27. V. 198

ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 16

Přihlášeno 15. 07. 1974 /PO 54-74/

Právo přednosti 06. 10. 1972 /Biochemical And Biophysical Research Communications 49, 1972, 1/

Zveřejněno Biochim. Biophys. Acta 357, 1974:453; Arch. Microbiol. 97, 1974:81

Uděleno 19. 12. 1979

Vydáno: 29. 02. 1980

DT 581.17
576.35
576.311.347

Autoři objevu: Šubík Július RNDr., Bratislava,
Kováč Ladislav doc. RNDr., CSc, Bratislava a
Kolarov Jordan RNDr., CSc., Bratislava

Název objevu: Nevyhnutná potreba intramitochondriálneho adenozíntrifosfátu pre normálnu replikáciu mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny a delenie eukaryotických buniek

Předmět objevu: Jav spočívajúci v zistení nevyhnutnej potreby intramitochondriálneho adenozíntrifosfátu pre zachovanie normálnej replikácie mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny a delenie eukaryotických buniek.

Predmetom objavu je zistenie týkajúce sa nutnosti kontinuálnej prítomnosti adenozíntrifosfátu /ATP/ vo vnútri mitochondrií rastúcich eukaryotických buniek ako pre normálnu replikáciu mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny /DNK/ tak aj pre funkcie mitochondrií podmieňujúce bunkové delenie. Na základe tohto javu v aeróbnej kultúre rastúcich kvasiniek Saccharomyces cerevisiae dochádza k hromadnej tvorbe respiračne deficitných mutantov ak súčasne je syntéza adenozíntrifosfátu v mitochondriách znemožnená inhibíciou dýchania a ak vstup adenozíntrifosfátu z cytosolu do mitochondrií je blokovaný s kyselinou bongkrekovou. Naviac v komplexnom glukózovom médiu multiplikácia buniek respiračne deficitných mutantov kvasiniek alebo petit negatívnych kvasiniek rastúcich v prítomnosti antimycínu A sa účinkom kyseliny bongkrekovej zastaví.

Mitochondrie sú všeobecne považované za bunkové organely špecializované pre tvorbu adenozíntrifosfátu. Ak by však toto bola ich jediná esenciálna funkcia, potom fakultatívne anaeróbne organizmy ako kvasinky by mohli postrádať mitochondrie. Hoci sú známe mnohé mutácie ovplyvňujúce štruktúru a funkciu mitochondrií kvasiniek /Kováč L.: Biochim. Biophys. Acta 346, 101 /1974/ /, predsa sa nenašli žiadne mutanty kvasiniek, ktoré by nemali mitochondrie. Mitochondriálne štruktúry sú zachované i u kvasiniek rastúcich

za anaeróbnych podmienok /Plattner H., Schatz G.: Biochemistry 8, 339 /1969//. Navyše existencia špecifických mitochondriálnych mutácií naznačuje, že mitochondrie v eukaryotických bunkách by mohli mať vitálnu funkciu i v nedýchajúcich bunkách.

Podstatou objavu je jav spočívajúci v zistení nevyhnutnej potreby intramitochondriálneho adenozíntrifosfátu pre zachovanie normálnej replikácie mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny a delenie eukaryotických buniek.

Obr. 1 udáva vplyv kyseliny bongkrekovej na dýchanie a kvasenie aeróbne vyrastených buniek divého kmeňa kvasiniek S. cerevisiae DT XII. Obr. 2 udáva rastové výťažky buniek kvasiniek S. cerevisiae DT XII v závislosti na koncentrácii kyseliny bongkrekovej. Obr. 3 udáva rastové krivky a kinetiku tvorby respiračne deficitných mutantov kvasiniek v prítomnosti kyseliny bongkrekovej a antimycínu A.

