

Г. Г. ГАУЗЕ, В. С. МИХАЙЛОВ

**СОДЕРЖАНИЕ *D*-ПЕТЛЕВЫХ МОЛЕКУЛ
В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ
ЯЙЦЕКЛЕТОК И РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЗАРОДЫШЕЙ
*MISGURNUS FOSSILIS***

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 IV 1974)

В 1972 году была предложена модель репликации митохондриальной ДНК (мт-ДНК) в клетках культуры мыши (1). Согласно этой модели, наиболее ранним предшественником в процессе репликации является *D*-мт-ДНК, представляющая собой ковалентно замкнутую молекулу с одним из участков которой ассоциирован комплементарный линейный фрагмент длиной 450 нуклеотидов, так называемый Е-тяж. Участок антипараллельной цепи матричной молекулы в зоне Е-тяжа является неспаренным и при электронномикроскопических наблюдениях выглядит в виде характерной однонитевой петли (петля смещения или *D*-петля). Молекулы *D*-мт-ДНК могут быть идентифицированы на электронных микрофотографиях, полученных с помощью формамидного метода, и было показано, что значительная часть ковалентно замкнутой ДНК митохондрий клеток культуры мыши (2, 3) и печени цыпленка (4) представлена *D*-петлевыми молекулами. В опытах по биосинтезу ДНК в изолированных митохондриях было показано, что большая часть радиоактивности включившегося предшественника ДНК обнаруживается в составе Е-тяжей, ассоциированных с матричными ковалентно замкнутыми молекулами (5, 6).

В нашей предыдущей работе (7) было показано, что уровень включения метки из ^3H -дТТФ в ДНК митохондрий неоплодотворенных яйцеклеток выюна *Misgurnus fossilis* (н.я.в.) является крайне малым; более того, характер распределения радиоактивности по компонентам мт-ДНК также существенно отличается от других описанных систем. Во фракции ковалентно замкнутых молекул обнаруживалось не более 50% всей включившейся радиоактивности, причем лишь небольшая часть этого радиоактивного материала была представлена в Е-тяжах.

Поскольку мы показали (7), что митохондрии н.я.в. не обладают дефицитом по ДНК-полимеразной активности, низкий уровень синтеза ДНК в этих митохондриях и меньшее относительное включение метки во фракцию ковалентно замкнутых молекул может объясняться следующими двумя причинами: 1) митохондрии н.я.в. не содержат *D*-мт-ДНК; 2) митохондрии н.я.в. содержат *D*-мт-ДНК, но включение меченых предшественников в их Е-тяжи невозможно вследствие каких-то дополнительных причин.

Чтобы сделать выбор между этими двумя возможностями, мы провели электронно-микроскопическое определение содержания *D*-мт-ДНК в препаратах, выделенных из митохондрий неоплодотворенных яйцеклеток и развивающихся зародышей выюна.

Препараты мт-ДНК получали из изолированных митохондрий, как описано ранее (7). Разделение ковалентно замкнутой и открытой форм ДНК проводили с помощью ультрацентрифугирования в градиентах этидиумбромид-хлорида цезия (ЭтБр- CsCl) в течение 16–18 час. при 40 000 об/мин (7). После ультрацентрифугирования пробирку с препара-

том освещали ртутной лампой с фильтром УФС-6 и получали флуоресцентную фотографию, которую денситометрировали на микрофотометре ИФО-451. Далее дно пробирки прокалывали и градиент фракционировали раскапыванием; материал, соответствующий пикам ковалентно замкнутой и открытой форм ДНК, освобождали от ЭтБр, диализовали против 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,5, содержащего 0,1 М NaCl и 5 мМ ЭДТА, и использовали для электронной микроскопии. Электронные микрофотографии были получены точно как описано в работе (2).

