

Г. Г. ГАУЗЕ, Л. Г. ФАТКУЛЛИНА

ПОИСКИ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ТРАНСПОРТОМ ЭЛЕКТРОНОВ И СИНТЕЗОМ ДНК В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 26 II 1971)

Исследования показали, что митохондрии, выделенные из различных источников, в том числе из животных клеток, содержат особую митохондриальную ДНК, способную к транскрипции и редупликации (¹⁻³). Молекулярные характеристики этой ДНК в настоящее время довольно хорошо изучены (⁴), однако механизм ее синтеза, а также регулярные системы, ответственные за контроль ее образования, до сих пор остаются неясными. Для решения этих вопросов удобна система изолированных митохондрий, поскольку суспензии выделенных из ткани и очищенных митохондрий обладают способностью включать меченые дезоксинуклеозидтрифосфаты в ДНК (^{5, 6}).

В митохондриях система синтеза ДНК находится в непосредственной близости от мощных окислительно-восстановительных систем клеточного дыхания, осуществляющих транспорт электронов по дыхательной цепи. В связи с этим обстоятельством было интересно выяснить, будет ли изменение состояния цепи транспорта электронов оказывать влияние на образование ДНК митохондрий. Настоящее сообщение и посвящено подходам к исследованию этого вопроса.

Опыты проводили на суспензиях изолированных митохондрий, выделенных из печени белых беспородных крыс весом 150—180 г по несколько модифицированному методу Шнейдера и Хогебума (⁷).

Синтез ДНК определяли по включению меченного тритием дезоксиаденозинтрифосфата (ДАТФ) в кислотонерастворимый продукт в реакционной смеси (⁶), содержавшей следующие компоненты в конечном объеме 1 мл (в μ мол): К-фосфатный буфер pH 7,5—5, хлорид калия 4, хлорид магния 7, АТФ 2, никотинамид 40, пируват натрия 7, 5, сукцинат натрия 7, 5, малат натрия 0,45, дезоксинуклеозидтрифосфаты (ДГТФ, ДЦТФ, ИТТФ) по 0,15, ДАТФ с удельной активностью 3,8 С/ммоль 1 μ С, АТФ 2 μ моля, суспензию митохондрий в 0,25 М сахарозе, содержащей 10^{-3} мол. ЭДТА и 10^{-3} мол. трис-буфера, 5—10 мг белка. После инкубации в течение 60 мин. при 37° инкубационные смеси фиксировали добавлением 5% трихлоруксусной кислоты, содержащей 1% нейтрализованный пирофосфат натрия, и промывали осадок три раза этим раствором путем центрифугирования. Затем к осадкам митохондрий добавляли 1 мл 5% ТХУ, не содержащей пирофосфата натрия, прогревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин., охлаждали и к суспензии добавляли 15 мл сцинтилляционного раствора Брэя (⁸). Осадок удаляли центрифугированием, а радиоактивность надосадочной жидкости определяли на сцинтилляционном счетчике.

При инкубации изолированных митохондрий в вышеописанной реакционной смеси наблюдается достоверно включение меченого предшественника в кислотонерастворимый продукт (табл. 1). Как следует из приведенных данных, включение протекает практически линейно на протяжении по крайней мере 1 часа, даже через 90 мин. инкубации наблюдается воз-

растание радиоактивности кислотонерастворимой фракции. Добавление к реакционной смеси избытка нерадиоактивного ДАТФ приводит к практически полному падению включения: это исключает возможность того, что включение обусловлено примесями, возникшими в результате радиоллиза ДАТФ-Н₃. Включение метки в изолированные митохондрии не подавляется действием ДНКазы. Это наблюдение, находящееся в соответствии с

Т а б л и ц а 1

Характеристика включения Н³-ДАТФ в изолированные митохондрии

№ опыта	Условия реакции	Включение, имп/мин.
1	Полная система без инкубации	153
	» » , инкубации 30 мин.	643
	» » » 60 мин.	1240
	» » » 90 мин.	1360
2	Без инкубации	60
	Полная система	726
	Полная система + ДНКазы 50 мкг/мл	689
	Полная система + нерадиоактивный ДАТФ 0,2 ммоля	47
	Полная, но вместо интактных митохондрий взяты озвученные (30 сек.)	218

П р и м е ч а н и е. Продолжительность инкубации в опыте № 2 составляла 60 мин.

опубликованным в литературе данными, является доказательством того, что включение не обусловлено примесями немитохондриального происхождения, а действительно происходит в пределах пространства, ограниченного внутренней митохондриальной мембраной.

Подтверждением последнего являются и результаты опытов по выделению митохондриальной ДНК и анализу ее ультрацентрифугированием в сахарозном градиенте. Эти данные будут представлены в отдельном сообщении.

В первой серии опытов стоял вопрос, зависит ли интенсивность синтеза ДНК в митохондриях от замены АТФ в инкубационной смеси на АДФ. Известно, что в присутствии высокого уровня АТФ транспорт электронов по цепи подавляется. В то же время добавление к митохондриям АДФ или АДФ и «гексокиназно-глюкозной ловушки» для выведения из реакционной смеси АТФ, образующегося в результате окислительного фосфорилирования, приводит к резкому усилению транспорта электронов по цепи.

