Доклады Академии наук СССР
1974. Том 216, № 5

УДК 547.963.3:576.311 *БИОХИМИЯ*

В. С. ГАЙЦХОКИ, О. И. КИСЕЛЕВ, Н. А. КЛИМОВ, Н. К. МОНАХОВ,
Г. В. МУХА, А. Л. ШВАРЦМАН, С. А. НЕЙФАХ

ИНТЕГРАЦИЯ СИНТЕЗА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В СИСТЕМЕ ПОЛИРИБОСОМ ЦИТОПЛАЗМЫ И МИТОХОНДРИЙ

(Представлено академиком А. А. Баевым 13 III 1974)

Известно, что значительная часть митохондриальных белков синтезируется на рибосомах цитоплазмы, тогда как рибосомы митохондрий участвуют в образовании ограниченного набора белков, в основном субъединиц мембранных олигомерных ферментов ([1], [2]). Для выяснения внутриклеточной локализации синтеза того или иного митохондриального белка обычно применяются кинетические подходы ([3]) или селективные ингибиторы, дающие возможность до некоторой степени избирательно «выключать» цитоплазматическую или митохондриальную системы белкового синтеза ([1], [2]), а также используются ядерные и цитоплазматические мутанты. Однако при этом остается невыясненной пространственная системная организация синтеза белков митохондрий и относительный вклад различных классов полирибосом (ПРС) в формирование ферментных ансамблей митохондрий.

Мы попытались подойти к решению этих вопросов с применением принципиально иного подхода, до сих пор никем не проводимого,— анализа внутриклеточного распределения ПРС, синтезирующих митохондриальные белки, с помощью радиоактивно меченных антител. При этом предполагалось, что антитела связываются с насцентными митохондриальными полипептидами, обладающими антигенной активностью, и тем самым — с соответствующей фракцией ПРС.

Объектом исследования служили субклеточные фракции печени крысы и антимитохондриальная сыворотка, полученная иммунизацией кроликов препаратами митохондрий печени крысы, очищенными ступенчатым дифференциальным центрифугированием. В опытах использовали фракцию иммуноглобулинов, выделенную из сыворотки крови контрольных и иммунизированных кроликов высаливанием сульфатом аммония и не обладающую РНКазной активностью. Препараты иммуноглобулинов иодировали с помощью J^{125} (10 мкС на 1 мг белка) в присутствии H_2O_2 и кристаллической пероксидазы ([4]). Тотальные полирибосомы цитоплазмы получали из постмитохондриальной надосадочной жидкости после лизиса тритоном Х-100 путем центрифугирования через 2*М* сахарозу. Фракции свободных и мембраносвязанных ПРС постмитохондриальной надосадочной жидкости разделяли по методу Адельмана и др. ([5]). Митохондриальную фракцию, полученную центрифугированием при 10 000 *g*, обрабатывали дигитонином по методу Шнайтмана ([6]), после чего из надосадочной жидкости выделяли цитоплазматические ПРС, связанные с митохондриями (условное название — ПРС наружных митохондриальных мембран), а из препарата внутренних мембран митохондрий с матриксом после лизиса тритоном Х-100 получали ПРС внутренних мембран митохондрий. На всех этапах фракционирования в качестве ингибитора РНКазы использовали гепарин в концентрации 100 ед/мл. Полученные препараты ПРС характеризовались отношением $A_{260}:A_{280}=1{,}7-1{,}8$, количественно задерживались на нитроцеллюлозных фильтрах и, по данным седиментацион-

ного анализа в градиенте концентрации сахарозы, содержали незначительные количества монорибосом и их субъединиц (рис. 1). Полирибосомная природа у.-ф.-поглощающих фракций сахарозного градиента подтверждается также опытами, демонстрирующими их диссоциацию при обработке ЭДТА или при комбинированном воздействии 1 *M* KCl с пуромицином (рис. 2). Для изучения связывания J^{125}-иммуноглобулинов с различными фракциями ПРС использовали седиментационный анализ в градиенте концентрации сахарозы. ПРС в количестве 2,0—10,0 A_{260} в 0,03 *M* трис-HCl — 0,025 *M* KCl — 0,005 *M* $MgCl_2$, pH 7,6, инкубировали с радиоактивными иммуноглобулинами в течение 5 мин. при 37° и затем в течение 60 мин. при 0°, после чего инкубационную смесь центрифугировали в сахарозном градиенте.