V priebehu experimentov kvasinky rástli pri 30°C v semisyntetickom médiu /Kováč L., Bednárová H., Greksák M.: Biochim. Biophys. Acta 153, 32 /1968// s 0,5 až 2 % glukózou ako substrátom. Rast bol sledovaný počítaním buniek v Bürkerovej komôrke. Respiračne deficitné mutanty boli detekované podľa veľkosti kolónií a schopnosti farbenia sa s trifenyltetrazólium chloridom po raste na pevných médiách obsahujúcich glukózu a glycerol /Ogur M., St. John R., Nagai S.: Science 125, 928 /1957//. Kvasenie a dýchanie bolo merané konvenčnou manometrickou technikou. Cytochrómové spektrum bolo merané na spektrofotometri Hitachi-Perkin Elmer 356. Izolácia mitochondrií a stanovenie ich vlastností sa previedlo postupmi Kováča a spol. /Kováč L., Bednárová H., Greksák M.: Biochim. Biophys. Acta 153, 32 /1968//. Podobne, publikované postupy a techniky sa použili i pri experimentoch s vláknitými hubami /Šubík J., Behúň M.: Arch. Microbiol. 97, 81 /1974//.

Kyselina bongkreková ako vysoko účinný inhibítor tranzlokácie adenínových nukleotidov v izolovaných mitochondriách účinkovala na divý kmeň kvasiniek S. cerevisiae nasledovným spôsobom: a/ zabránila rastu buniek na nefermentabilných substrátoch a znížila aeróbne rastové výťažky na glukóze na anaeróbnu úroveň; b/ inhibovala dýchanie buniek na glukóze na 65%; c/ inhibícia dýchania bola uvoľnená s odpojovačmi oxidatívnej fosforylácie; d/ zvýšila rýchlosť aeróbnej glykolýzy na anaeróbnu úroveň, čím úplne inhibovala Pasteurov efekt. Nemala však vplyv na anaeróbnu glykolýzu. Uvedený vplyv kyseliny bongkrekovej na metabolickú aktivitu buniek kvasiniek je znázornený na obr. 1. Tento obrázok udáva časovú závislosť spotreby kyslíka a tvorby kysličníka uhličitého kde na ose x t je čas v minutách a na ose y v je objem plynu v /ul. Hlavný priestor Warburgovej baničky obsahoval v objeme 2,5 ml: 80 mM citrát-fosfát pH 4,3, 50 mM glukózu, inhibítor a kvasinky /0,88 mg sušiny/. 1-spotreba kyslíka v prítomnosti 4,2 /uM kyseliny bongkrekovej; pri šipke 50 /uM 2,4-dinitrofenol bol pridaný z bočného ramena; 2-ako 1, ale tvorba CO_2; 3-spotreba kyslíka bez inhibítora; pri šipke bola pridaná 4,2 /uM kyselina bongkreková z bočného ramena; 4-ako 3, ale tvorba CO_2.

Všetky tieto efekty sú v súhlase s predpokladom, že kyselina bongkreková u intaktných buniek kvasiniek špecificky inhibuje tranzlokáciu adenínových nukleotidov cez mitochondriálnu membránu bez vplyvu na iné procesy. Tento fakt podporuje i skutočnosť, že ako inhibítor bola kyselina bongkreková u intaktných buniek účinná už v tak nízkych koncentráciách /obr. 2/ ako tomu bolo u intaktných mitochondrií /Henderson P.J.F., Lardy H.A.: J. Biol. Chem. 245, 1319 /1970/, Klingenberg M., Grebe K., Heldt H. W.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 344 /1970//. Obr. 2. udáva rastový výťažok buniek kvasiniek na glukóze ako funkciu koncentrácie kyseliny bongkrekovej, kde

na ose x c je koncentrácia antibiotika v /uM a na ose y z je počet buniek v 1 ml rastového média. Bunky rástli aeróbne 60 hod v médiu obsahujúcom 0,5 % glukózu ako zdroj uhlíka a kyselinu bongkrekovú v koncentráciách udaných na obrázku. Rastový výťažok buniek rastúcich anaeróbne bez inhibítora bol 4 x 10^7 buniek/ml.

