

УДК [577.1:547.963.32:576.311.347]:[577.1:547.96:576.311] БИОХИМИЯ

А. П. ГАЛКИН, Ю. И. МИТРОХИН, И. Н. ТОДОРОВ

О СВЯЗИ БИОСИНТЕЗА РНК В МИТОХОНДРИЯХ С БИОСИНТЕЗОМ БЕЛКА В ЦИТОПЛАЗМЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

(Представлено академиком А. А. Базевым 17 V 1974)

Установлено, что некоторые компоненты белоксинтезирующей системы митохондрий — ДНК-полимераза (¹), часть белков рибосом (²) — имеют экстрамитохондриальное происхождение. Нельзя также исключить возможности, что и некоторые белки, прямо или косвенно связанные с процессом биосинтеза РНК в митохондриях, имеют экстрамитохондриальное происхождение. Если это так, то длительное избирательное ингибирование цитоплазматического белкового синтеза циклогексимидом (ЦГИ) (³) может в конечном счете привести к образованию дефицита этих белков в митохондриях в результате прекращения их синтеза в цитоплазме и соответственно транспорта в митохондрии, что не может не сказаться на уровне биосинтеза мтРНК.

Настоящее исследование посвящено изучению процессов биосинтеза РНК в митохондриях как *in vivo*, так и в модельных системах *in vitro* в условиях продолжительного угнетения цитоплазматического белкового синтеза ЦГИ.

Параллельно с изучением биосинтеза РНК в митохондриях сравнительно исследовалась динамика изменений меченая общих цитоплазматических белков, «растворимых» белков митохондрий (т. е. тех белков, которые синтезируются в цитоплазме и транспортируются в митохондрии) и «нерастворимых» (продуцируемых собственной белоксинтезирующей системой этих органелл) (⁴) в различные периоды торможения белкового синтеза в цитоплазме ЦГИ.

Антибиотик и радиоактивные предшественники белков и РНК вводились крысам внутривентриально. Доза ЦГИ 0,3 мг на 100 г веса животных. Смесь ¹⁴С-аминокислот белкового гидролизата хлореллы или ¹⁴С-оротовая кислота вводились за 1 час до забоя крыс (соответственно в дозах 50 и 25 мкС на 100 г веса). Митохондрии, из которых получали «растворимые» и «нерастворимые» белки (⁴), выделяли, как описано (⁵). Количество и радиоактивность белков определяли, как и ранее (⁴). Для определения этих же показателей РНК митохондрии обрабатывались по Шмидту — Тангаузеру (⁶). Концентрация гидролизованной РНК определялась по Мейбауму (⁷), а радиоактивность — как в работе (⁸).

Из рис. 1 видно, что на фоне глубокого и устойчивого подавления биосинтеза белков в цитоплазме (рис. 1, I) в начальный период действия ЦГИ (1—3 часа) наблюдается резкое падение удельной радиоактивности (уд. радиоактивность — имп/мин на 1 мг белка) «растворимых» белков митохондрий (рис. 1, II), однако начиная с 6-го часа происходит заметное восстановление этого показателя, а через 24 часа уд. радиоактивность «растворимых» белков даже превышает контрольный (рис. 1, IV) уровень, что связано, очевидно, как с некоторым восстановлением биосинтеза белка в цитоплазме после 3-го часа опыта (рис. 1, I), так и, по-видимому, с интенсификацией транспорта вновь синтезированных белков из цитоплазмы в митохондрии.

Включение метки в «нерастворимые» белки (рис. 1, III), синтезирующиеся на устойчивых к действию ЦГИ миторибосомах (², ⁸), в течение всего эксперимента мало отличается от уровня контроля (рис. 1, IV).

Данные по включению радиоактивных предшественников в РНК митохондрий, полученные по вышеприведенной схеме, показывают, что меченые мтРНК прогрессивно падает с 1-го до 6-го часа, несколько повышаясь, однако, к 12-му часу эксперимента (рис. 2, II). Достаточно хорошая корреляция между динамикой изменения мечения мтРНК и «растворимых» белков митохондрий свидетельствует, очевидно, о наличии зависимости

