

УДК 576.311.347

БИОХИМИЯ

Г. Г. ГАУЗЕ, С. М. ДОЛГИЛЕВИЧ

НОВАЯ ФРАКЦИЯ БЫСТРОМЕТАЮЩЕЙСЯ ДНК ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком А. А. Баевым 12 IV 1972)

Обнаружение способности изолированных митохондрий включать меченые предшественники в митохондриальную ДНК (Мт-ДНК) открыло новый подход к изучению ее биосинтеза (¹⁻⁵).

В настоящей работе мы сообщаем наши данные о характеристике ДНК, синтезированной в изолированных митохондриях печени крысы. В ходе этих опытов нами была обнаружена новая фракция Мт-ДНК, содержащая ковалентно замкнутые молекулы, но отличающаяся по своим свойствам от Мт-ДНК I* (⁵), а также от Д-Мт-ДНК (⁶).

Опыты проводили на суспензиях изолированных митохондрий, которые метили инкубацией с H^3 -тимидином 30 мин. при 30° в реакционной среде (³). По окончании инкубации митохондрии лизировали добавлением додецилсульфата натрия (ДСН) в 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-ЭДТА, pH 7,5, инкубировали с проназой при 30° в течение 2 час., после чего обрабатывали по методу (⁷), добавляли бромистый этидий (БЭ) и ультрацентрифугировали в градиенте CsCl — БЭ по методу (⁸) 15–18 час. при 40 000 об/мин и 22–25°. Это позволяло получать хорошие выходы Мт-ДНК при минимальном механическом воздействии на лизаты.

Седиментограммы лизатов митохондрий в градиенте нейтрального CsCl, сахарозном градиенте и градиенте CsCl — БЭ представлены на рис. 1. В градиенте нейтрального CsCl (рис. 1а) меченая ДНК обнаруживает один симметричный пик с плотностью, соответствующей нативной ДНК митохондрий. Седиментация в сахарозном градиенте (рис. 1б) обнаруживает присутствие нескольких фракций. Большая часть радиоактивного материала седиментирует с коэффициентом 38S в виде гетерогенной зоны, меньшая, более гомогенная, фракция седиментирует с коэффициентом, равным 27S, и иногда имеется небольшой пик в области 9–10S. Когда в среду для включения добавляли панкреатическую ДНКазу (100 мкг/мл), изменений в седиментационном профиле обнаружено не было. Обработка освобожденных от ДСН лизатов митохондрий панкреатической РНКазой также не приводила к изменению седиментационного профиля, в то время как обработка панкреатической ДНКазой в высокой концентрации (50 мкг/мл) приводила к исчезновению меченых пиков с седиментограмм.

Седиментационный профиль меченой Мт-ДНК в градиенте CsCl — БЭ приведен на рис. 1в. В препарате присутствуют три основные зоны: тяжелая гомогенная с плотностью, соответствующей плотности ковалентно замкнутых колец (левый пик), промежуточная гетерогенная с плотностью меньшей, чем у предыдущей, и, наконец, легкая гомогенная фракция с плотностью, характерной для открытой циркулярной Мт-ДНК (правый пик). Специальные опыты показали, что разделение двух фракций Мт-ДНК — замкнутой и открытой кольцевой в использованных нами условиях является четким и наличие радиоактивности в межпиковом пространстве не может быть связано с неполнотой разрешения фракций. Более того, удельная активность материала в промежуточной области является наивысшей. На этом основании мы высказываем предположение,

что материал промежуточной плотности может представлять собой реплицирующиеся молекулы ДНК митохондрий.

Обработка препарата Мт-ДНК перед анализом в градиенте CsCl — БЭ панкреатической ДНКазой в низкой концентрации (10^{-3} мкг/мл) приводит к исчезновению меченого материала из плотной и промежуточной фракций и накоплению радиоактивности в легкой фракции градиента, соответствующей зоне открытых молекул, т. е. материал как тяжелой, так и промежуточной фракций содержит ковалентно замкнутые молекулы ДНК.