Bunky kvasiniek S. cerevisiae vyrastené na glukóze /2 %/ ako substráte v prítomnosti 22 /uM kyseliny bongkrekovej boli schopné dýchať s Q_{O_2} = 17,7 v porovnaní s hodnotou Q_{O_2} = 97,2 nameranou pre kontrolné bunky a mali všetky cytochrómy aj keď množstvo cytochrómu a bolo podstatne znížené v porovnaní k cytochrómom b a c.

Na rozdiel od S. cerevisiae, ktoré sú fakultatívne anaeróby, kvasinky Zygosaccharomyces fermentati, Cendida parapsilosis a Schizosaccharomyces pombe sú striktné aeróby, neschopné rásť v neprítomnosti molekulového kyslíka. U týchto kvasiniek kyselina bongkreková inhibovala aeróbne rastové výťažky na glukóze ako substráte na úroveň inhibície s antimycínom A /tab. 1/.

Tab. 1. Kvasenie, dýchanie a rast striktne aeróbnych petit-negatívnych kvasiniek.

Charakteristika	Zygosaccharomyces fermentati	Candida parapsilosis	Schizosaccharomyces pombe
Anaeróbny rast	-	-	-
Aeróbny rast			
Rastový výťažok /10^6 buniek/ml/ v stacionárnej fáze na 0,5 % glukóze v prítomnosti nižšie uvedených inhibítorov:			
Bez inhibítora	190	400	36
Antimycín A /2 /ug/ml/	46	240	28
Kyselina bongkreková /8,8 /uM/	48	130	16
Rast na 2% etanole alebo glycerole	+	+	-

/pokračovanie tab. 1/

Kvasenie /µl/hod/mg sušiny/			
$Q^{N_2}_{CO_2}$	66	46	402
Dýchanie /µl/hod/mg sušiny/			
Q_{O_2}	66	138	10
Q_{CO_2}	102	202	404
Inhibícia /%/ s :			
Antimycínom A /2 µg/ml/	100	27	100
Kyselinou bongkrekovou /18 µM/	29	82	71

+ znamená rastie; - znamená nerastie

Tieto výsledky ukazujú, že u vyššie uvedených kvasiniek môže glykolýza poskytovať dostatok energie pre aeróbny rast. Neschopnosť rastu za anaeróbnych podmienok nemožno teda vysvetliť nedostatočnou kapacitou glykolýzy ani nejakou komplexnou nutričnou požiadavkou, keďže obohatenie rastového média s kvasničným extraktom, sterolmi alebo nenasýtenými mastnými kyselinami nezmenilo rastovú charakteristiku.

Podobne ako striktne aeróbne kvasinky tak aj mnohé vláknité huby boli neschopné rásť v neprítomnosti kyslíka. V tomto prípade však už inhibícia oxidatívnej fosforylácie alebo samotnej tranzlokácie adenínových nukleotidov cez mitochondriálnu membránu s kyselinou bongkrekovou mala za následok úplnú inhibiciu aeróbneho rastu testovaných plesní na glukóze ako substráte /tab. 2/. Tab. 2. Priemerné priemery inhibičných zón kyseliny bongkrekovej /12,5 µg/ na povrchu pevného semisyntetického média obsahujúceho spóry plesní /10^6/ml/ po dvoch týždňoch inkubácie pri 30° C.

Pleseň	Priemer zóny inhibície /mm/
Aspergillus niger	25
Penicillium italicum	40
Rhizopus nigricans	30
Mucor mucedo	35
Botrytis cinerea	25
Chaetomium globosum	20
Paecilomyces varioti	22

Z týchto výsledkov vyplýva, že väčšina vláknitých húb pre svoj rast nutne využíva adenozíntrifosfát syntetizovaný v mitochondriách. Na rozdiel od striktne aeróbnych kvasiniek glykolýza v bunkách väčšiny plesní nie je schopná vytvoriť dostatočne vysoký fosforylačný potenciál v cytoplazme, v dôsledku čoho sa rast plesní za vyššie uvedených podmienok zastaví.

