Wpływ 8-azaadeniny na biosyntezę niektórych związków fosforowych w grzybni *Neurospora crassa*

*Influence of 8-azaadenine on biosynthesis of some phosphorus compounds
in mycelium of Neurospora crassa*

HENRYK URBANEK

Już około dziesięć lat temu zaobserwowano, że 8-azaadenina hamuje wzrost mikroorganizmów (Smith, Matthews 1957). Dotąd jednak nic nie wiadomo o mechanizmie jej działania. Stwierdzono jedynie, że adenina znosi efekt wywierany przez azaadeninę na ustroje. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że azaadenina działa antagonistycznie w stosunku do adeniny (Hirono, Redei 1966). Faktem ogólnie znanym jest, że nukleotydy adenilowe spełniają centralną funkcję w procesach pobierania nieorganicznego fosforu przez żywą komórkę i przenoszenia go na inne połączenia. Stąd też wydaje się, że aktywność biologiczna azaadeniny winna być związana przede wszystkim z ujemnym jej wpływem na syntezę związków fosforowych.

W niniejszej pracy przebadano wpływ 8-azaadeniny na zawartość różnych związków fosforowych oraz na włączanie się ^{32}P w te związki u grzybni *Neurospora crassa*.

MATERIAŁ I METODY

Kulturę dzikiego szczepu grzyba *N. crassa* hodowano w kolbach na pożywce płynnej według Beadle'a i Tatum'a (1945) metodą wglębną na wytrząsarkach o szybkości obrotów 100/min., w 25°C. Każdą kolbę zakażano jednakową ilością spor. Po 12 godzinach wprowadzano do części kolb azaadeninę w ilości 50 $\mu\text{g/ml}$ kultury i kontynuowano hodowlę w ciągu następnych 6 godzin. Natychmiast po wyrośnięciu grzybni włączano w nią ^{32}P . W tym celu odpowiednią ilość kultury zawierającą 18g świeżej masy grzybni doprowadzano do objętości 600 ml pożywką zawierającą radioaktywny fosfor w postaci $\text{KH}_2\text{P}^{32}\text{O}_4(2\text{mCu})$ i inkubowano w ciągu 10 minut w 25°C przy stałym mieszaniu. Dla zahamowania włączania się ^{32}P wprowadzano do mieszaniny inkubacyjnej 5 objętości ochłodzonej do 0°C pożywki nie zawierającej fosforu. Biomassę szybko odsączano i przemywano ją 2 litrami tejże zimnej pożywki aż do całkowitego usunięcia niewłączonego izotopu. Następnie grzybnię zamrażano płynnym azotem i przechowywano w -70°C .

Związki fosforowe rozpuszczalne w kwasach ekstrahowano z grzybni za pomocą 0,5N HClO_4 o temperaturze 0° do 4°C w ciągu 90 minut. Frakcję nukleotydów i ich pochodnych adsorbowano na węglu aktywowanym firmy „Karboraftin”. Z węgla eluowano ją za pomocą 50% etanolu w 0,3% amoniaku. Po usunięciu związków nukleotydowych ekstrakt frakcjonowano za pomocą soli baru i etanolu przy różnych pH (Le Page 1949; Krickij i współpr. 1965). Otrzymano: a) frakcję wytrącają-

Ryc. 1. Wpływ azaadeniny na wzrost grzybni *N. crassa*

Influence of azaadenine on the growth of the mycelium of *N. crassa*.

a — świeża masa grzybni przed dodaniem azaadeniny (fresh matter of mycelium before azaadenine added), *b* — świeża masa grzybni kontrolnej (fresh matter of control mycelium), *c* — świeża masa grzybni z azaadeniną (fresh matter of mycelium with azaadenine)

*a*₁ — sucha masa grzybni przed dodaniem azaadeniny (dry matter of mycelium before azaadenine added), *b*₁ — sucha masa grzybni kontrolnej (dry matter of control mycelium), *c*₁ — sucha masa grzybni *a* z azaadeniną (dry matter of mycelium with azaadenine).

cą się barem przy pH 4,5, która zawiera rozpuszczalne w kwasach polifosforany, b) frakcję wytrącającą się barem przy pH 8,2 — zawierającą ortofosforany, c) frakcję wytrącającą się barem przy pH 8,2 w obecności 80% etanolu — są to głównie fosforany cukrów.

