
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MAURIZIO COCUCCI, ANTONIO BALLARIN-DENTI, MARIA
TERESA MARRÈ

**Azione dell'ortovanadato sulle attività ATPasiche di
preparati di membrane di semi germinati di
Ravanello (*Raphanus sativus* L.)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.6, p. 373–379.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_6_373_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. — *Azione dell'ortovanadato sulle attività ATPasiche di preparati di membrane di semi germinati di Ravanello* (*Raphanus sativus* L.) (*). Nota di MAURIZIO COCUCCI, ANTONIO BALLARIN-DENTI e MARIA TERESA MARRÈ, presentata (**) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — Orthovanadate at concentrations between 20 and 50 μ M markedly inhibits the DCCD-sensitive, K^+ stimulated ATPase activity of microsomal preparations from germinating radish seeds. The oligomycin-sensitive ATPase activity present in mitochondrial preparations (and, as a contaminant, also in microsomal preparations) is not inhibited by orthovanadate. These results are in full agreement with the recent data on the effects of vanadate on the ATPase activities of membrane preparations from *Neurospora* and suggest that vanadate is a useful, possibly specific inhibitor of the K^+ , Mg^{++} dependent plasmalemma ATPase.

INTRODUZIONE

Ricerche recenti suggeriscono che nelle piante superiori una ATPasi presente nel plasmalemma sia direttamente implicata nel processo di estrusione attiva ed elettrogenica di ioni H^+ dal citoplasma al mezzo esterno [1, 2, 3, 4]. La conferma di questa ipotesi sarebbe enormemente facilitata dalla possibilità di disporre di inibitori quanto possibile specifici dell'ATPasi del plasmalemma, e dell'analisi dei loro effetti « in vivo » sul trasporto di H^+ e fenomeni ad esso associati. Inibitori specifici delle diverse ATPasi presenti in omogenati ed estratti di tessuti vegetali permetterebbero inoltre un progresso nella localizzazione subcellulare di questi enzimi, e nell'analisi delle strutture presenti nelle frazioni che da questi preparati si possono separare mediante gradienti di densità-centrifugazione frazionata ed altri metodi di frazionamento.

Allo stato attuale delle conoscenze, almeno tre principali categorie di ATPasi possono mettersi in evidenza negli omogenati di cellule vegetali: 1) ATPasi dei mitocondri e dei cloroplasti, che utilizzano per la sintesi di ATP da ADP e Pi l'energia del gradiente protonico creato alle spese di energia redox, nella respirazione, o di energia elettromagnetica nella fotosintesi; 2) ATPasi del plasmalemma, e possibilmente di altre membrane cellulari

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

(**) Nella seduta del 16 dicembre 1978.

Abbreviazioni: DCCD, dicicloesilcarbodiimide; DES, dietilstilbestrolo; Pi, fosfato inorganico.

(come reticolo endoplasmico, apparato di Golgi, tonoplasto). Questi enzimi sono presumibilmente impegnati nell'utilizzazione della energia della reazione di idrolisi dell'ATP per la formazione attiva di potenziale elettrico transmembrana (mediante trasporto di ioni) e per il trasporto attivo di soluti, anche elettricamente neutri; 3) una terza categoria di ATPasi, presente principalmente nella frazione solubile degli omogenati, ma forse anche dei preparati di membrana, rimane funzionalmente non definita e può, almeno in parte, rappresentare artefatti di varia natura.

Per quanto riguarda la discriminazione di queste diverse attività enzimatiche mediante inibitori, e limitandoci agli inibitori più interessanti in quanto meno aspecifici, risulta che: 1) le ATPasi dei cloroplasti e dei mitocondri sono inibite da DCCD [5] a bassissime concentrazioni; quella dei mitocondri, ma non quella dei cloroplasti, è fortemente inibita dall'oligomicina. Infine il DES inibisce debolmente l'ATPasi dei mitocondri, mentre mancano dati circa la sua azione sull'ATPasi dei cloroplasti [5, 6]; 2) le ATPasi del plasmalemma (ed eventualmente altre membrane) sono pure esse inibite da DCCD, a concentrazioni relativamente alte, e dal DES, a concentrazioni relativamente poco attive sull'ATPasi mitocondriale [7, 8]; 3) la terza classe, meno ben definibile, di ATPasi, presente in tutti i preparati di membrana e nella frazione solubile, sembra relativamente insensibile sia al DES che al DCCD.