Результаты опытов по изучению интенсивности синтеза ДНК при инкубации митохондрий в среде с АТФ и АДФ приведены в табл. 2. Из пред-

Т а б л и ц а 2

Влияние добавления акцептора АТФ на биосинтез ДНК в изолированных митохондриях

№ опыта	Условия реакции	Включение, имп/мин.
1	Без инкубации	60
	Полная система	719
	Полная без АТФ, + АДФ, + гексокиназа + глюкоза	700
2	Без инкубации	30
	Полная система	1005
	Полная без АТФ, + АДФ	1239
	Полная без АТФ, + АДФ, + глюкоза + гексокиназа	1104

ставленных результатов следует, что замена АТФ в реакционной смеси на АДФ в присутствии глюкозы и гексокиназы не приводит к достоверным изменениям уровня включения метки в ДНК. Таким образом, создается

впечатление, что синтез ДНК в митохондриях не зависит от того, функционирует ли цепь переноса электронов или же она заперта вследствие отсутствия акцептора фосфата.

Вторая серия опытов ставила задачу выяснить, будет ли синтез митохондриальной ДНК подавляться ингибиторами транспорта электронов, а также разобщающим агентом динитрофенолом и антибиотиком олигомицином, являющимся ингибитором окислительного фосфорилирования. Результаты опытов представлены в табл. 3. Как следует из приведенных данных, ингибиторы транспорта электронов оказывают различное действие на

Таблица 3

Влияние ингибиторов окислительных процессов на биосинтез ДНК в изолированных митохондриях, %

Ингибитор	Включение в ДНК	
	опыт № 1	опыт № 2
Без ингибитора	100 (398)	100 (1120)
Без инкубации	7,5	17
Антимицин а 2 мкг/мл	11	3
Олигомицин 2 мкг/мл	194	97
2,4-Динитрофенол 10^{-4} мол.	47	57
Азид натрия 10^{-3} мол.	108	98

Примечание. Цифры в скобках показывают включение в полной системе в имп/мин.

биосинтез ДНК в митохондриях. Азид натрия не оказывает подавляющего воздействия на образование митохондриальной ДНК.

В отличие от указанного ингибитора, антибиотик антимисин а, подавляющий перенос электронов на участке между цитохромами В и С₁ (⁶), оказывает сильное подавляющее действие и на включение меченого ДАТФ в ДНК мито-

хондрий. При добавлении антимисина к суспензии митохондрий в конечной концентрации 2 мкг/мл синтез ДНК уменьшается на 89—97%.

Олигомицин, являющийся ингибитором синтеза АТФ в митохондриях, не изменяет образование митохондриальной ДНК. В некоторых опытах мы даже наблюдали стимуляцию синтеза ДНК при действии олигомицина. Такое действие олигомицина показывает, что при использовании дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в качестве предшественников синтез ДНК оказывается энергетически независимым от АТФ, образующегося в результате митохондриального окислительного фосфорилирования.

Классический разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол оказывает заметное ингибирующее действие на синтез митохондриальной ДНК. Причины подавляющего эффекта, однако, установить довольно трудно, так как известно, что динитрофенол вызывает активацию митохондриальной АТФазы (¹⁰), и в настоящее время еще нельзя сказать, связано ли его действие с разрушением части субстратов для синтеза ДНК за счет активации АТФазы или же с какими-то иными механизмами.

Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что определенного рода воздействия на дыхательную цепь митохондрий приводят к заметным изменениям в интенсивности образования митохондриальной ДНК: антимисин а, подавляющий перенос электронов в районе пункта 11 сопряжения окисления и фосфорилирования, сильно ингибирует включение H³-ДАТФ в ДНК митохондрий, в то время как азид натрия, подавляющий транспорт электронов за счет ингибирования цитохромоксидазы, не вызывает заметного прекращения синтеза ДНК.

Механизм действия антимисина на синтез митохондриальной ДНК можно объяснить следующим образом. Если предположить, что ДНК митохондрий прикреплена к мембране в том участке, где расположен отрезок цепи переноса электронов, с которым взаимодействует антимисин, то по аналогии с бактериями допускается, что это место представляет собой точку редупликации митохондриальной ДНК за счет действия ДНК-полимеразы. Если такой гипотетический комплекс между митохондриальной

ДНК, ДНК-полимеразой и участком цепи переноса электронов является достаточно жестким, то изменение его конформации или ограничение свободы изменения конформации за счет взаимодействия с антимицином может приводить к структурному переходу во всем этом комплексе, вызывающему подавление работы ДНК-полимеразы или подавление транслокации ДНК относительно точки редупликации.

В то же время при действии ингибиторов на другие участки цепи переноса электронов жесткость системы оказывается недостаточной, чтобы вызвать такое изменение геометрии ДНК-синтезирующего комплекса, которое приведет к подавлению синтеза ДНК. Следует сказать, однако, что в настоящее время еще невозможно исключить некоторых иных объяснений действия ингибиторов транспорта электронов на биосинтез митохондриальной ДНК, таких как непосредственное подавление ДНК-полимеразы антимицином или подавление транспорта меченых нуклеотидов во внутреннее митохондриальное пространство.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. J. L. Luck, E. Reich, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **52**, 931 (1964).
² P. Borst, G. J. C. M. Ruttenberg, Biochim. et biophys. acta, **114**, 645 (1966).
³ E. Reich, D. J. L. Luck, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **55**, 1600 (1966). ⁴ P. Borst, E. F. J. Van Bruggen et al., Biochim. et biophys. acta, **149**, 156 (1967). ⁵ P. Parsons, M. V. Simpson, Science, **155**, 91 (1967). ⁶ E. Wintersberger, Biochem. Biophys. Res. Commun., **25**, 1 (1966). ⁷ W. C. Schneider, G. H. Hogeboom, Journ. Biol. Chem., **183**, 123 (1950). ⁸ G. A. Bray, Anal. Biochem., **1**, 279 (1960).
⁹ B. Chance, J. Biol. Chem., **233**, 1223 (1958). ¹⁰ E. C. Stater, In: Methods in Enzymology, **10**, 1967.