H -formiato + acido tetraidrofólico	66	78
+ acido N^{10-3}H -formil-tetraidrofólico - metionina	39	—
+ acido N^{10-3}H -formil-tetraidrofólico + CAP $30\ \mu\text{M}$	41	38

In questo esperimento, 1 ml della miscela di reazione conteneva: mitocondri (2 mg di proteine); mannitolo 0,3 M; Hepes 70 mM pH 7,5; mercaptoetanolo 20 mM; KCl 60 mM; ortofosfato 5 mM; EDTA 50 μM ; ATP 5 mM; acetato di magnesio 5 mM; GTP 0,5 mM; PEP 20 mM; piruvato kinasi in eccesso; una miscela di 20 amminoacidi freddi 20 μM (là dove indicato, la metionina era marcata); puromicina 8 mM. La preparazione del donatore di formile (marcato o meno) è descritta in «Materiali e Metodi». I composti radioattivi furono aggiunti dopo 5' di preincubazione dei mitocondri nel mezzo completo. L'incubazione venne effettuata a 30° C per 20' dopo l'aggiunta del composto marcato. Dopo l'incubazione i campioni furono trattati con etil-acetato («Materiali e Metodi», paragrafo 3). CAP: cloramfenicolo.

La Tabella I riporta alcuni dati ottenuti da esperimenti nei quali ci si è proposti di determinare sia la natura dell'agente formilante necessario al metionil-tRNA_F per iniziare la sintesi di peptidi formilati, sia la dipendenza della reazione di inizio dalla presenza dell'agente formilante.

È stato dimostrato in precedenti esperimenti [6] che, nelle condizioni qui riportate, il rapporto di incorporazione tra formile e metionina, è prossimo a 1; perciò la formazione di peptidi iniziali, può essere misurata come incorporazione sia di formile, sia di metionina marcata, e i valori di incorporazione ottenuti nei due modi sono molto simili tra loro.

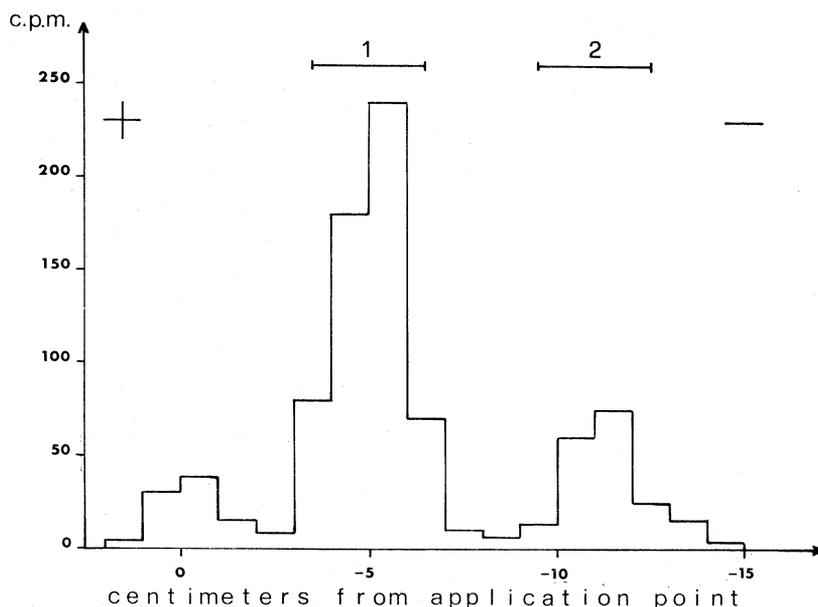


Fig. 1. - Elettroforesi dei derivati marcati della puomicina, sintetizzati da mitocondri isolati in presenza di puomicina 5 mM. Il marcatore era metionina 1-¹⁴C. Il grafico è corretto rispetto alla radioattività presente al tempo zero di incubazione. La composizione dell'incubato è descritta in Tabella I. L'elettroforesi fu effettuata su carta Whatman n. 1 in tampone acido formico-acido acetico pH 1,8 a 50 volt/cm per 80' a 7°C. I numeri arabi indicano composti marcati di riferimento, sintetizzati chimicamente: 1) formil-metionil-puomicina; 2) metionil-puomicina.

I risultati mostrano che, mentre l'acido N⁵-formil-tetraidrofolic non modifica l'entità della incorporazione di metionina nei peptidi etil-acetato estraibili, l'acido N¹⁰-formil-tetraidrofolic sembra invece il composto specificamente implicato nella formilazione; difatti il gruppo formile radioattivo presente in questo composto viene trasferito sui peptidi iniziali, la cui sintesi, per di più, appare notevolmente stimolata.

