

В. Н. ИВАНОВ, Ю. Я. МАЗЕЛЬ,
член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС, Э. Е. ХАВКИН

ВКЛЮЧЕНИЕ C^{14} -ГЛИЦИНА В РАСТВОРИМЫЕ И МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ МИТОХОНДРИЙ В РАСТУЩИХ И ЗРЕЛЫХ КЛЕТКАХ КОРНЯ КУКУРУЗЫ

Усиления дыхания растущих клеток связано с формированием митохондрий. В митохондриогенезе участвуют две системы белкового синтеза: цитоплазматическая (чувствительная к циклогексимиду) и митохондриальная (чувствительная к хлорамфениколу), и ингибирование любой из них опосредованно влияет на работу другой (^{1, 2}). У высших растений исследования синтеза митохондриальных белков проводятся преимущественно *in vitro*, с изолированными митохондриями. Целью нашей работы было изучение скорости синтеза митохондриальных белков в растущих и зрелых клетках кончика корня у интактных проростков кукурузы.

Использовали фармацевтические препараты циклогексимида (актидиона) фирмы «Serva», ФРГ, и *D*-трео-хлорамфеникола (левомипетина) отечественного производства, удельная активность ($1-C^{14}$)-глицина составляла 30 мС/ммоль. Трехдневные проростки кукурузы (гибрид Буковинский-3) с корнями длиной 52 ± 3 мм помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой или раствором антибиотиков в специфически действующих концентрациях: циклогексимид (0,8 мкг/мл) или хлорамфеникол (50 мкг/мл). Растения прейнкубировали на среде, содержащей антибиотики, в течение 6 час. до введения метки. За это время все растягивающиеся клетки переходят в зону зрелых клеток, а новые клетки, пришедшие им на смену из меристемы, к моменту введения метки уже будут содержать циклогексимид или хлорамфеникол. Вводили C^{14} -глицин по 15 мС на чашку Петри (0,5 мС на 1 мл среды) и экспонировали еще 24 часа. Затем растения отмывали водой, раствором немеченого глицина, споласкивали раствором пенициллина и стрептомицина (по 20 мкг/мл каждого), и корни разделяли на 30-часовой прирост и базальную часть с более зрелыми митохондриями (30—100 час.).

Митохондрии выделяли по методу Икумы (³), для уменьшения неспецифической радиоактивности в среды для выделения и промывания добавляли немеченый глицин. Митохондрии разрушали в гипотонической среде, замораживали и после оттаивания разделяли на три фракции: 1 фракцию — белков, растворимых в 0,2 *M* KCl с 0,01 *M* фосфатным буфером pH 7,5 (три последовательных экстракции), 2 фракцию — мембранных белков, растворимых в 1% растворе тритона X-100 (две экстракции), и, наконец, 3 фракцию — мембранных белков, растворимых в 1 *N* NaOH. В 0,2 *M* KCl растворяются белки матрикса и межмембранных пространств, а также белки, непрочно связанные с мембранами; в 1% растворе тритона X-100 — большая часть липопротеидных комплексов мембран, и, наконец, наиболее труднорастворимые белки мембран солюбилизируются 1 *N* NaOH (⁴). Белки 1 и 3 фракции переосаждали в присутствии немеченого глицина и растворяли в 0,1 *N* NaOH. Образцы наносили на стеклянные планшетки площадью 3 см², высушивали, и радиоактивность бесконечно тонкого слоя измеряли на торцевом счетчике БФЛ-25 (около 1 мг/см²) с пересчетной установкой типа «Волна» при эффективности счета 3%. Содержание белка определяли по методу Лоури и др. (⁵).

В наших опытах циклогексимид вызывал почти полную остановку роста корня кукурузы между 3 и 6 час. инкубации в присутствии антибиотика, после 6 час. начиналось постепенное восстановление роста, и в период между 12 и 24 час. скорость роста достигала значения, равного половине скорости роста у контрольных растений. Величина 30-часового прироста корня в варианте с хлорамфениколом (50 $\mu\text{г}/\text{мл}$) и циклогексимидом (0,8 $\mu\text{г}/\text{мл}$) составляла соответственно 0,6—0,7 и 0,4 от прироста у контрольных растений. Эта картина согласуется с наблюдениями других исследователей (⁶⁻⁸). В условиях наших опытов не было выявлено значимого влияния циклогексимид и хлорамфеникола на поглощение C^{14} -глицина корнями кукурузы.