Pozostałość tkankową po usunięciu fosfolipidów przez kilkakrotne przemywanie grzybni etanolem i mieszaniem etanolowo-eterową (3 : 1) ekstrahowano dwukrotnie (odpowiednio w ciągu 40 i 20 minut) za pomocą 0,5N HClO_4 w 90°C . Otrzymany ekstrakt zawierał kwasy nukleinowe oraz nierozpuszczalne w kwasach polifosforany. Obecność polifosforanów wykazano za pomocą chromatografii bibułowej produktów częściowej hydrolizy według Thilo i Wicker (1957), a za miarę ich zawartości przyjęto ilość fosforu labilnego nieadsorbującego się na węglu aktywowanym.

Frakcję nukleotydową po wyeluowaniu z węgla rozdzielano za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując Dowex 1×10 200—400 mesh w formie mrówczanowej według metody Hurlberta i współpr. (1954). Na kolumnę o wymiarach 1×10 cm nanoszono roztwór nukleotydów w ilości 500 jednostek OD przy 260 mμ (po uprzed-

nim zagęszczeniu i doprowadzeniu pH do 7,5). Nukleotydy eluowano z żywicy wzrastającym gradientem stężeń kwasu mrówkowego i mrówczanu amonu (stężenie układów użytych do elucji podano w objaśnieniach do rysunku 1). Szybkość wycieku przy absorpcji i elucji wynosiła 1 ml/1 min. Zbierano za pomocą kolektora frakcji do próbek po 5 ml. Mierzono ekstynkcję przy 260 m μ i radioaktywność każdej próbki i na podstawie otrzymanych danych wykreślano profile chromatograficzne. Otrzymane szczyty identyfikowano na podstawie: 1) położenia na profilu chromatograficznym, 2) oznaczenia przy pH 2, 7 i 12 stosunków pochłaniania przy długościach fali 250/260, 280/260, 290/260, 3) zawartości fosforu labilnego i całkowitego, 4) zawartości rybozy, 5) chromatografii bibułowej przed i po kwaśnej hydrolizie. Dla identyfikacji poszczególne frakcje odpowiadające danym szczytom liofilizowano. Do chromatografii bibułowej stosowano układy rozpuszczalników podane w poprzedniej pracy (Urbanek 1957), a mianowicie: 1. izopropanol — woda — amoniak (70—30—0,35), 2. 1% siarczan amonu — izopropanol (5—10), 3. etanol — 1 M octan amonu (7—3), 4. izopropanol — HCl — woda (65 — 16,7 do 100 woda), 5. butanol — kwas octowy — woda (63 — 10 — 27). Zawartość nukleotydów obliczano na podstawie pomiaru ekstynkcji przy 260 m μ i stosowania odpowiednich współczynników molowych.

Fosfor oznaczano metodą Berenbluma i Chaina w modyfikacji Weil-Malhelbe'a i Greena (1951), a rybozę metodą Mejbaum (1939). Fosfor oznaczany jako ortofosforan po 10 minutowej hydrolizie w 1 N HCl przy 100°C przyjmowano za P labilny, a P stabilny obliczano z różnicy między P całkowitym a ortofosforanem i P labilnym. Radioaktywność określano za pomocą licznika Geigera — Müllera.

WYNIKI I DYSKUSJA

Ustalono, że azaadenina jest silnym inhibitorem wzrostu grzybni *N. crassa*. Związek ten wprowadzano w ilości 50 μ g/l do 12-godzinnej kultury. Po 6 godzinach hodowli kultury w obecności azaadeniny wzrost zarówno świeżej, jak i suchej masy grzybni był około dwukrotnie niższy niż grzybni kontrolnej (ryc. 1).