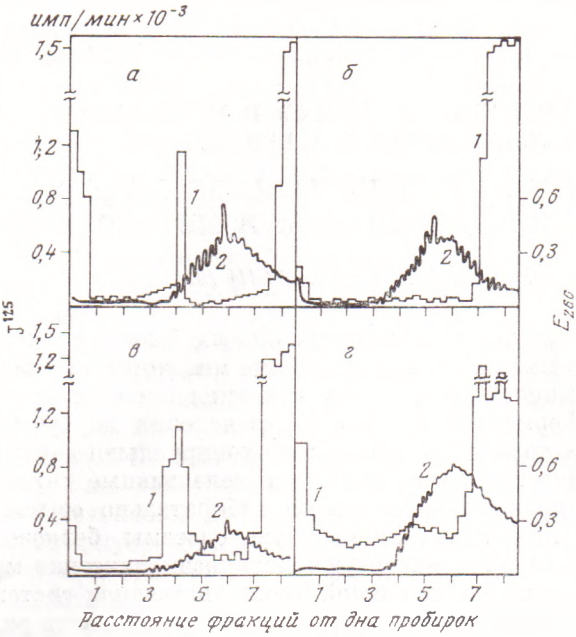

Рис. 1. Седиментационный анализ комплексов цитоплазматических полирибосом с антимитохондриальными иммуноглобулинами. Полирибосомы центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы по ([7]). *1* — оптическая плотность, *2* — радиоактивность J^{125}-антител. *а* — тотальные цитоплазматические ПРС, *б* — мембраносвязанные ПРС постмитохондриальной надосадочной жидкости, *в* — свободные ПРС цитоплазмы, *г* — ПРС наружной мембраны митохондрий

Как показывает рис. 1, добавление J^{125}-иммуноглобулинов к тотальным ПРС цитоплазмы (рис. 1*а*) приводит к существенному утяжелению части молекул антител, которые обнаруживаются в виде гомогенного пика радиоактивности в зоне тяжелых ПРС (9—11 мономеров по формуле ([7])). Сходная картина утяжеления антител наблюдалась в опытах со свободными ПРС цитоплазмы (рис. 1*в*). В опытах с этими фракциями ПРС отмечалось также образование иммунопреципитата, который находили в донных фракциях сахарозного градиента. С другой стороны, утяжеление антител и образование преципитата было незначительным в опытах с мембраносвязанными ПРС цитоплазмы (рис. 1*б*), причем радиоактивность преципитата в этом случае была равна таковой в контроле с J^{125}-иммуноглобулинами от неиммунизированных животных (табл. 1). ПРС наружных мембран митохондрий с высокой эффективностью связывали J^{125}-иммуноглобулины, о чем свидетельствует диффузное распределение радиоактивности в градиенте и высокая радиоактивность донных фракций (рис. 1*г*). Таким образом, насцентные полипептиды, способные к связыванию с антимитохондриальными иммуноглобулинами, обнаруживаются в дискретных фракциях свободных ПРС цитоплазмы и практически во всех фракциях ПРС наружной мембраны митохондрий.

Для решения вопроса об участии именно насцентных полипептидов, связанных с ПРС, в реакции с антителами, были поставлены опыты, в которых исследовалось влияние пуромицина или комбинации пуромицина с KCl на образование иммунопреципитата. Результаты (табл. 1) показывают, что после обработки ПРС 1 *M* KCl с пуромицином ([5]) радио-

активность преципитата в донных фракциях градиента существенно снижается (до 10% в опытах с ПРС наружных митохондриальных мембран). Менее эффективной в этом отношении оказалась обработка ЭДТА (рис. 2), которая, по-видимому, не полностью освобождает рибосомы и их субъединицы от связанных с ними насцентных полипептидов.

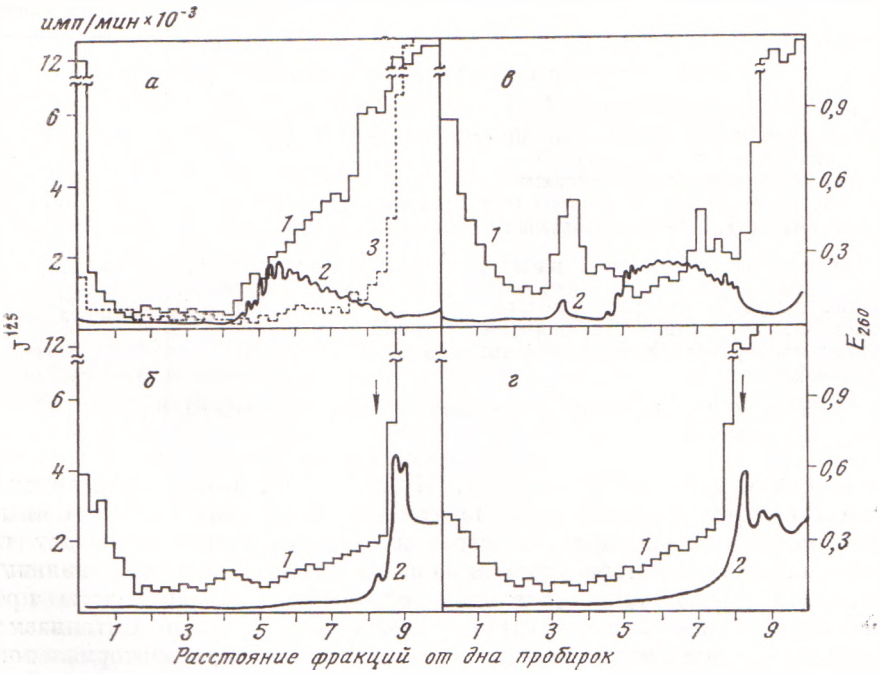

Рис. 2. Связывание антимитохондриальных J^{125}-иммуноглобулинов с полирибосомами внутренней мембраны митохондрий. *1*, *2* – то же, что в подписи к рис. 1, *3* – распределение J^{125}-иммуноглобулинов неиммунизированных животных. *а* – контрольная седиментограмма, *б* – ПРС обработаны 0,3 *М* ЭДТА, *в* – 0,75 *М* KCl, *г* – 0,75 *М* KCl и 2 м*М* пуромицином. Стрелкой показано положение 55 S рибосом митохондрий