Dati recenti hanno individuato nel vanadato un nuovo inibitore, apparentemente specifico per alcune attività ATPasiche. Questo ione, infatti, risulta inibire a dosi molto basse negli animali l'ATPasi del plasmalemma responsabile dello scambio Na^+/K^+ [9], e nel fungo *Neurospora crassa* l'ATPasi di plasmalemma responsabile dell'estrusione attiva di H^+ [10]. In entrambi i casi l'ATPasi mitocondriale risulta praticamente insensibile al vanadato.

Mancano del tutto dati per quanto riguarda l'azione di questo interessante inibitore sulle ATPasi delle piante superiori, ed in particolare sulle ATPasi di plasmalemma, che risultano per vari aspetti diverse da quelle degli animali e dei funghi, e la cui funzione è ancora soggetta a discussione.

In questo lavoro abbiamo quindi preso in esame l'azione del vanadato sulla attività ATPasica di frazioni di omogenati ottenuti da semi germinanti di ravanella (*Raphanus sativus*). Le frazioni considerate sono state:

a) la frazione che sedimenta tra 350 e $10.000 \times g$, contenente soprattutto mitocondri, ma largamente contaminata da altre strutture, e soprattutto, probabilmente, da plasmalemma (frazione mitocondriale);

b) la frazione che in centrifugazione frazionata sedimenta tra 13,000 e $80,000 \times g$ (frazione di microsomi). Questa frazione è ricca soprattutto in frammenti di plasmalemma, riorganizzati sotto forma di vescicole, ma contenente anche membrane del reticolo endoplasmico, dell'apparato di Golgi, ed in misura molto minore, di mitocondri.

ESPERIENZE E RISULTATI

Azione del vanadato sulla componente DCCD-sensibile dell'attività ATPasica della frazione microsomiale.

I dati della Tabella I mostrano che l'ortovanadato a concentrazione relativamente bassa inibisce significativamente (41 %) l'attività ATPasica della frazione microsomiale. L'inibizione percentuale diminuisce di molto in presenza di DCCD. Di conseguenza, l'effetto inibente del vanadato viene a risultare maggiorato, e sale al 55 % quando calcolato per la componente DCCD sensibile, generalmente imputata ad ATPasi del plasmalemma e dei mitocondri [5, 8]. Questo risultato dimostra quindi che il vanadato inibisce in modo significativo soprattutto l'attività DCCD sensibile. Poiché, nel nostro preparato di microsomi la contaminazione da mitocondri è modestissima, sembra legittimo concludere che il vanadato inibisca, in questo preparato, soprattutto la ATPasi DCCD sensibile, K^+ e Mg^{++} -dipendente del plasmalemma.

TABELLA I

Inibizione da vanadato dell'attività ATPasica in preparati di membrane di semi germinanti di ravanello.

	ATPasi		
	Totale	DCCD resistente	DCCD sensibile
Controllo	1,95	0,70	1,25
Vanadato 10 μ M	1,14	0,58	0,56
Effetto vanadato	— 41 %	— 17 %	— 55 %

I preparati di membrane (frazione tra 13,000 e 80,000 \times g) di semi germinati per 24 ore erano ottenuti come descritto da S. Cocucci e M. Cocucci [4]. Il dosaggio delle ATPasi era effettuato analizzando il P_i idrolizzato dall'ATP a 26 °C per 1 h. Il mezzo in cui avveniva la reazione aveva la seguente composizione: ATP 3 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KCl 30 mM, TRIS 0.1 mM; pH = 6.0. I dati sono espressi come μ Moli P_i idrolizzato / grammi di peso fresco iniziale.

Questa conclusione è confermata nei dati della Tabella II, che mostra l'effetto di concentrazione di vanadato tra 5 e 50 μ M sull'attività ATPasica microsomiale DCCD sensibile dosata in condizione rispettivamente di bassa (2 mM) ed alta (27 mM) concentrazione di K^+ . Dall'esame della Tabella si osserva che, mentre l'aumento della concentrazione in K^+ induce il consueto notevole aumento di attività ATPasica (ca + 70 %) nei controlli, l'inibizione

TABELLA II

Inibizione da vanadato dell'attività ATPasica Mg^{++} , K^{+} -stimolata, DCCD sensibile di preparati di membrane.

