

С. А. НЕЙФАХ, Д. САБАДОШ

**ОБ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА МИТОХОНДРИЯМИ
ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИКЛИЧЕСКОГО
3',5'-АМФ**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 25 VI 1971)

Известно, что наряду с коренными морфологическими и функциональными различиями между биологическими типами наблюдается и близкое их подобие. Так, ближайшее сходство обнаружено между генетической и белоксинтезирующей системами таких, казалось бы, далеких форм, как митохондрии эукариота, с одной стороны, и бактерии и вирусы, с другой (^{1, 2}). Это сходство напоминает о гипотезе об общих предках у современных бактерий и митохондрий и их возможной роли в эволюции последних (¹). До сих пор было установлено совпадение ряда физико-химических параметров ДНК, рибосом и других компонентов генетического аппарата бактерий и митохондрий. Встает вопрос о наличии сходства также между механизмами регулирования действия этого аппарата. Мы исследовали, имеется ли в митохондриях животных механизм генетической репрессии катаболитами по Магазанику (³), что до сих пор считалось исключительным свойством микроорганизмов, и является ли циклической 3',5'-АМФ (ц-АМФ) индуктором, дерепрессирующим этот механизм.

На чистой фракции изолированных митохондрий из печени крысы исследовали два процесса биосинтеза митохондриальных белков: синтез индуцибельного белка, киназина, контролирующего скорость гликолиза в клетке (^{4, 7}), и синтез конститутивных структурных белков (^{5, 9}). В опыты были взяты суспензии активно дышащих и фосфорилирующих митохондрий (коэффициент дыхательного контроля 3,5—4,2). Все операции по выделению митохондрий производили при 0—4°, применяя стерильную посуду и стерильные инструменты. Тщательно отмытые митохондрии инкубировали в оптимальной среде для окислительного фосфорилирования и биосинтеза белка (⁶) в течение 1 часа при 30°. Из среды инкубирования выделяли киназин по методике, описанной ранее (⁶), и из митохондрий после их солюбилизации при помощи дезоксихолата выделяли суммарную фракцию структурных белков (⁵). В обоих препаратах C¹⁴-меченных белков определяли удельную радиоактивность как в предыдущей статье (⁶).

Приступая к работе, мы предварительно убедились, что актипоминин D (40 мкг/мл) и хлорамфеникол (50 мкг/мл) подавляют включение меченых аминокислот в киназин (на 79 и 62% соответственно) и в структурный белок (на 82 и 65% соответственно), т. е. включение метки действительно зависит от процессов генетической транскрипции и трансляции. Мы убедились также в том, что синтез киназина происходит во внутренних мембранах митохондрий, выделенных по методике Шнайтмана (⁸), т. е. там же, где локализуются структуры, генерирующие энергию. Аналогичные данные для структурного белка были получены другими авторами (⁹).

Опыты по воздействию глюкозой и ее фосфорилированными дериватами на биосинтез белка показали, что среди начальных интермедиатов гликолиза только фруктозо-1,6-фосфорная кислота (Ф-1,6-Ф) обладает отчетливым тормозящим действием (табл. 1, А). Глюкоза почти не вызывает торможения синтеза. Снижение уровня синтеза киназина и структурного

Таблица 1

Добавки	Киназин		Структурный белок	
	У. р., имп/мин на 1 мг белка	изменение * У. р., %	У. р., имп/мин на 1 мг белка	изменение * У. р., %

А. Синтез белка изолированными митохондриями в присутствии глюкозы и гексозофосфорных эфиров **

Без добавок	1099	—	770	—
Глюкоза	945	—15 (5—18)	684	—11 (8—15)
Глюкозо-6-фосфат	907	—17 (10—20)	716	—7 (7—12)
Фруктозо-6-фосфат	937	—15 (12—19)	698	—10 (10—13)
Фруктозо-1,6-фосфат	523	—52 (50—62)	336	—57 (48—63)

Б. Торможение синтеза белка под действием Ф-1,6-Ф при подведении энергии из разных источников ***

Сукцинат	840	—	630	—
Сукцинат + глюкоза	885	+5 (5—8)	610	—4 (4—10)
Сукцинат + Ф-1,6-Ф	300	—65 (55—65)	315	—50 (47—58)
ФЕП + пируваткиназа	580	—	700	—
ФЕП + пируваткиназа + + Ф-1,6-Ф	315	—46 (42—50)	320	55 (50—59)

В. Репрессия синтеза белка под действием Ф-1,6-Ф и dereпрессия под действием ц-АМФ ****

Сукцинат	465	—	425	—
Сукцинат + Ф-1,6-Ф	242	—48 (42—55)	240	—44 (44—52)
Сукцинат + Ф-1,6-Ф + + ц-АМФ	385	—17 (13—20)	350	—18 (15—18)
ФЕП + пируваткиназа	443	—	525	—
ФЕП + пируваткиназа + + Ф-1,6-Ф	235	—47 (45—53)	278	—47 (47—55)
ФЕП + пируваткиназа + + Ф-1,6-Ф + ц-АМФ	355	—20 (13—25)	380	—28 (19—28)

* В скобках указаны пределы колебания величины изменения удельной радиоактивности (у. р.) по данным не менее 4 опытов.

** Среда инкубирования, помимо постоянных компонентов (*), содержала 10 мМ сукцинат. Глюкоза и гексозофосфорные эфиры добавлены в концентрации 10 мМ. Содержание белка митохондрий 7,7 мг на 1 мл среды.

*** Добавлены в среду (см. (*)) сукцинат 10 мМ, ФЕП 5 мМ, пируваткиназа 20 мкг/мл, глюкоза и Ф-1,6-Ф по 10 мМ. Содержание белка митохондрий 7,5 мг/мл.