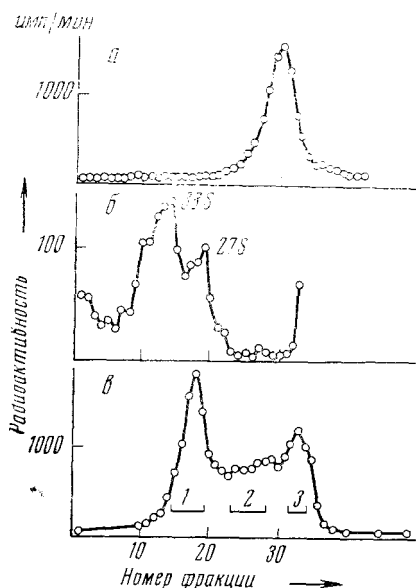


Рис. 1

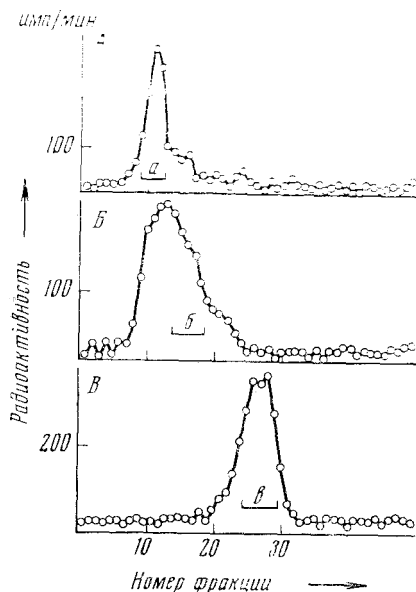


Рис. 2

Рис. 1. Седиментационные свойства новообразованной ДНК митохондрий печени крысы. Седиментограмма лизата митохондрий: *a* — в градиенте нейтрального CsCl, центрифугирование в течение 17 час. при 40 000 об/мин и 23° в роторе Ти-50 Спинко; *б* — в сахарозном градиенте, центрифугирование в течение 180 мин. при 50 000 об/мин в роторе SW-65 Спинко; *в* — в градиенте CsCl — БЭ, центрифугирование при 40 000 об/мин при 23° в роторе Ти-50 Спинко. Плотность левого пика на *в* соответствует плотности ковалентно замкнутой формы Мт-ДНК, плотность правого пика — открытой кольцевой форме. Дно слева

Рис. 2. Разделение трех фракций Мт-ДНК (*A*, *B*, *B*) из градиента CsCl — БЭ (рис. 1*в*). Пики *a*, *б*, *в* соответствуют зонам 1, 2, 3 рис. 1*в*. Зоны *a*, *б*, *в* были объединены и использованы для анализа. Дно слева

Молекулы Мт-ДНК будут располагаться в зоне промежуточной плотности, если они связывают больше БЭ по сравнению с ковалентно замкнутыми молекулами, но меньше по сравнению с молекулами, содержащими по крайней мере один разрыв. Они могут представлять собой цепные димеры, где одна из субмолекул является открытой, а другая замкнутой⁽⁹⁾, или же комплекс между ковалентно замкнутой молекулой и линейными фрагментами ДНК.

Для дальнейшей характеристики материала зоны 1, 2, 3 (рис. 1*в*) были объединены и подвергнуты рецентрифугированию в аналогичных градиентах CsCl — БЭ. Это приводит к разрешению трех фракций: тяжелой, промежуточной и легкой. Профили радиоактивности этих фракций приведены на рис. 2. Можно видеть, что фракция промежуточной плотности (рис. 2*Б*) обнаруживает гетерогенное распределение. Эта гетерогенность по плотности говорит в пользу того, что промежуточная фракция представляет собой комплекс ковалентно замкнутых молекул с варьирующими количествами линейных фрагментов.

Радиоактивный материал каждой из фракций был дополнительно охарактеризован центрифугированием в нейтральных градиентах CsCl и в сахарозных градиентах.

В градиентах нейтрального CsCl каждая из фракций обнаруживает симметричное одновершинное распределение, но пик промежуточной фракции располагается в несколько более тяжелой области, что может указывать на присутствие одноцепочечной ДНК.

На рис. 3 представлены данные по седиментационному анализу каждой из полученных фракций в нейтральных сахарозных градиентах, а также данные по влиянию кратковременного прогревания на их седиментационные характеристики. Можно видеть, что радиоактивный материал промежуточной фракции (рис. 3б) обнаруживает двухпиковое распределение, тяжелый пик является

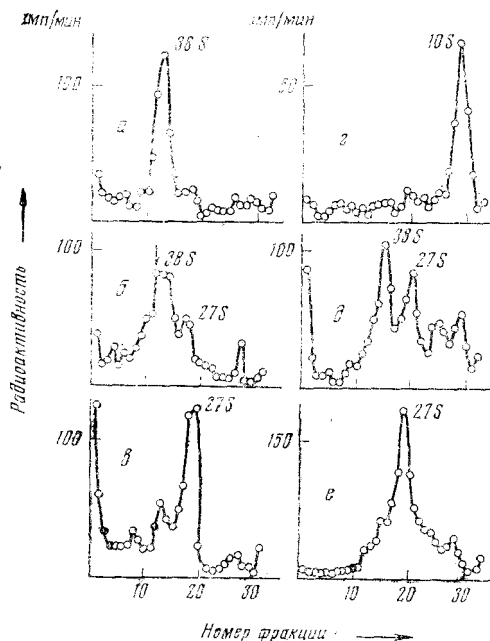


Рис. 3. Седиментационные свойства трех фракций из градиентов CsCl — БЭ. а, б, в — седиментограммы тяжелой, промежуточной и легкой фракций градиента CsCl — БЭ в нейтральной сахарозе. г, д, е — седиментограммы этих же фракций после прогрева при 90° в течение 30 сек. с последующим быстрым охлаждением. Центрифугирование при 36 000 об/мин в течение 180 мин. в роторе SW-39 ультрацентрифуги Спинко. Дно слева