U kvasiniek S. cerevisiae je rýchlosť spontánnej tvorby respiračne deficitných mutantov menšia ako 1%. Kyselina bongkreková ani samotné inhibítory dýchania nezvyšovali tvorbu mutantov u buniek rastúcich aeróbne na glukóze ako substráte. Avšak keď kyselina bongkreková bola pridaná do rastového média spolu s inhibítormi dýchania, s antimycínom A alebo s kyanidom, došlo k hromadnej tvorbe respiračne deficitných buniek.

Obr. 3 udáva časovú závislosť rastového výťažku a tvorby respiračne deficitných mutantov kvasiniek S. cerevisiae, kde na ose x t je čas v hodinách inkubácie a na osiach y z je počet buniek v 1 ml rastového média a f je percento respiračne deficitných buniek medzi nimi. V priebehu tohto typického experimentu bunky rástli aeróbne v médiu obsahujúcom 2 % glukózu z počiatočnej koncentrácie 10^6 buniek/ml. 1-s 22 /uM kyselinou bongkrekovou; 2-s 22 /uM kyselinou bongkrekovou a s 2 /ug antimycínu A/ml. Podobné krivky sa získali ak antimycín A bol nahradený s 1 mM KCN.

Respiračne deficitné mutanty sa tvorili zvýšenou rýchlosťou aj keď kyselina bongkreková bola pridaná k anaeróbne rastúcim bunkám S. cerevisiae alebo k aeróbne restúcim bunkám cytochróm a deficitného mutanta kvasiniek.

Tvorba mutantov si vyžadovala aktívny rast buniek. Respiračne deficitné bunky nevznikali ak rast bol inhibovaný s cykloheximidom alebo ak bunky boli suspendované v pufre a inkubované s oboma inhibítormi po dobu 50 hodín.

Nakoľko glykolýza je jediným zdrojom adenozíntrifosfátu u respiračne deficitných mutantov kvasiniek dalo by sa očakávať, že rastové výťažky mutanta nebudú ovplyvnené prítomnosťou kyseliny bongkrekovej. Zistilo sa však, že respiračne deficitné mutanty neboli schopné rásť na glukóze

v prítomnosti kyseliny bongkrekovej /4,4 až 44,0 uM/ viac ako tri generácie. Bunky aj keď neboli schopné sa deliť predsa neboli mrtvé: nefarbili sa s metylénovou modrou, kvasili glukózu normálnou rýchlosťou a obnovili rast po premytí a prenose do rastového média neobsahujúceho kyselinu bongkrekovú.

Z takýchto buniek boli mitochondrie izolované v rovnakých výťažkoch ako z kontrolných buniek rastúcich v neprítomnosti inhibítora a mali adenozíntrifosfatázovú aktivitu i cytochróm c ako kontrolné mitochondrie.

Rast mutantov v médiu obsahujúcom kyselinu bongkrekovú nebolo možné obnoviť pridaním niektorých nízkomolekulových zlúčenín ako amínokyselín a nukleotidov, alebo obohatením rastového média s kvasničným extraktom a kazeinovým hydrolyzátom.

Neschopnosť petite mutantov S. cerevisiae rásť viac než 3-4 generácie

ak adenozíntrifosfát nie je kontinuálne prítomný vo vnútri mitochondrií dalo možnosť predpokladať, že petit negatívne kvasinky, ktoré nie sú schopné tvoriť životaschopné cytoplazmatické respiračne deficitné mutanty, sa rovnako prestanú deliť v prítomnosti kyseliny bongkrekovej a inhibítora dýchania - antimycínu A. Experimenty tento predpoklad potvrdili: kvasinka Schizosaccharomyces pombe mohla rásť na glukóze v prítomnosti oboch inhibítorov iba 3-4 generácie a potom sa jej rast úplne zastavil. Kvasinky Zagosaccharomyces fermentati a Candida parapsilosis v priebehu 48 hodín vytvorili len 3-4 generácie, i keď rast pokračoval s extrémne nízkou rastovou rýchlosťou, takže po ďalších 48 hodinách dodatočne ešte dve generácie sa vytvorili. Na druhej strane rast kvasinky Schizosaccharomyces versatilis bol úplne inhibovaný už prítomnosťou samotnej kyseliny bongkrekovej. Táto kvasinka však neobsahovala cytochrómy a, b, c, nedýchala, rástla aeróbne i anaeróbne na glukóze ako substráte a mala aktivitu mitochondriálnej adenozíntrifosfatázy inhibovateľnú s oligomycínom.