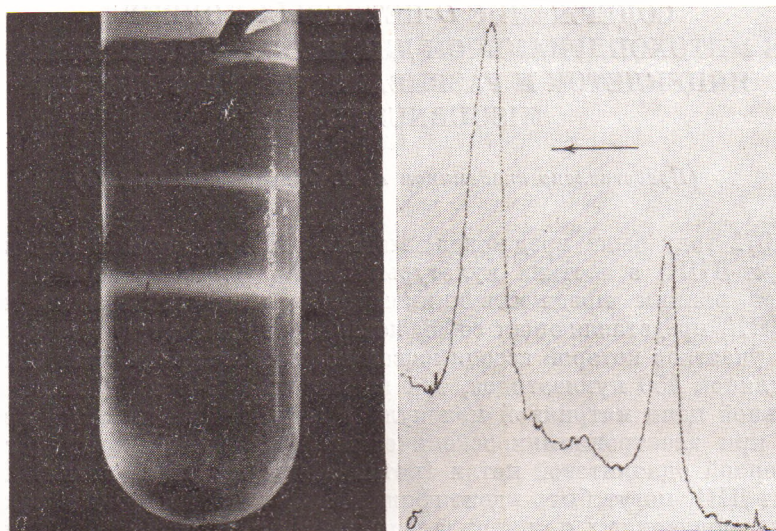


Рис. 1. *a* — флуоресцентная фотография пробирки с препаратом ДНК после ультрацентрифугирования в градиенте ЭтБр-СsCl; *b* — денситограмма средней части пробирки, приведенной на рис. 1*a*. Стрелка указывает направление ускорения

На рис. 1*a* представлена флуоресцентная фотография пробирки с мт-ДНК н.я.в. после ультрацентрифугирования в градиенте ЭтБр-СsCl. Нижняя полоса соответствует ковалентно замкнутым кольцевым молекулам, верхняя — открытым кольцевым, разница в плотностях этих фракций равна 50 мг/см^3 , что соответствует литературным данным (8). На рис. 1*b* представлена денситограмма приведенной фотографии. Фракция ковалентно замкнутой ДНК составляет 76% от всей ДНК градиента, материал пика открытых молекул составляет 20%. Небольшой пик флуоресцирующего материала, находящийся точно посередине между двумя основными пиками, вероятно обусловлен фракцией цепных димеров (9). В настоящей работе этот материал не исследовался.

Верхняя фракция градиента ЭтБр-СsCl использовалась для определения молекулярного веса и контурной длины. Перед получением монослоя к мт-ДНК добавляли репликативную форму (РФ) ДНК фага φX174, которая служила внутренним стандартом. Молекулярный вес этой ДНК равен $3,4 \cdot 10^6$ (10). Распределение молекул ДНК по контурным длинам представлено на рис. 2. Была промерена 31 молекула РФ ДНК φX174 и 32 молекулы мт-ДНК н.я.в. Определенное из представленной гистограммы отношение длин мт-ДНК и РФ ДНК φX174 равно $3,11 \pm 0,12$, что дает величину молекулярного веса для мт-ДНК н.я.в. $(10,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$. Принимая, что 1 мкм контурной длины ДНК соответствует молекулярному весу $1,96 \cdot 10^6$ (11), контурная длина молекулы мт-ДНК н.я.в. равна $5,4 \pm 0,2$ мкм. Таким образом, мт-ДНК н.я.в. по своему молекулярному весу и контурной длине сходна с мт-ДНК других животных объектов.