**** Среда инкубирования и методика опытов см. (*). ц-АМФ добавлена одновременно с Ф-1,6-Ф в концентрации 1 мМ. Ф-1,6-Ф 10 мМ; сукцинат 10 мМ; содержание белка митохондрий 6,3 мг/мл; ФЕП и пируваткиназа те же, что и в Б.

белка составляет более 50%, что значительно выше того небольшого торможения синтеза (на 7—15%), которое обеспечивается действием других катаболитов и связано, вероятно, с присутствием в последних примесей Ф-1,6-Ф.

Возникает вопрос, обусловлен ли этот эффект специфическим воздействием Ф-1,6-Ф на генетический аппарат митохондрий, т. е. репрессией этого аппарата, или является результатом изменившихся условий генерирования энергии для синтеза. Для исследования этого вопроса инкубировали митохондрии в условиях образования АТФ из разных источников: за счет энергетического сопряжения в самих митохондриях или за счет внешней АТФ-генерирующей системы — фосфоенолпируват (ФЕП) + пируваткиназа (2.7.1.40). Опыты показали, что в обоих случаях, т. е. независимо от источника энергии, торможение синтеза белков наступает под действием Ф-1,6-Ф (табл. 1, Б). При этом было отмечено, что при генерировании энергии самими митохондриями синтез киназина протекает со скоростью, на 30—50% большей, чем синтез структурного белка, а при генерировании АТФ за счет внешнего источника, наоборот, — синтез структурного белка на 20—40% превышает синтез киназина. Причины этих различий связаны с особенностями систем синтеза индуцибельных и конститутивных белков

(⁶). Воздействие же Ф-1,6-Ф всегда вызывает приблизительно одинаковое торможение синтеза обоих белков.

Прямым доказательством воздействия Ф-1,6-Ф именно на геном митохондрий служили опыты с циклической 3,5-АМФ (ц-АМФ). Известно, что ц-АМФ в комплексе с рецепторным белком у бактерий является специфическим антагонистом катаболитов, репрессирующих геном (¹⁰). Оказалось,

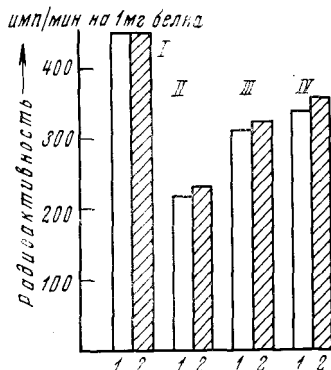


Рис. 1. Дерепрессия синтеза белка в митохондриях под действием ц-АМФ. Среда инкубирования и методика опытов по (⁶). Добавлено 10 мМ Ф-1,6-Ф, содержание митохондриального белка 6,5 мг на 1 мл среды. I — контроль, II — Ф-1,6-Ф, III — Ф-1,6-Ф + 0,5 мМ ц-АМФ, IV — Ф-1,6-Ф + 1,0 мМ ц-АМФ. 1 — удельная радиоактивность киназина, 2 — то же структурного белка

что торможение синтеза киназина и структурного белка, вызванное действием Ф-1,6-Ф, устраняется приблизительно наполовину в результате последующего или одновременного добавления к митохондриям ц-АМФ («Сигма», США). Из табл. 1, В видно, что торможение синтеза белков в присутствии ц-АМФ все же отчасти сохраняется, но составляет 17—28% от исходной величины синтеза, т. е. на 40—64% ниже, чем уровень торможения, вызванный воздействием Ф-1,6-Ф без ц-АМФ. Этот эффект хотя и возрастает с увеличением концентрации ц-АМФ, но не находится в прямой зависимости от этого увеличения в пределах 0,5—2,0 мМ ц-АМФ при постоянной концентрации 10 мМ Ф-1,6-Ф (рис. 1).

Наконец, по нашим данным, активирующее действие ц-АМФ не наступает, если торможение вызвано не катаболитом, а АТФ, который, как мы показали раньше (⁶, ⁷), служит репрессором синтеза индуцибельного белка — киназина. Следовательно, у митохондрий, как и у бактерий, ц-АМФ специфически активирует только катаболит — чувствительный участок генома (¹⁰). Накапливание Ф-1,6-Ф служит сигналом для митохондрий, приостанавливающим синтез киназина (стимулирующего гликолиз (⁴)) и синтез структурного белка (стабилизирующего структуру электронпереносящих частиц митохондрий (⁵)). В результате этого не происходит невыгодного клетке избыточного образования Ф-1,6-Ф, АТФ и, вероятно, других фосфорилированных метаболитов. ц-АМФ снимает этот эффект через воздействие на геном митохондрий и индуцирует процессы фосфорилирования.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
25 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Nass, Intern. Rev. Cytol., 25, 55 (1969). ² P. Borst, L. A. Grivell, FEBS-Letters, 13, 73 (1971). ³ Б. Магазаник, В кн.: Регуляторные механизмы клетки, М., 1964, стр. 358. ⁴ S. A. Neifakh, I. A. Avramov et al., Biochim. et biophys. acta, 100, 329 (1965). ⁵ R. S. Criddle, R. M. Bock et al., Biochemistry, 1, 827 (1962). ⁶ Д. Сабалаш, Биохимия, 36, 401 (1971). ⁷ С. А. Нейфах, Э. Х. Сафарян, В. С. Туровский, Молек. биол., 3, 49 (1969). ⁸ C. Schnaitman, V. G. Erwin, J. W. Greenwalt, J. Cell Biol., 32, 749 (1967). ⁹ L. W. Wheelodon, A. L. Lehninger, Biochemistry, 5, 3533 (1966). ¹⁰ I. Pastan, R. Perlman, Science, 169, 339 (1970).