гетерогенным и седиментирует в области между 29S и 37S, меньший компонент обладает седиментационным коэффициентом, равным 27S. Более тяжелый пик имеет плечо, соответствующее седиментационному коэффициенту 42S; этот седиментационный коэффициент характерен для цепных димеров, в которых одна из субмолекул является ковалентно замкнутой, а вторая открытой (⁹). Однако большая часть радиоактивности промежуточной фракции седиментирует медленнее, чем 42S, и, следовательно, основная часть этой фракции не является цепными димерами. Интересным является поведение материала этой фракции при кратковременном прогревании (рис. 3д): обработка в течение 30 сек. при 90° высвобождает часть радиоактивности в виде смеси молекул с седиментационными коэффициентами в области 10–20S, однако значительная часть меченого материала остается связанной с областью 38/27S. Пик при 37–38S становится после прогревания менее гетерогенным.

Поведение тяжелой фракции из градиента CsCl — БЭ при прогревании было иным. Непрогретый материал (рис. 3а) обнаруживал один пик с коэффициентом 38S, прогревание приводило к количественному отщеплению метки, которая седиментировала теперь с коэффициентом 9–10S (рис. 3г). Седиментограмма легкой фракции из градиента CsCl — БЭ приведена на рис. 3в; основной ее компонент имеет седиментационный коэффициент 27S, кратковременное прогревание не оказывало заметного влияния на его свойства за исключением того, что имело место появление небольшого пика фрагментов 9S (рис. 3е).

Результаты, полученные в работе, показывают, что инкубация изолированных митохондрий печени крысы с Н³-тимидином приводит к включению метки в три основные фракции.

Первая фракция, обладающая максимальной плотностью в градиентах CsCl — БЭ, седиментирует в нейтральной сахарозе с коэффициентом 38S и состоит из меченых фрагментов 9—10S, связанных с немечеными молекулами ковалентно замкнутой ДНК. Этот материал, вероятно, идентичен меченому компоненту Мт-ДНК I* (⁴, ⁵) и может представлять собой непосредственный продукт инициации молекул ДНК на сверхскрученной матрице.

Вторая фракция, гетерогенная по плотности, располагающаяся в области между пиками ковалентно замкнутых и открытых колец, представлена, вероятно, ковалентно замкнутыми молекулами, связанными с линейными тяжами ДНК. Гетерогенность в градиентах CsCl — БЭ позволяет предположить переменное отношение линейных частей к ковалентно замкнутым молекулам для этой фракции. Мы предполагаем, что она представляет собой популяцию реплицирующихся молекул митохондриальной ДНК. Недавно было показано, что митохондрии клеток культуры мыши содержат ковалентно замкнутые молекулы ДНК, обладающие «петлей смещения» (⁶). Процесс роста таких петель на ковалентно замкнутых матрицах может привести к появлению материала, сходного по своим свойствам с нашей промежуточной фракцией.

Необычным свойством этого материала является присутствие меченых молекул с седиментационным коэффициентом 38S даже после прогрева препаратов. Можно предположить, что процесс удлинения петель смещения связан с интенсивным обменом тяжами между матричной молекулой ДНК и растущей новосинтезирующей цепью. Возможно, что промежуточная фракция содержит также молекулы, завершившие репликацию.

Наши данные приводят к выводу, что редупликация значительной части молекул митохондриальной ДНК осуществляется на ковалентно замкнутых матрицах.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Parsons, M. V. Simpson, *Science*, **155**, 91 (1967). ² P. Borst, In: *Control of Organelle Development*, Cambridge, 1970, p. 201. ³ Г. Г. Гаузе, Л. Г. Фаткуллина и др., В сборн. *Генетические функции митохондрий и других оргanelл цитоплазмы*, Л., 1972, стр. 93. ⁴ J. Ter Schegget, P. Borst, *Biochim. et biophys. acta*, **246**, 239 (1971). ⁵ J. Ter Schegget, P. Borst, *ibid.*, **246**, 249 (1971). ⁶ H. Kasamatsu, D. L. Robberson, J. Vinograd, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2252 (1971). ⁷ B. Hudson, J. Vinograd, *Nature*, **221**, 332 (1969). ⁸ C. F. Brunk, V. Leich, *Biochim. et biophys. acta*, **179**, 136 (1969). ⁹ B. Hudson, D. A. Clayton, J. Vinograd, In: *Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biol.*, **33**, 435 (1968).