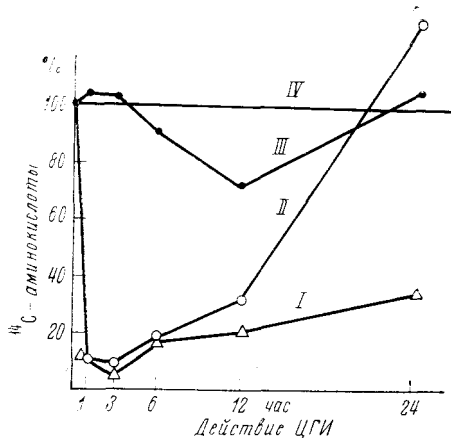


Рис. 1

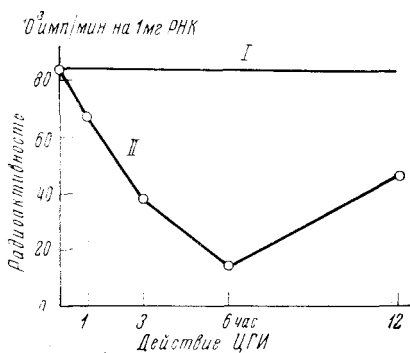


Рис. 2

Рис. 1. Включение ¹⁴C-белкового гидролизата хлореллы в суммарные белки цитоплазмы (I), растворимые (II) и нерастворимые белки митохондрий (III) *in vivo* через разные сроки после подавления биосинтеза белка в цитоплазме ЦГИ. IV – уровень мечения этих белков у контрольных животных

Рис. 2. Включение ¹⁴C-оротовой кислоты в РНК митохондрий *in vivo* через разные сроки после подавления биосинтеза белка в цитоплазме ЦГИ (II). I – контроль без антибиотика

процесса транскрипции в митохондриях от уровня биосинтеза белков в цитоплазме и их транспорта в митохондрии.

В условиях длительного подавления белкового синтеза в цитоплазме ЦГИ в митохондриях может происходить изменение содержания ДНК, РНК-полимеразы, эндогенных предшественников РНК и, возможно, других факторов, каждый из которых либо в отдельности, либо в совокупности может быть причиной наблюдаемых динамических изменений биосинтеза мтРНК.

Определение содержания ДНК в митохондриях во все сроки эксперимента не дало достоверных изменений по сравнению с контролем. Количество ДНК в митохондриях определялось дифениламиновым методом после обработки митохондрий по Шмидту — Тангаузери (⁶). Ниже приведены данные по 2 опытам:

Сроки после введения ЦГИ, час.	Контроль	1	3	6	12
Количество ДНК (мкг) на 1 мг белка митохондрий	0,60	0,72	0,58	0,60	0,48
	0,65	0,75	0,62	0,63	0,50

Изучение биосинтеза мтРНК в системе изолированных митохондрий позволило не только «снять» возможное влияние изменений фонда меченых предшественников РНК, но и оценить также вклад РНК-полимеразной активности в наблюдаемые изменения системы мтРНК *in vivo* (в митохондриях печени крыс РНК-полимераза представлена одним полипептидом с мол. весом 64 000 (⁹)).

На рис. 3 приведены результаты исследования РНК-полимеразной активности в системе изолированных митохондрий (¹⁰) (в качестве меченого предшественника использовалась ³Н-УТФ с уд. радиоактивностью 6,5 С/ммоль). Видно, что митохондрии, выделенные из крыс через 1 час после введения животным ЦГИ, показывают самую низкую РНК-полимеразную активность (рис. 3, II). Через 3 и 6 час. после обработки крыс ЦГИ включение ³Н-УТФ в РНК изолированных митохондрий заметно повышается (рис. 3, III, IV); особенно четко это проявляется в первые 15 мин. после начала инкубации митохондрий. Через 12 час. РНК-полимеразная