	ATPasi DCCD sensibile (*)		
	a: Totale ($K^{+}=27$ mM)	b: $K^{+}=2$ mM	K^{+} sens. (a - b)
Controllo	1,35	0,80	0,55
Vanadato 5 μ M	0,88	0,57	0,31 (- 43%)
Vanadato 20 μ M	0,62	0,37	0,25 (- 54%)
Vanadato 50 μ M	0,40	0,18	0,22 (- 60%)

(*) L'attività DCCD sensibile era ottenuta sottraendo all'attività totale quella che risultava insensibile al DCCD: $DCCD = 3 \times 10^{-4}$ M.

I preparati di membrane (frazione tra 13,000 e 80,000 \times g) di semi germinati per 24 ore erano ottenuti come descritto da S. Cocucci e M. Cocucci [4]. Il dosaggio delle ATPasi era effettuato analizzando il P_i idrolizzato dall'ATP a 26 °C per 1 h. Il mezzo in cui avveniva la reazione aveva la seguente composizione: ATP 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KCl come in tabella, TRIS 0.1 mM; pH = 6.7. I dati sono espressi come μ Moli di P_i idrolizzato / grammi di peso fresco iniziale.

TABELLA III

Assenza di inibizione da vanadato della componente ATPasica Mg^{++} , K^{+} -stimolata, oligomicina sensibile di preparati di membrana.

	ATPasi		
	a: Totale	b: con Olig. 5 γ /ml	(a - b): Olig. sens.
Controllo	2,25	1,93	0,32
Vanadato 5 μ M	1,78	1,37	0,41
Vanadato 20 μ M	1,52	1,08	0,44
Vanadato 50 μ M	1,30	0,89	0,41

Per allestimento dei preparati e dosaggio dell'attività ATPasica vedere Tabella II. I dati sono espressi come μ Moli di P_i idrolizzato / grammi di peso fresco iniziale.

percentuale del vanadato si mantiene pressochè uguale nelle due condizioni di $[K^+]$ basso ed alto, indicando così la sensibilità al vanadato della componente K^+ -stimolata dell'attività ATPasica.

Nelle esperienze della Tabella III abbiamo studiato l'effetto dell'ortovanadato sull'attività ATPasica della frazione microsomiale determinata in presenza od assenza di oligomicina, efficace inibitore dell'ATPasi mitocondriale [5] (DCCD sensibile e K^+ -stimolata) presente in modesta quantità in questi preparati. I dati dimostrano una mancanza di effetto inibente del vanadato sulla frazione di attività oligomicina sensibile, e quindi, sulla ATPasi dei mitocondri.

Effetti del vanadato sull'attività ATPasica dei preparati mitocondriali.

I preparati mitocondriali del materiale qui usato contengono, oltre all'attività ATPasica mitocondriale, una pesante contaminazione da attività ATPasica di altre membrane, soprattutto plasmalemma. Nelle esperienze della Tabella IV l'attività è stata determinata a pH 6,7 e quindi in una condizione che favorisce l'attività del plasmalemma (con optimum a pH di ca. 6-6,5) rispetto a quella mitocondriale (optimum a pH di ca. 8,5). In questa condizione circa il 41 % dell'attività risulta inibita dall'oligomicina, e quindi deve ritenersi mitocondriale. Il vanadato alla concentrazione massima usata inibisce del 57% l'attività oligomicina insensibile (non mitocondriale) mentre la frazione oligomicina sensibile non risulta assolutamente inibita, anzi, se

TABELLA IV

Effetto del vanadato sull'ATPasi Mg^{++} , K^+ -stimolata presente in preparati di membrane mitocondriali (pH = 6.7; K^+ = 27 mM).

	ATPasi		
	Totale	Olig. insens.	Olig. sens.
Controllo	0,36	0,21	0,15
Vanadato 20 μ M	0,34	0,11	0,23
Vanadato 50 μ M	0,32	0,09	0,23

Le membrane mitocondriali erano ottenute dalla frazione « mitocondriale » (tra 500 e 13,000 \times g) come descritto da S. Cocucci e M. Cocucci [4]. La frazione tra 500 e 13,000 \times g era risospesa e precipitata a 8,000 \times g. Il precipitato veniva risospeso e sonicato per 2 min. a 20,000 Hz a 0 °C. Le membrane erano raccolte mediante centrifugazione a 150,000 \times g per 30'. Tali precipitati sono stati utilizzati per il saggio della ATPasi il cui dosaggio era effettuato secondo quanto descritto in Tabella II. I dati sono espressi come μ Moli di P_i idrolizzato / grammi di peso fresco iniziale.

mai, alquanto aumentata. Questo risultato conferma quindi la conclusione suggerita dagli esperimenti eseguiti sulla frazione microsomiale: e cioè che l'ATPasi mitocondriale, per lo meno nelle condizioni sperimentali adottate, non è inibita dal vanadato.

CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca possono così riassumersi:

1) In preparati microsomiali ottenuti da semi germinanti di ravanello il vanadato a concentrazione tra 20 e 50 μM inibisce fortemente (fino a circa il 60%) la attività ATPasica DCCD-sensibile, K^+ -stimolabile. Per contro, l'attività DCCD-insensibile e l'attività oligomicina-sensibile degli stessi preparati risultano rispettivamente poco o per nulla inibite dal vanadato;

2) In preparati mitocondriali l'attività ATPasica oligomicina sensibile (imputabile alla ATPasi mitocondriale) non è per nulla inibita dal vanadato.

L'interpretazione più semplice di questi risultati è che l'azione inibente del vanadato si espliciti essenzialmente e forse esclusivamente sulla componente ATPasica K^+ , Mg^{++} dipendente, DCCD sensibile e oligomicina insensibile generalmente identificata come ATPasi del plasmalemma, senza influenzare l'attività ATPasica mitocondriale. Questa interpretazione è in pieno accordo con i risultati (per altro più completi e più convincenti) ottenuti da Bowman *et al.* [10] in *Neurospora crassa*, dove il vanadato inibisce l'ATPasi del plasmalemma, ed è inattivo su quella mitocondriale.

L'analogia di comportamento tra ATPasi del plasmalemma di *Neurospora crassa* da un lato di piante superiori e dall'altro, è di evidente interesse da diversi punti di vista: biochimico, evolutivo e fisiologico. In particolare, l'analogia di comportamento rispetto a tutti gli inibitori noti suggerisce che l'ATPasi di plasmalemma delle piante superiori svolga funzioni analoghe a quelle proprie (e molto meglio conosciute) dell'enzima di *Neurospora crassa*. Ora, le recenti ricerche di Scarborough e di Slayman e collaboratori dimostrano in modo convincente che l'ATPasi di plasmalemma di *Neurospora crassa* è parte del meccanismo di estrusione elettrogenica di protoni [3, 11, 12]. I dati della presente ricerca vengono quindi a portare un ulteriore argomento a favore dell'ipotesi tuttora in discussione, che anche l'ATPasi di plasmalemma di piante superiori sia un componente di una pompa protonica responsabile della trasformazione di energia potenziale di trasporto di fosfato in energia di gradiente elettrochimico di idrogenioni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. J. POOLE (1978) - « Ann. Rev. Plant Physiol. », 29, 437-460.
- [2] E. MARRÈ (1979) - « Ann. Rev. Plant Physiol. » (in press).
- [3] B. J. BOWMAN and C. W. SLAYMAN (1977) - « J. Biol. Chem. », 252 (10), 3357-3363.
- [4] S. COCUCCI and M. COCUCCI (1977) - « Plant Sci. Lett. », 10, 85-95.

- [5] Y. KAGAWA (1978) - « *Biochem. Biophys. Acta* », 505, 45-93.
- [6] N. E. BALKE and T. K. HODGES (1977) - « *Plant. Sci. Lett.* », 10 (4), 305-400.
- [7] N. BEFFAGNA E. MARRÈ and S. COCUCCI (1978) - « *Planta* » (in press).
- [8] R. T. LEONARD and T. K. HODGES (1973) - « *Plant Physiol.* », 52, 6-15.
- [9] L. C. CANTLEY, L. JOSEPHSON, R. WARNER, N. YANAGISAWA, C. LECHENE and G. GUIDOTTI (1977) - « *J. Biol. Chem.* », 252, 7421-7423.
- [10] B. J. BOWMAN, S. E. MAINES, K. E. ALLEN and C. W. SLAYMAN (1978) - « *Biochem. Biophys. Acta* », 512, 13-28.
- [11] G. A. SCARBOROUGH (1976) - « *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* », 73, 1485-1488.
- [12] C. L. SLAYMAN and D. GRADMAN (1975) - « *Biophysical Journal* », 15, 968-971.