В опытах с ПРС внутренних мембран митохондрий получено наиболее выраженное взаимодействие радиоактивных антител со всеми фракциями. На рис. 2 представлены результаты экспериментов, которые демонстрируют специфичность образования комплексов антител с насцентными пептидами. Об этом свидетельствует высокая чувствительность реакции взаимодействия к обработке ЭДТА (рис. 2*б*) и KCl-пуромицином (рис. 2*в*, *г*).

Таким образом, иммунохимический подход позволяет установить распределение ПРС печени взрослых животных, участвующих в биосинтезе митохондриальных белков. Оказалось, что образование белков митохондрий осуществляет дискретная фракция относительно тяжелых свободных ПРС цитоплазмы, тогда как мембраносвязанные ПРС постмитохондриальной надосадочной жидкости не содержат насцентных митохондриальных полипептидов. Митохондриальные ПРС, выделенные из высокоочищенной фракции внутренних мембран митохондрий с матриксом, оказались значительно обогащенными насцентными полипептидами, реагирующими с антителами. Особый интерес и новизну представляет тот факт, что в синтезе митохондриальных белков участвуют все ПРС, связанные с наружной мембраной митохондрий. Это обстоятельство позволяет высказать некоторые соображения о функциональной специализации этой фракции цитоплазматических рибосом, постоянно обнаруживаемых в связи с митохондриями и отделяемых от них только при использо-

Таблица 1

Влияние преинкубации полирибосом с KCl-пуромицином на преципитацию с антимитохондриальным иммуноглобулином

Полирибосомы	Радиоактивность преципитата, имп/мин	
	контроль	KCl-пуромицин
Антимитохондриальные иммуноглобулины		
Тотальные полирибосомы цитоплазмы	3105	720
Мембраносвязанные полирибосомы постмитохондриальной надосадочной жидкости	660	620
Свободные полирибосомы цитоплазмы	19560	830
Полирибосомы наружной мембраны митохондрий	18150	950
Полирибосомы внутренней мембраны митохондрий	16256	1608
Иммуноглобулины неиммунизированных животных		
Тотальные полирибосомы цитоплазмы	928	724
Полирибосомы внутренней мембраны митохондрий	745	680
Полирибосомы наружной мембраны митохондрий	648	585
Без полирибосом	0	0

Примечание. Условия обработки полирибосом KCl-пуромицином см. ([5]).

вании жестких методов очистки ([8]). По-видимому, цитоплазматические рибосомы митохондриальной фракции гомогената не являются случайным «загрязнением» митохондрий, а связь с митохондриями отражает их функциональную специализацию в синтезе именно митохондриальных белков, характеризующихся высокой гидрофобностью. При этом пространственная близость и структурная связь этой фракции цитоплазматических ПРС с митохондриями создает предпосылки для векториального переноса новообразованных гидрофобных белков во внутренние мембраны митохондрий для «застраивания» в ферментные ансамбли этих органоидов. Полученные данные прямо показывают, что синтез митохондриальных белков осуществляется целостной системой ПРС, состоящей как из митохондриальных, так и из цитоплазматических фракций.

Мы полагаем, что примененный нами подход может оказаться эффективным при изучении системной организации в клетке синтеза белков других органоидов цитоплазмы, например хлоропластов, которые кодируются ядерными и цитоплазматическими генами.

Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
7 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *С. А. Нейфах*, Вестн. АМН СССР, т. 1, 8 (1973). [2] *A. Tzagoloff, M. S. Rubin, M. Sierra*, Biochim. et biophys. acta, v. 301, 71 (1973). [3] *C. P. Henson, C. N. Weber, H. R. Mahler*, Biochemistry, v. 7, 4431 (1968). [4] *R. Palacios, R. Palmiter, R. Schimke*, J. Biol. Chem., v. 247, 2316 (1972). [5] *M. Adelman, D. Sabatini, G. Blobel*, J. Cell, Biol., v. 56, 206 (1973). [6] *C. A. Schneitman, J. W. Greenawalt*, J. Cell Biol., v. 38, 158 (1968). [7] *P. Pfuderer, P. Cammarano, D. R. Holladay*, Biochim. et biophys. acta, v. 109, 595 (1965). [8] *T. W. O'Brien*, J. Cell Biol., v. 53, 590 (1972).