Митохондриальный белок в приросте и базальной части корня распределялся по трем фракциям следующим образом: 45, 30, 25 %.

Результаты трех опытов по измерению включения C^{14} -глицина в белки митохондрий представлены в табл. 1. Приведены величины удельной активности (в имп. за 100 сек. на 1 мг белка) для белков постмитохондриальной надосадочной жидкости (цитоплазматические белки, загрязненные разрушенными митохондриями) и трех фракций митохондриальных белков — отдельно для 30-часового прироста и базальной части корня.

У контрольных растений включение метки в цитоплазматические белки и различные фракции митохондриальных белков характеризуется величинами одного порядка, что позволяет предполагать существование общего фонда аминокислот для синтеза двух групп белков. В приросте корня идет интенсивный митохондриогенез, тогда как в базальной части, скорее всего, преобладают процессы дестройки и реорганизации митохондрий и обновления их популяции. Для нас было неожиданным, что, при близких удельных активностях цитоплазматических белков, удельные активности всех фракций митохондриальных белков были значительно выше в базальной части корня, чем в приросте. Это, вероятно, связано с динамическим состоянием митохондриальных белков в базальной части, их быстрым обновлением.

Аналогичные наблюдения сделаны и на других объектах. В митохондриях печени крысы, наряду с относительно медленно обменивающимися фракциями белков ($t_{1/2}=4-6$ дней), по крайней мере у 2 ферментов величина $t_{1/2}$ составляла всего 0,7—1,0 дня (⁹). Очень быстрая скорость обмена характерна для митохондриальных белков дрожжей, у которых половина жизни самих дрожжевых клеток составляет 1—3 часа (¹⁰). У крыс после удаления надпочечников содержание цитохромов а и а₂ в почках падает на 30 %, однако через 2 часа после введения альдостерона оно приближается к норме (¹¹). Таким образом, быстрое обновление митохондриальных белков характерно для зрелых клеток.

Результаты опытов по влиянию антибиотиков на синтез цитоплазматических и митохондриальных белков приведены в табл. 1. В скобках — величины радиоактивности фракций белков по отношению к контролю отдельно для прироста и базальной части (для хлорамфеникола — это числитель дроби). Опыты проводились с нестерильными растениями, и, поскольку хлорамфеникол является активным бактерицидным антибиотиком, доступный фонд меченой аминокислоты для растений в варианте с хлорамфениколом значительно выше, чем в вариантах без антибиотиков или с циклогексимидом. Следовательно, для того чтобы сравнить данные, полученные в трех вариантах опытов, необходимо пересчитать их, учитывая величины доступного фонда меченого предшественника. Этот пересчет основан на двух допущениях. Первое исходит из того хорошо известного факта, что хлорамфеникол не ингибирует цитоплазматический синтез белка, поэтому увеличение удельной радиоактивности белков постмитохондриальной надосадочной жидкости в опытах с хлорамфениколом по сравнению с контролем обусловлено только увеличением доступного фонда C^{14} -глицина. Второе допущение заключается в том, что удельная радиоактивность белков надосадочной жидкости и всех фракций митохондриальных белков

пропорциональна радиоактивности общего фонда аминокислот. На этом основании проводили нормировку: делили величины радиоактивности митохондриальных фракций белков (в % к контролю) в варианте с хлорамфениколом на соотношение между величинами удельной радиоактивности белков надосадочной жидкости в варианте с хлорамфениколом и в контроле. Нормировку проводили отдельно для прироста корня и базальной части для каждого опыта. Пересчитанные величины радиоактивности (в %) приведены в знаменателях дробей, заключенных в скобки.

Циклогексимид подавляет синтез цитоплазматических и митохондриальных белков в приросте корня, однако практически не тормозит синтез

Таблица 1

Удельная радиоактивность белков цитоплазмы (постмитохондриальная надосадочная жидкость) и фракций митохондриальных белков (имп. за 100 сек. на 1 мг белка) после введения хлорамфеникола и циклогексимид