Материал из нижней фракции ДНК градиента ЭтБр- CsCl , содержащий ковалентно замкнутые молекулы, использовали для определения относительного содержания D -мт-ДНК. Приведенные на рис. 3а молекулы мт-ДНК н.я.в. имеют на всем протяжении хорошо прослеживаемый контур. D -петли отсутствуют. На рис. 3б приведена для сравнения молекула D -мт-ДНК печени крысы, содержащая D -петлю. Препарат мт-ДНК печени крысы был приготовлен, как описано для вьюна (7). Содержание

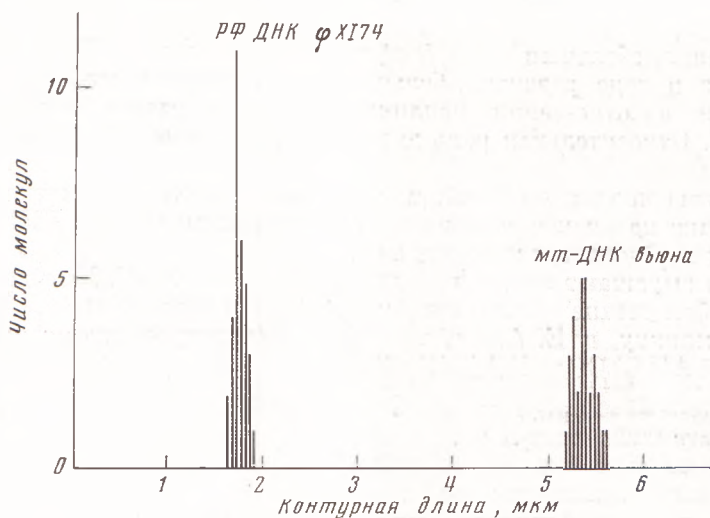


Рис. 2. Гистограмма распределения контурных длин молекул РФ ДНК фХ174 и мт-ДНК вьюна

D -мт-ДНК в ковалентно замкнутой фракции мт-ДНК н.я.в. приведено в табл. 1, для сравнения приведены также данные для мт-ДНК печени крысы. Из 239 молекул мт-ДНК н.я.в. лишь две молекулы имели D -петли, в то же время 58% просмотренных молекул мт-ДНК печени крысы обладали такими петлевыми структурами.

Таблица 1

Относительное содержание D -петлевых молекул в ковалентно замкнутых мт-ДНК из различных источников

Источник мт-ДНК	D -петлевые молекулы, %	Молекулы без петель, %	Число просмотренных молекул
Неоплодотворенные яйцеклетки вьюна	<1	>99	239
Зародыши вьюна на стадии 35 час.	4	96	103
Печень крысы	58	42	118

Полученные данные показывают, что содержание D -петлевых молекул в мт-ДНК н.я.в. составляет величину менее 1%. На основании этого мы делаем вывод, что крайне низкий уровень включения предшественников в мт-ДНК, описанный нами для н.я.в., связан с низким содержанием D -петлевых молекул. Механизмы, ответственные за низкое содержание D -петлевых молекул в митохондриях н.я.в., в настоящее время остаются неизвестными. Поскольку ДНК-полимеразная активность митохондрий н.я.в. является высокой, одним из возможных объяснений может быть отсутствие или неактивность механизма, ответственного за генерацию заправки для образования D -мт-ДНК.

В табл. 1 приведены также данные о содержании *D*-петлевых молекул в 35-часовых зародышах вьюна, когда скорость синтеза мт-ДНК в 40 раз превышает скорость, наблюдающуюся в митохондриях н.я.в. Обращает на себя внимание тот факт, что активация синтеза не сопровождается соответствующим увеличением количества *D*-петлевых молекул, их содержание оказывается равным 4%. Объяснение этого факта является двояким. 1. При репликации мт-ДНК в развивающихся эмбрионах отсутствует механизм, ответственный за удержание роста *E*-тяжа на уровне *D*-петлевых молекул, вследствие чего их концентрация оказывается незначительной. 2. Лишь небольшая часть популяции молекул мт-ДНК активно реплицируется в ходе развития, большая часть молекул мт-ДНК является неактивной в отношении репликации и не образует молекул типа *D*-мт-ДНК. Относительная роль двух этих механизмов является пока неясной.

После завершения этой работы нам стало известно о заметке⁽¹²⁾, где было указано на низкое содержание *D*-петлевых молекул в ДНК неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа.