Quando al mezzo di incubazione si aggiunge formiato radioattivo e acido tetraidrofolic si riscontra, in presenza di ATP, una sintesi quantitativamente simile di peptidi iniziali: ciò sembra dimostrare la presenza negli incubati di un'attività formiato: tetraidrofolic ligasica ATP-dipendente. Questa

ligasi sembra infatti presente tanto nel citoplasma quanto in mitocondri e cloroplasti [12], ed ad essa può quindi essere attribuita la sintesi *in vivo* del donatore di formile utilizzato nella formilazione del metionil-tRNA_F.

L'aspetto più interessante che emerge dai dati della Tabella I, è tuttavia la drastica riduzione della quantità di metionina incorporata in derivati peptidil-puromicinici in assenza dell'appropriato donatore di formile: ciò sembra dimostrare una stretta dipendenza della formazione di peptidi iniziali dalla disponibilità di acido N¹⁰-formil-tetraidrofolic.

La prova diretta di una stretta dipendenza della sintesi proteica mitocondriale dal livello di acido N¹⁰-formil-tetraidrofolic, potrebbe provenire dall'analisi elettroforetica dei prodotti di incorporazione. Infatti una stretta dipendenza comporterebbe la sintesi di peptidi esclusivamente formilati, e qualora questa caratteristica fosse mantenuta, essa sarebbe facilmente evidenziabile, almeno per la maggior parte di essi, attraverso una minore mobilità elettroforetica.

L'analisi elettroforetica dei prodotti di una incubazione effettuata in presenza di metionina radioattiva (fig. 1), mostra che circa tre quarti dei peptidi migrano come la formil-metionil-puromicina, e possono quindi considerarsi formilati.

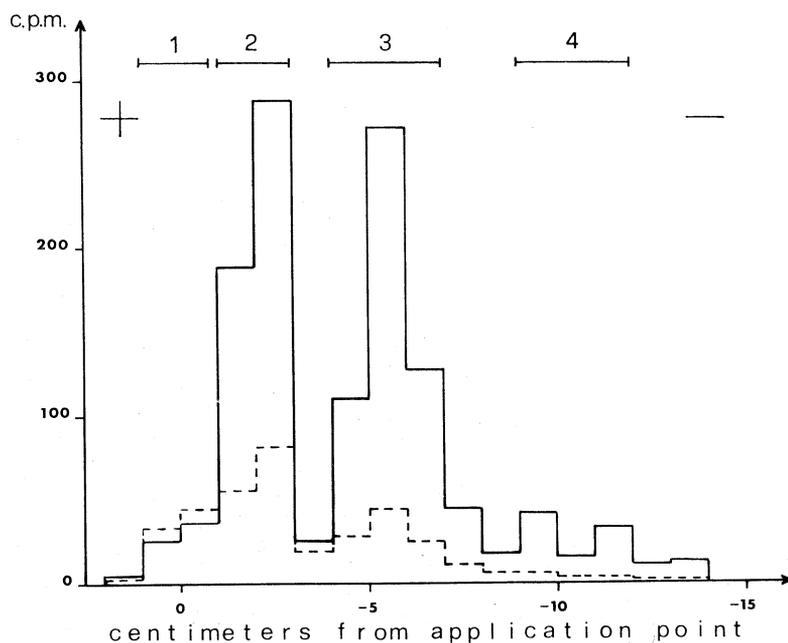


Fig. 2. - Elettroforesi dei derivati marcati della puromicina, sintetizzati da mitocondri isolati in presenza di puromicina 5 mM. Il marcatore era formiato ¹⁴C 1 mM, 57 μ Ci/ μ mole. La composizione dell'incubato è quella indicata in Tabella I, cui è da aggiungere acido tetraidrofolic 8 mM. Linea continua: incubazione per 5'. Linea tratteggiata: incubazione per 30'. L'elettroforesi fu effettuata su carta Whatman n. 1 in tampone acido formico-acido acetico pH 2,5 a 45 volt/cm per 80' a 7°C. I numeri arabi indicano composti marcati di riferimento: 1) formiato; 2) acido N¹⁰-formil-tetraidrofolic; 3) formil-metionil-puromicina; 4) metionil-puromicina.

Rimane però da accertare se la radioattività presente nella zona della metionil-puromicina, sia da ascrivere a peptidi sintetizzati senza formile, o deformilati in un tempo successivo: infatti l'ipotesi di una stretta dipendenza sarebbe convalidata solo nel secondo caso. È da ricordare, a questo proposito, che in batteri è stata evidenziata una notevole attività deformilasica nei confronti dei formil-peptidi [13].