Závery plynúce z experimentov:

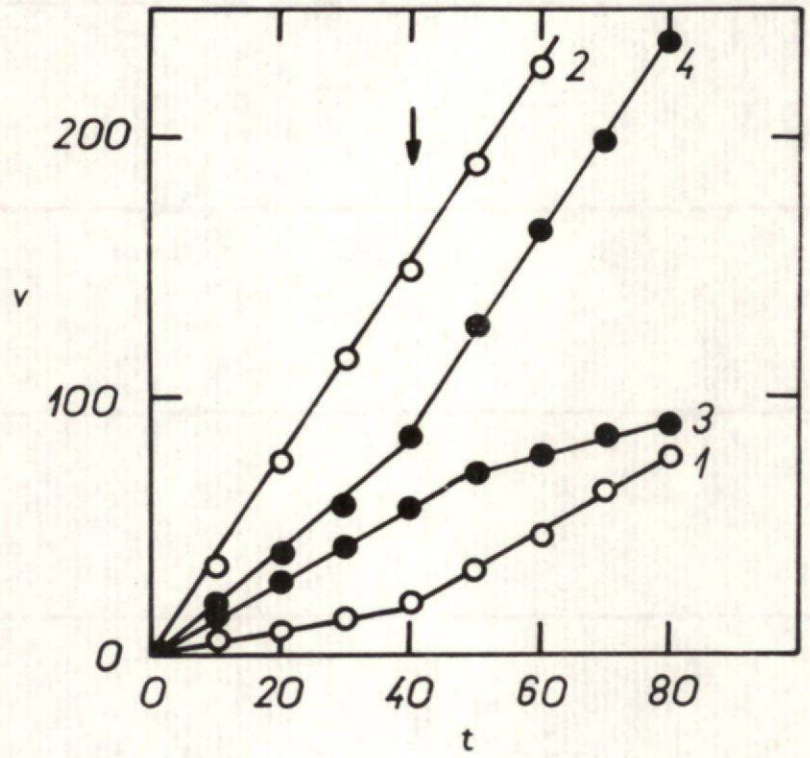
1/ Inhibícia výmeny adenínových nukleotidov cez mitochondriálnu membránu v aeróbne rastúcich bunkách S. cerevisiae nezabráni tvorbe nových kompletných mitochondrií. Biogenéza mitochondrií je podmienená aktivitami intramitochondriálneho a extramitochondriálneho proteosyntetického systému, využívajúc adenozíntrifosfát tvorený v mitochondriách alebo cytosole. Spojenie medzi týmito dvomi energetickými fondami zrejme nie je potrebné. Cytosolický adenozíntrifosfát môže kryť celkovú energetickú požiadavku potrebnú pre genézu mitochondrií avšak v tomto prípade tranzlokačný systém musí byť aspoň čiastočne funkčný aby umožnil využiteľnosť cytosolického adenozíntrifosfátu vo vnútri mitochondrií. Znížená tvorba cytochrómu a v bunkách rastúcich aeróbne v prítomnosti kyseliny bôngkrekovej môže byť vysvetlená zvýšenou katabolickou represiou, ktorá je spojená s inhibíciou Pasteurovho efektu.