Авторы выражают искреннюю признательность Ю. С. Давыдову за отличное обеспечение электронно-микроскопических опытов, а также М. Ф. Шемякину и Е. А. Стукачевой из Института химии природных соединений АН СССР за РФ ДНК ФХ174.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. L. Robberson, H. Kasamatsu, J. Vinograd, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 737 (1972). ² H. Kasamatsu, D. L. Robberson, J. Vinograd, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 2252 (1971). ³ D. L. Robberson, D. A. Clayton, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 3810 (1972). ⁴ A. Arnberg, E. F. J. Van Bruggen et al., Biochim. et biophys. acta, v. 246, 353 (1971). ⁵ J. Ter Schegget, P. Borst, Biochim. et biophys. acta, v. 246, 249 (1971). ⁶ Г. Г. Гаузе, С. М. Долгулевич, ДАН, т. 208, № 2, 456 (1973). ⁷ В. С. Михайлов, Г. Г. Гаузе, Мол. биол., т. 8, 108 (1974). ⁸ R. Radloff, W. Bauer, J. Vinograd, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 57, 1514 (1967). ⁹ D. A. Clayton, R. W. Davis, J. Vinograd, J. Mol. Biol., v. 47, 137 (1970). ¹⁰ R. L. Sinsheimer, J. Mol. Biol., v. 1, 43 (1959). ¹¹ R. Langridge, D. A. Marvin et al., J. Mol. Biol., v. 2, 19 (1960). ¹² L. Matsumoto, H. Kasamatsu, L. Piko, J. Cell Biol., v. 59, 2 (2), 221a (1973).