Dane charakteryzujące zawartość oraz radioaktywność właściwą różnych frakcji fosforu w badanych grzybniach przedstawione są w tabeli 1. Po 10-minutowej ekspozycji 32 P włączał się we wszystkie otrzymywane frakcje, jednak największą radioaktywnością właściwą odznaczał się labilny fosfor nukleotydowy, a następnie labilny fosfor frakcji rozpuszczalnej w kwasach i fosfor ortofosforanów. Azaadenina nie wywierała wpływu na zawartość fosforu nieorganicznego i tylko nieznacznie obniżała jego radioaktywność właściwą. W dużym stopniu natomiast obniżała radioaktywność właściwą fosforu we frakcji rozpuszczalnej w kwasach. Zarówno zawartość, jak i radioaktywność właściwa labilnego fosforu nukleotydów była redukowana przez azaadeninę prawie do połowy. W mniejszym stopniu ulegały zmianom omawiane wartości charakteryzujące fosfor stabilny nukleotydów oraz frakcję fosforową wytrącającą się solami baru przy pH 8,2 w obecności 80% etanolu (fos-

Ryc. 2. Chromatogram wolnych nukleotydów grzybnicy *N. crassa*

Elution curve of free nucleotides of mycelium of *N. crassa*

Szczyty (peaks): 1-x, 2-CMP i NAD, 3-AMP, 4-GMP, 5-UMP, 6-x₁, 7-ADP, 8-UDPAG i UDPG, 9-ATP, 10-GTP, 11-UTP. Stężenie użytych eluentów (concentration of eluents used): H₂O → 0,1N HCOOH → 0,2N HCOOH → 1N HCOOH → 2N HCOOH → 4N HCOOH → 4N HCOOH + 0,26N HCOONH₄ → 4N HCOOH + 0,53N HCOONH₄ → 4N HCOOH + 0,8N HCOONH₄. Linia ciągła (solid line) — ekstynkcja (extinction); linia kreskowana (broken line) — radioaktywność w imp/min oraz stężenie HCOOH i HCOONH₄ (radioactivity in imp/min and concentration of HCOOH and HCOONH₄).

forany cukrów). Ponadto w grzybnicy hodowanej w obecności azaadeniny zredukowana została zawartość kwasów nukleinowych o około 30%, a ich radioaktywność o ponad 50% (fosfor stabilny frakcji 6).

Odwrotnie, azaadenina znacznie zwiększyła zawartość i radioaktywność właściwą nieorganicznych polifosforanów. Należy zwrócić uwagę na silniejszy wzrost biosyntezy polifosforanów nierozpuszczalnych w kwasach (fosfor labilny frakcji 6) niż polifosforanów rozpuszczalnych (frakcja 3). Te ostatnie są prawdopodobnie produktami degradacji wysokocząsteczkowych polifosforanów nierozpuszczalnych w kwasach, charakteryzujących się dużą aktywnością biologiczną (Zajcewa i współpr. 1959 i 1960; Kułajew i współpr. 1960). O gromadzeniu się nieorganicznych polifosforanów w czasie hamowania wzrostu organizmów oraz o odwrotnej zależności między ich biosyntezą a biosyntezą kwasów nukleinowych donosiło już wielu autorów (Kułajew, Biełozierskij 1962; Harold 1963).

Rozdzielając chromatograficznie frakcję nukleotydową (profil rozdziału nukleotydów grzybnicy kontrolnej *N. crassa* przedstawia rycina 2) oznaczono CMP, AMP, GMP, UMP, ADP, UDPAG+UDPG, ATP, GTP i UTP. Szczyty 1 i 6 nie zostały zidentyfikowane. W skład szczytu 2 obok CMP prawdopodobnie wchodzi także NAD. Zwraca uwagę wyjątkowo duży szczyt 8 zidentyfikowany jako UDP-N-acetyloglukozamina (UDPAG) i UDP-glukoza (UDPG). Zawartość UDPAG i UDPG przewyższa kilkakrotnie zawartość pozostałych połączeń nukleotydowych. Wysoki poziom w komórkach cukrowych pochodnych urydyno-dwufosforanu stoi w związku

Tabela 1 — Table 1

Zawartość i radioaktywność właściwa różnych frakcji fosforu grzybni *N. crassa* hodowanej w normalnych warunkach i w obecności azaadeniny

The content and the specific radioactivity of various P-fractions of mycelium of *N. crassa* cultured in the normal medium and in the presence of azaadenine