2/ Kontinuálna prítomnosť adenozíntrifosfátu vo vnútri mitochondrií je nutná pre normálnu replikáciu mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny v rastúcich bunkách S. cerevisiae. Samotný adenozíntrifosfát môže byť poskytovaný alebo oxidatívnou fosforyláciou alebo glykolýzou cestou mitochondriálneho translokačného systému. Keď u kvasiniek S. cerevisiae adenozíntrifosfát nie je dodávaný do mitochondrií ani jednou z týchto ciest, mitochondriálna dezoxyribonukleová kyselina sa môže prestať replikovať alebo sa replikuje zmeneným spôsobom, čo má za následok premenu buniek na respiračne deficitné mutanty.

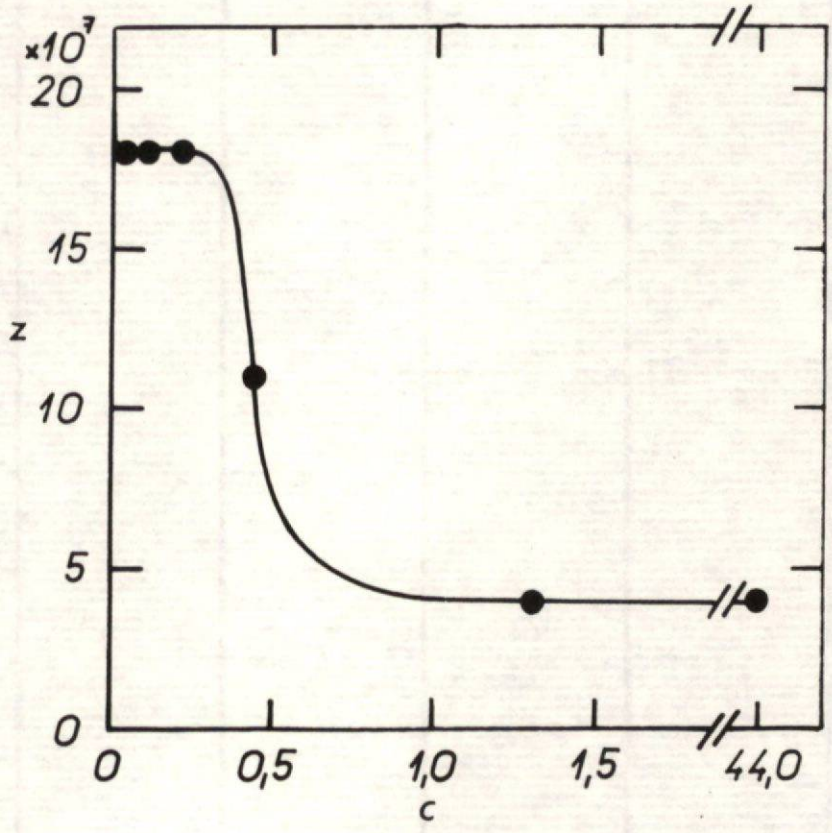
3/ Ak celková energetická požiadavka aeróbneho rastu nemôže byť krytá glykolyticky tvoreným adenozíntrifosfátom potom pre rast eukaryotických buniek časť intramitochondriálneh tvoreného adenozíntrifosfátu musí byť nutne využiteľná v cytosole. Takto väčšina vláknitých húb a pravdepodobne i živočíšnych buniek sa prestane deliť za podmienok keď mitochondriálny

tranzlokačný systém pre adenínové nukleotidy sa stane nefunkčný.
4/ Eukaryotické bunky sa nemôžu deliť keď adenozíntrifosfát nie je kontinuálne prítomný vo vnútri mitochondrií i za podmienok keď celková energetická požiadavka môže byť krytá glykolyticky tvoreným adenozíntrifosfátom. Zdá sa, že potreba intramitochondriálneho adenozíntrifosfátu nemôže byť jednoducho vysvetlená s jej potrebou pre syntézu niektorej nízkomolekulovej zlúčeniny v mitochondriách. Adenozíntrifosfát môže byť vyžadovaný pre syntézu bunkovej zložky, ktorej zriedenie v priebehu troch bunkových generácií dáva bunke možnosť prežívať ale nie deliť sa. Takto bunkové delenie môže závisieť na komponente tvorenej a pravdepodobne i lokalizovanej vo vnútri mitochondrií.