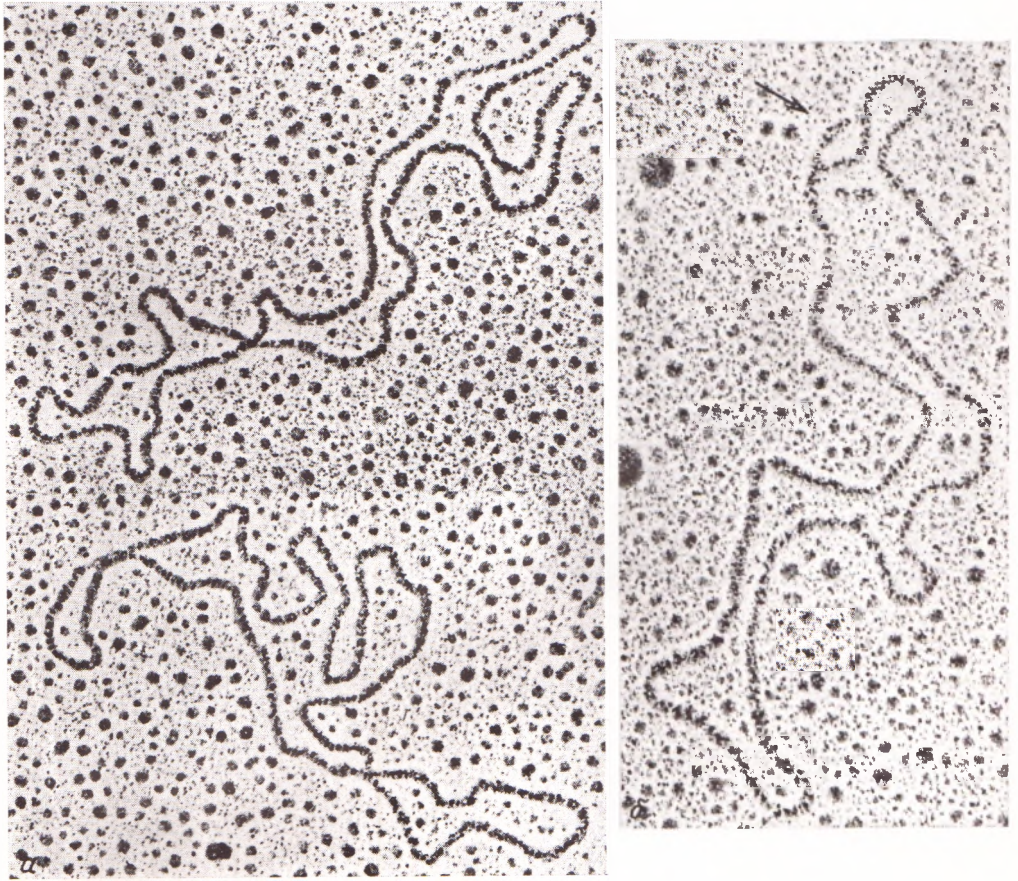


Рис. 3: *a* — электронные микрофотографии молекул мт-ДНК н.я.в.; *b* — молекула *D*-мт-печени крысы, *D*-петля указана стрелкой

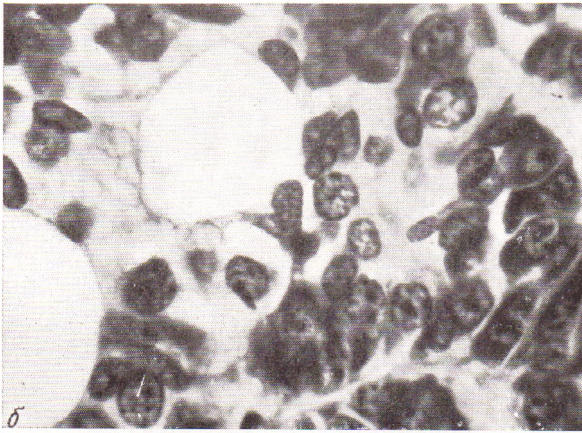
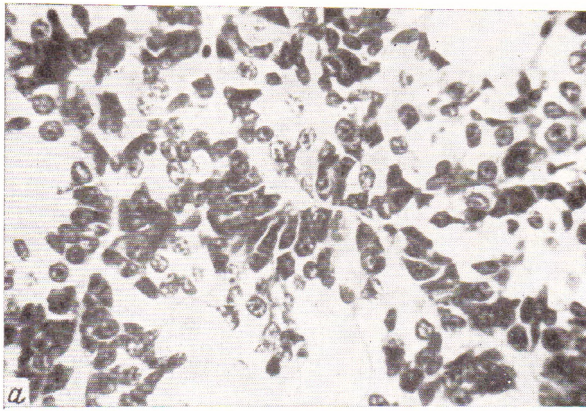


Рис. 1. Расположение клеток, окрашивающихся свинцовым гематоксилином, в ростральной зоне дистальной доли гипофиза осетра, *a* — 400×, *б* — 850×; фиксация 4% нейтральным формалином

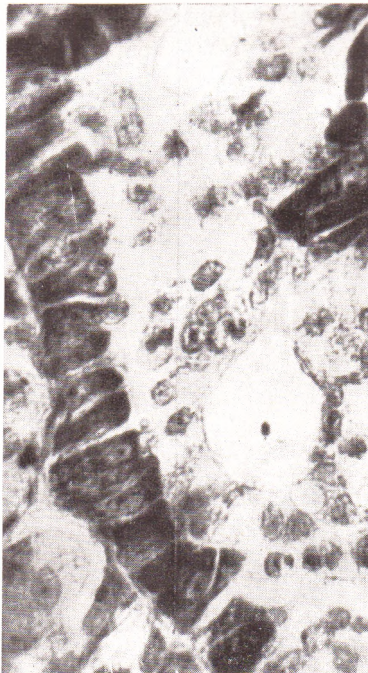


Рис. 2. Полисадное расположение кортикотропинпродуцирующих клеток на границах эпителиальных тяжей ростральной доли дистальной доли гипофиза осетра. Фиксация Буэн — Холланд с сулемой, окраска свинцовым гематоксилином по Маккнейлу. 600×