Una attività deformilasica può essere evidenziata mediante analisi elettroforetica dei peptidi sintetizzati con il gruppo formilico marcato, in tempi successivi di incubazione; i dati ottenuti da un simile esperimento sono descritti nella fig. 2. È facilmente constatabile che a 30' la radioattività nella zona della formil-metionil-puromicina è ampiamente minore di quella riscontrata dopo 5'. Tale risultato rivela la presenza, in mitocondri isolati, di un'attività deformilasica sufficientemente alta da giustificare pienamente l'ipotesi che peptidi situati nella zona della metionil-puromicina, cioè non formilati, originino attraverso deformilazione di formil-peptidi.

Appare pertanto che l'incorporazione in peptidi di una certa aliquota, peraltro limitata, di metionina marcata anche in assenza di acido N¹⁰-formil-tetraidrofolico (Tabella I), deve essere ascritta alla presenza di un pool intramitocondriale del donatore di formile, o di altri composti in esso facilmente convertibili.

DISCUSSIONE

Il complesso di dati qui riportati, rende ragionevole la conclusione che la reazione di transformilazione del metionil-tRNA iniziatore, costituisca un atto necessario della reazione d'inizio della sintesi delle catene polipeptidiche mitocondriali.

Sembra quindi da escludere che una regolazione avvenga attraverso una diversa efficienza delle due forme - formilata e non formilata - del tRNA iniziatore nella reazione di inizio. Una analoga conclusione è stata tratta su esperimenti simili condotti da diversi ricercatori su estratti di *E. coli* [13].

Il significato biologico della assoluta necessità della reazione di transformilazione non è tuttora completamente chiaro. Per quanto riguarda i batteri, è stato più volte suggerito che la disponibilità di acido N¹⁰-formil-tetraidrofolico, presumibilmente per la formilazione del metionil-tRNA iniziatore, costituisca un fattore importante nella regolazione della sintesi proteica e dell'RNA [14, 15, 16].

Studi che approfondiscano la relazione fra il livello di acido N¹⁰-formil-tetraidrofolico nell'organello e l'intero metabolismo dei frammenti a un atomo di carbonio, legato anch'esso ai derivati dell'acido tetraidrofolico, dovrebbero permettere di stabilire se questo meccanismo sia valido anche per gli organelli citoplasmatici.

Appare tuttavia interessante considerare l'ipotesi alternativa che il meccanismo di regolazione non sia basato sulla variazione del livello del donatore di formile, bensì venga affidato a modulazioni della attività dell'enzima transformilante. Tale ipotesi sarà oggetto di prossime ricerche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SCHWARTZ J. H., EINSESTADT J. M. e BRAWERMAN G. (1967) – « J. Mol. Biol. », 25, 571.
- [2] POLZ G. e KREIL G. (1970) – « Biochem. Biophys. Res. Comm. », 39, 516.
- [3] SALA F. e KUNTZEL H. (1970) – « Eur. J. Biochem. », 15, 280.
- [4] GALPER J. B. e DARNELL J. E. (1971) – « J. Mol. Biol. », 57, 363.
- [5] BIANCHETTI R., LUCCHINI G. e SARTIRANA M. L. (1971) – « Biochem. Biophys. Res. Comm. », 42, 97.
- [6] LUCCHINI G., BIANCHETTI R. e CROSTI P. (1973) – « Biochem. Biophys. Res. Comm. », 51, 144.
- [7] OHNISHI T., KAWAGUCHI K. e HAGIHARA B. (1966) – « J. Biol. Chem. », 241, 1797.
- [8] DARLING S., THEILADE J. e BIRCH-ANDERSEN A. (1969) – « J. Bacteriol. », 98, 797.
- [9] RABINOWITZ J. C. (1963) – In Colowick S. P. e Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*, 6, Academic Press, 814.
- [10] HIATT A. J. (1965) – « J. Plant. Physiol. », 40, 184.
- [11] HO P. P. K. e JONES L. (1967) – « Biochim. Biophys. Acta », 148, 622.
- [12] CROSTI P. (1974) – « Ital. J. Biochem. », 23, 72.
- [13] LUCAS-LAMARD J. e LIPMANN F. (1971) – « Ann. Rev. Biochem. », 40, 759.
- [14] EISENSTADT J. e LENGLEY P. (1966) – « Science », 154, 524.
- [15] SHIH A., EISENSTADT J. e SENGVEL P. (1966) – « Proc. Nat. Ac. Sc. US. », 56, 1599.
- [16] DANCHIN A. (1973) – « FEBS letters », 34, 327.