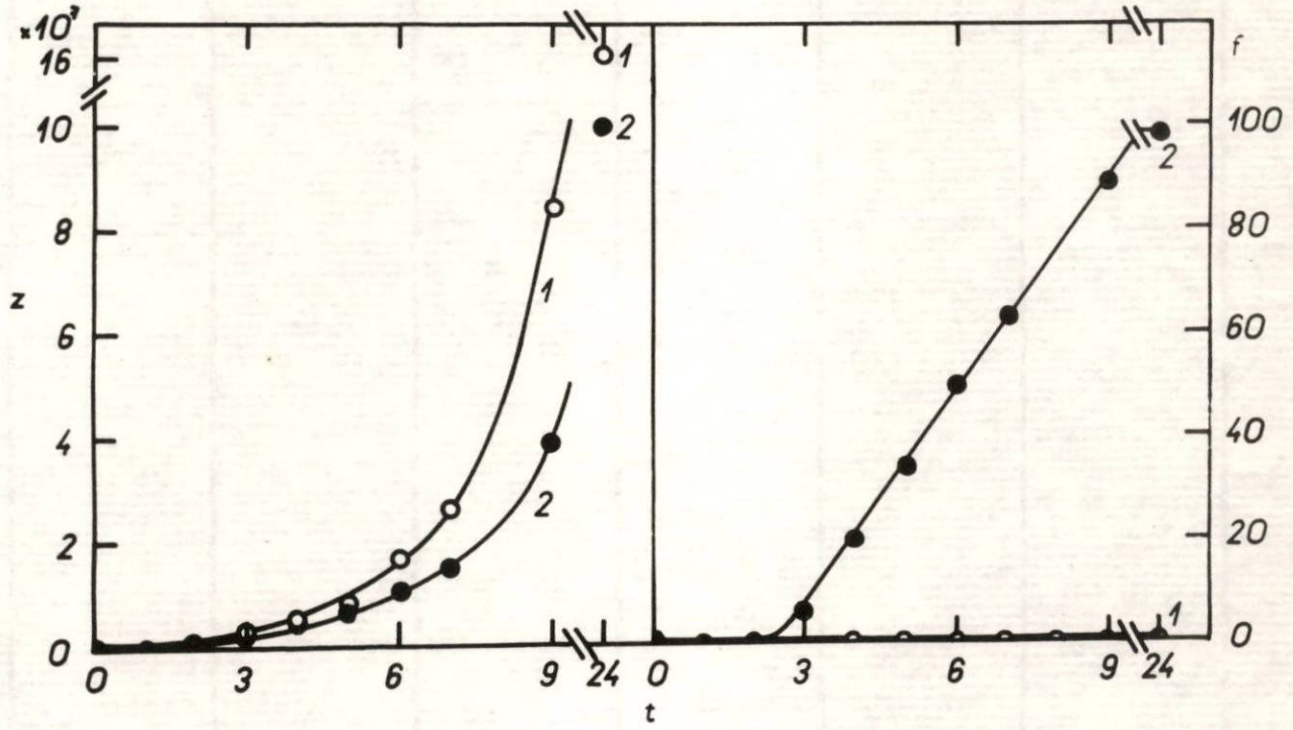
Predmet predloženého objavu sa stal v základnom výskume podkladom pre ďalšie experimentálne práce zamerané hlavne na štúdium regulačných mechanizmov delenia eukaryotických buniek s cieľom využiť tieto poznatky v terapii zhubných nádorov a v boji proti poľnohospodárskym a potravinárskym škodcom. Predložený objav odhaľujúci vlastnosti a zákonitosti materiálneho sveta prispel aj k rozvoju aplikovaného výskumu. Poznatky vyplývajúce z tohto objavu našli svoju transformáciu vo vynáleze /Autorské osvedčenie č. 159 807/ zameranom na prípravu a aplikáciu biocídnych látok v hubení škodcov.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3