Frakcja Fraction	forma P P in the form	kontrola control		azaadenina azaadenine			
		P*	Rw**	P*	% w stosunku do kontroli % as related to control	Rw**	% w stosunku do kontroli % as related to control
Ekstrakt 0,5 N HClO ₄ , 0°C	orto	3633	174	3785	104	150	86
Extract 0,5 N HClO ₄ , 0°C	Ortho						
	labilny	578	202	639	111	115	57
	labile						
	stabilny	2422	34	1938	80	15	44
	stabile						
Nukleotydy adsorbowane na węglu	labilny	119	400	61	51	214	53
Nucleotides adsorbed on charcoal	labile						
	stabilny	734	29	558	76	19	66
	stabile						
Fosforany wytrącane Ba ⁺⁺ , pH 4,5	całkowity	850	10	1042	123	12	120
Phosphates precipitated by Ba ⁺⁺ , pH 4,5	total						
Fosforany wytrącane Ba ⁺⁺ , pH 8,2	całkowity	2817	146	2710	96	131	90
Phosphates precipitated by Ba ⁺⁺ , pH 8,2	total						
Fosforany wytrącane Ba ⁺⁺ , pH 8,2 + 80% etanol	całkowity	197	21	153	78	13	62
Phosphates precipitated by Ba ⁺⁺ , pH 8,2 + 80% ethanol	total						
Ekstrakt 0,5 N HClO ₄ , 90°C	labilny	1995	13	2873	144	22	169
Extract 0,5 N HClO ₄ , 90°C	labile						
	stabilny	4326	15	3087	71	7	47
	stabile						

* Zawartość P w µg/g suchej masy
P content in µg/g of dry matter

** Radioaktywność właściwa w imp/min/µg P
Specific radioactivity in imp/min/µg of P

Tabela 2 — Table 2

Zawartość wolnych nukleotydów w grzybni *N. crassa* (w $\mu\text{mol/g}$ suchej masy)

Content of free nucleotides of the mycelium of *N. crassa* (in $\mu\text{mol/g}$ of dry matter)

Nukleotyd Nucleotide	Kultura kontrolna Control culture	Kultura z azaadeniną Culture with azaadenine
AMP	0,34	0,19
ADP	0,21	0,12
ATP	0,39	0,15
CMP	0,08	0,08
GMP	0,05	0,04
GTP	0,10	0,08
UMP	0,19	0,17
UTP	0,06	0,07
UDPG+UDPAG	4,03	3,55

Tabela 3 — Table 3

Radioaktywność właściwa AMP, ADP i ATP (w $\text{imp/min}/\mu\text{g P}$)

The specific radioactivity of AMP, ADP and ATP (in $\text{imp/min}/\mu\text{g of P}$)

Nukleotyd Nucleotide	Kultura kontrolna Control culture	Kultura z azaadeniną Culture with azaadenine
AMP	47	32
ADP	136	103
ATP	410	196

z intensywną biosyntezą węglowodanów, w której biorą one czynny udział (Leloir 1964). UDPAG na przykład, jest prekursorem w biosyntezie chityny (Glaser, Brown 1957).

Włączony do frakcji nukleotydowej ^{32}P w czasie 10-minutowej ekspozycji znajduje się tylko w cząsteczkach nukleotydów adenilowych. Do ATP włączało się ^{32}P wielokrotnie więcej niż do ADP, a z kolei do ADP kilkakrotnie więcej niż do AMP (ryc. 2, tabela 3).

Profile otrzymane z rozdziału chromatograficznego nukleotydów grzybni kontrolnej i grzybni hodowanej w obecności azaadeniny różniły się tylko wielkością niektórych szczytów, natomiast ich ilość i rozmieszczenie było podobne. Wykazano, że azaadenina hamuje głównie syntezę nukleotydów adenilowych. Redukuje ona znacznie zarówno zawartość AMP, ADP i ATP, jak i włączanie się do tych związków ^{32}P (tabela 2 i 3, ryc. 3). Najsilniej jest hamowana synteza ATP. Zmniejszona radioak-

tywność właściwa AMP, ADP i szczególnie widoczna w przypadku ATP sugeruje, że azaadenina blokuje reakcje enzymatyczne odpowiedzialne za fosforylację nukleotydów adenilowych. Nie stwierdzono obecności nukleotydów azaadeniny w badanym materiale.