Белковые фракции	№ опыта	Контроль		Хлорамфеникол 50 мкг/мл		Циклогексимид 0,8 мкг/мл	
		прирост	баз. часть	прирост	баз. часть	прирост	баз. часть
Постмитохондриальная надосадочная жидкость	1	3100±80	2720±120	4520±86 (146/100)	4220±21 (156/100)	1670±26 (54)	1620±93 (60)
	2	1020±37	1270±77	2920±110 (286/100)	3800±80 (299/100)	550±12 (54)	810±46 (64)
	3	1370±34	1260±34	2200±98 (161/100)	2760±10 (219/100)	510±20 (37)	770±10 (61)
Растворимая в 0,2 М КСl	1	1940±44	2260±69	2540±44 (131/90)	3000±10 (133/85)	890±29 (46)	2250±52 (100)
	2	960±26	2310±26	2480±44 (258±90)	3400±77 (147±49)	740±20 (77)	2270±45 (98)
	3	3380±55	5640±140	4730±112 (140±87)	4820±28 (86/39)	1020±99 (30)	5010±150 (89)
Растворимая в 1% тритоне X-100	1	3640±106	4720±94	4080±70 (112/83)	4730±130 (100/64)	1560±41 (43)	3160±87 (67)
	2	1030±26	1810±84	2910±40 (283/99)	2840±76 (157/52)	670±25 (65)	1770±69 (98)
	3	3660±18	5480±27	4940±90 (135/84)	5780±12 (105/48)	1540±10 (42)	5720±87 (104)
Растворимая в 1 N NaOH	1	2280±35	3630±28	2030±40 (89/57)	2170±48 (60/38)	1360±22 (60)	3600±42 (99)
	2	1610±10	2640±18	3190±12 (198/69)	3290±90 (125/42)	1090±10 (68)	3470±38 (130)
	3	3900±119	5340±34	4420±18 (113/70)	4690±95 (88/40)	1280±13 (33)	6340±260 (120)

Примечание. Данные в скобках — % к контролю, см. объяснение в тексте.

фракций митохондриального белка в базальной части корня. Наименее чувствительна к действию циклогексимид 3 фракция белков митохондрий, в базальной части корня отмечается даже некоторое стимулирование синтеза.

Хлорамфеникол незначительно влияет на синтез 1 и 2 фракций, но заметно снижает удельную радиоактивность 3 фракции у прироста. В базальной части корня хлорамфеникол сильно тормозит синтез всех трех фракций митохондриальных белков.

Ингибирование хлорамфениколом синтеза наименее растворимых белков мембран митохондрий хорошо согласуется с многочисленными литературными данными (¹, ²). Ингибирующее действие хлорамфеникола на цитоплазматический синтез растворимых и мембранных ферментов митохондрий связывают с синтезом на миторибосомах белковых компонентов, которые играют организующую роль при интеграции растворимых белков в органеллы (¹²⁻¹⁴). Можно предположить, что в процессе образования митохондрий в растущем кончике корня основная роль принадлежит цитори-

босомальным синтезам. Однако в базальной части корня при обновлении или достройке митохондрий все большее значение начинает приобретать собственно митохондриальная система синтеза белка. Поэтому ингибирование митоторибосомального синтеза хлорамфениколом значительно снижает удельную радиоактивность всех фракций митохондриальных белков (в том числе и синтезируемых на цитоторибосомах), тогда как ингибирование цитоторибосомального синтеза на 40% циклогексимидом не отражается заметно на радиоактивности этих белков базальной части корня.

Авторы благодарят А. А. Пешкову и В. П. Назарову за помощь в проведении экспериментов.

Сибирский институт физиологии
и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
15 VI 1973

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Ashwell, T. S. Work, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 251 (1970). ² D. S. Beattie, *Sub-Cell. Biochem.*, **1**, 1 (1971). ³ H. Ikuma, *Plant Physiol.*, **45**, 773 (1970). ⁴ Д. Рудин, В кн.: *Цитология ферментов*, М., 1971, стр. 84. ⁵ O. H. Lowry et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). ⁶ В. Б. Иванов и др., *Физиол. раст.*, **14**, 785 (1967). ⁷ В. Б. Иванов, *ДАН*, **191**, 224 (1970). ⁸ Т. К. Литинская, *Цитология*, **13**, 1358 (1971). ⁹ R. W. Swick et al., *J. Biol. Chem.*, **243**, 3581 (1968). ¹⁰ А. В. Котельникова, Р. А. Звягильская, *Биохимия дрожжевых митохондрий*, М., 1973. ¹¹ R. Kirsten et al., *Pflüg. Arch.*, **314**, 231 (1970). ¹² M. J. Vary et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **141**, 430 (1970). ¹³ Е. А. Пинус и др., *Биохимия*, **35**, 1078 (1970). ¹⁴ H. R. Mahler et al., In: *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, Amsterdam, 1971, p. 492.