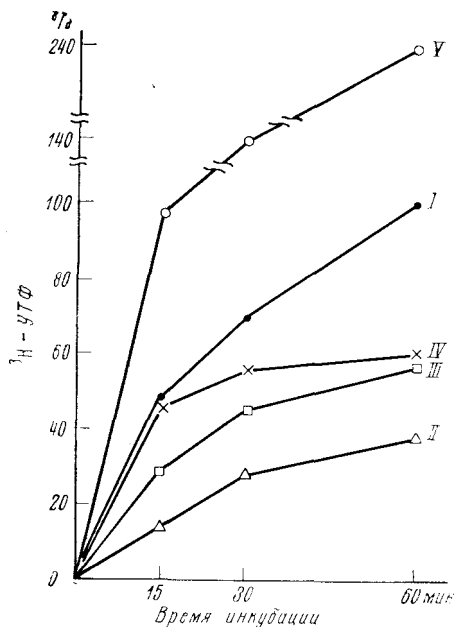


Рис. 3

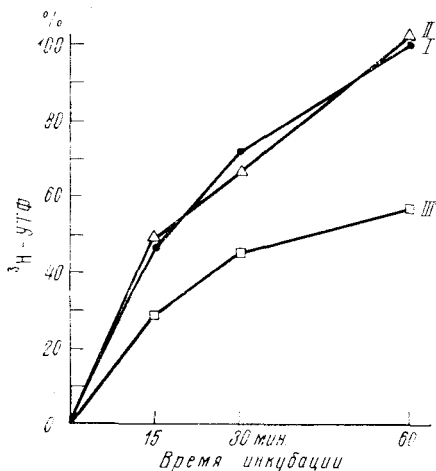


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика включения ³Н-УТФ в РНК в системе изолированных митохондрий из крыс, которым вводился ЦГИ на 1 час (II), 3 часа (III), 6 час (IV) и 12 час (V). I — контроль без антибиотика. Уд. радиоактивность (имп/мин на 1 мг РНК) в каждой точке выражена в процентах от максимальной уд. радиоактивности контроля

Рис. 4. Кинетика включения ³Н-УТФ в РНК изолированных митохондрий в присутствии цитоплазмы. I — митохондрии (контроль) + цитоплазма (контроль), II — митохондрии (антибиотик) + цитоплазма (контроль), III — митохондрии (антибиотик) без добавления цитоплазмы

активность митохондрий превышает контроль в 2,4 раза (рис. 3, V). Таким образом, динамика изменений РНК-полимеразной активности изолированных митохондрий из крыс, обработанных в различное время ЦГИ, довольно хорошо коррелирует с динамикой изменений мечения «растворимых» белков этих органелл (т. е. митохондриальных белков цитоплазматического происхождения) в соответствующие периоды подавления биосинтеза белка в цитоплазме ЦГИ *in vivo* (рис. 1, II). Эту корреляцию легко понять, если допустить, что РНК-полимераза митохондрий, как и целый ряд других «растворимых» белков (^{1, 4}), имеет экстрамитохондриальное происхождение и поступает в митохондрии из цитоплазмы. В пользу этого предположения свидетельствуют также и данные (рис. 4), демонстрирующие восстановление РНК-полимеразной активности в митохондриях (выделенных через 3 часа после начала опыта) при совместной инкубации с цитоплазматической фракцией из нормальных крыс *in vitro* (цитоплазматическая фракция — надосадочная жидкость после центрифугирования клеточного гомогената при 30 000 g). Результаты этого эксперимента, очевидно, можно интерпретировать в том смысле, что дефицит РНК-полимеразы

в митохондриях, выделенных из обработанных ЦГИ животных, компенсируется путем транспорта этого фермента из цитоплазматической фракции в процессе совместной инкубации. К этому необходимо добавить, что недавно Баратом и Кюнтцелем ⁽¹¹⁾ была показана индукция биосинтеза митохондриальной РНК-полимеразы хлорамфениколом (специфическим ингибитором бактериального и внутримитохондриального белкового синтеза ⁽¹²⁾) в клетках *Neurospora crassa*. Указанный результат авторы связывают с экстрамитохондриальным происхождением РНК-полимеразы митохондрий этого представителя низших эукариотов.

В заключение можно отметить, что совокупность полученных нами результатов выявляет значительную зависимость биосинтеза РНК в митохондриях от уровня белкового синтеза в цитоплазме и интенсивности транспорта в митохондрии «растворимых» белков, в частности митохондриальной РНК-полимеразы, которая, по-видимому, и у высших животных имеет экстрамитохондриальное происхождение.

Институт молекулярной биологии и генетики
Академии наук УССР
Киев

Поступило
5 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. J. Ch'ih, G. F. Kalf, Arch. Biochem. Biophys., v. 133, 38 (1969). ² W. Neupert, W. Sebald et al., Europ. J. Biochem., v. 10, 589 (1969). ³ A. C. Trakatellis, M. Montjar, A. E. Axelrod, Biochemistry, v. 4, 10, 2065 (1965). ⁴ А. П. Галкин, Е. В. Пискарева и др., Биохимия, т. 33, в. 5, 981 (1968). ⁵ Ю. П. Мигрохин, А. П. Галкин и др., Укр. биохим. журн., № 3, 294 (1973). ⁶ G. Schmidt, S. Thannhauser, J. Biol. Chem., v. 161, 83 (1945). ⁷ В. В. Мейбаум, Биохимия, т. 10, 353 (1945). ⁸ M. R. Siegel, H. D. Sissler, Biochim. et biophys. acta, v. 103, 558 (1965). ⁹ B. D. Reid, P. Parsons, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 2830 (1971). ¹⁰ S. Fukamachi, B. Bartov, K. B. Freeman, Biochem. J., v. 128, 299 (1972). ¹¹ Z. Barath, H. Kuntzel, Nature New Biol., v. 240, 195 (1972). ¹² P. Borst, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 333 (1972).