Nasilenie syntezy nieorganicznych polifosforanów w warunkach zahamowania fosforylacji ADP do ATP wskazuje, że te polimery fosforowe mogą powstawać

Ryc. 3. Zawartość i radioaktywność właściwa AMP, ADP i ATP grzybni z azaadeniną w porównaniu z kontrolą wyrażona w %

Content and specific radioactivity of AMP, ADP and ATP of mycelium with azaadenine as compared with control expressed in %.

także bez udziału ATP. Biorąc pod uwagę brak wyraźnego efektu azaadeniny na radioaktywność frakcji nieorganicznego fosforu przy silnym zmniejszeniu radioaktywności właściwej nukleotydów adenilowych wydaje się, że ortofosforan może przedostawać się do komórek badanego grzyba niekoniecznie, jak to sugerują niektórzy autorzy (Borst 1962; Jackson i współpr. 1962) za pośrednictwem tych nukleotydów.

Azaadenina wywołuje więc poważne zmiany w metabolizmie fosforu nie tylko u specyficznego szczepu *N. crassa*, niezdolnego do syntezy adeniny (Kułajew, Urbanek 1966), ale i u dzikiego szczepu tego grzyba. Badanie metabolizmu w komórkach poddanych działaniu azaadeniny może dostarczyć danych o mechanizmie fosforylacji niektórych związków.

Pani doc. dr W. Potapczykowej składam serdeczne podziękowanie za merytoryczne prze-dyskutowanie pracy.

STRESZCZENIE

Przebadano wpływ 8-azaadeniny na zawartość różnych związków fosforowych oraz na włączanie się ^{32}P w te związki w grzybni *Neurospora crassa*. Stwierdzono, że azaadenina silnie hamuje biosyntezę ATP i nieco słabiej ADP, AMP, kwasów nukleinowych i estrów fosforowych cukrów i pobudza biosyntezę nieorganicznych polifosforanów. Nie wykazano wyraźnego wpływu azaadeniny na pobieranie z pożywki fosforu nieorganicznego przez komórki grzyba.

SUMMARY

This paper is concerned with the influence of 8-azaadenine on the content of various phosphorus compounds and the incorporation of ^{32}P into the molecules of these compounds in the mycelium of *Neurospora crassa*. It was found that azaadenine strongly inhibits the biosynthesis of ATP; its effect on the biosynthesis of AMP, ADP, nucleic acids and sugar phosphates however was a little slighter. In reverse this antimetabolite stimulates the biosynthesis of inorganic polyphosphates. The influence of azaadenine on the absorption of ^{32}P by the cells of fungus was insignificant.

LITERATURA

1. Beadle G. W., Tatum E. L., 1945, Am. J. Bot. 32: 678.
2. Borst P., 1962, Biochem. Biophys. Acta 65: 403.
3. Glaser L., Brown D. H., 1957, Biochem. Biophys. Acta 23: 449.
4. Harold F. M., 1963, J. Bacteriol. 86: 216.
5. Hirono Y., Redei G. P., 1966, Planta 68: 88.
6. Hulbert R. B., Schmitz H., Brumm A. F., Porter V. R., 1954, J. Biol. Chem. 209: 23.
7. Jackson P. C., Hendricks F. B., Vasta B. M., 1962, Plant Physiol. 37: 8.
8. Krickij M. S., Kułajew I. S., Majorowa I. P., Fais D. A., Biełozierskij A. N., 1965, Biochimija 30: 778.
9. Kułajew I. S., Biełozierskij A. N., 1962, Izwestia AN. 4: 502.
10. Kułajew I. S., Krickij M. S., Biełozierskij A. N., 1960, Biochimija 25: 735.
11. Kułajew I. S., Urbanek H., 1966, Doklady AN SSSR 169: 958.
12. Leloir L. F., 1964, Biochem. J. 91: 1.
13. Mejbaum W., 1939, Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's 258: 117.
14. Page Le G. A., 1949, Manometric Techniques and Tissue Metabolism (wyd. Umbreit, Burris, Stauffer; Burgess Publishing Co., Minneapolis), str. 185.
15. Smith J. D., Matthews R. E. F., 1957, Biochem. J. 66: 323.
16. Thilo E., Wicker W., 1957, Z. anorg. allgem. Chem. 291: 164.
17. Urbanek H., 1967, Zeszyty Nauk. UŁ, ser. II (w druku).
18. Weil-Malherbe H., Green R. H., 1951, Biochem. J. 49: 286.
19. Zajcewa G. N., Biełozierskij A. N., Nawożiłowa L. P., 1959, Biochimija 24: 1054.
20. Zajcewa G. N., Biełozierskij A. N., Nawożiłowa L. P., 1960, Biochimija 25: 198.