

УДК 577.153

БИОХИМИЯ

Академик АН УзССР Я. Х. ТУРАКУЛОВ, М. Х. ГАЙНУТДИНОВ,
Р. С. САЛИХОВ, Б. ЗАЙНУТДИНОВ, З. З. ГИЗАТУЛЛИНА

ВЫДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ МИТОХОНДРИЯМИ

Митохондрии в клетке структурно и функционально гетерогенны, причем эта гетерогенность увеличивается, когда клетка попадает в неблагоприятные условия. В нашей предыдущей работе было показано, что «поврежденные» до стадии высокоамплитудного набухания митохондрии, полностью утратившие способность к окислительному фосфорилированию и активному транспорту ионов Ca^{2+} , оказывают влияние на параметры транспорта ионов Ca^{2+} в intactных митохондриях ⁽¹⁾. Было показано, что при высокоамплитудном набухании, индуцированном тироксином и ионами

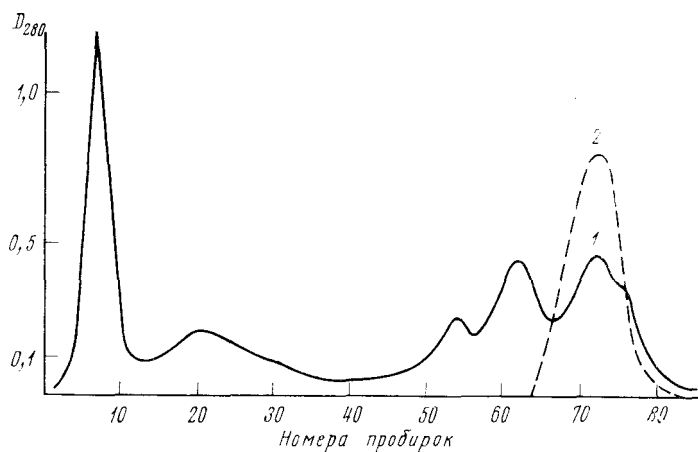


Рис. 1. Гель-фильтрация «секрета» митохондрий, очищенного нагреванием при 95° на колонке сефадекс G-50. Пробы собирали по 6 мл. Здесь и на рис. 2 и 3: 1 — D_{280} , 2 — активность

Ca^{2+} , из митохондрий печени выходит термостабильный «фактор», который в низких концентрациях увеличивает кальциевую емкость и дыхательный контроль intactных митохондрий. Мы предположили, что при адаптации популяции митохондрий в клетке к повреждающему воздействию имеет место такое взаимодействие между «поврежденными» и intactными митохондриями ⁽²⁾.

Целью настоящей работы было выделение и очистка «фактора», обеспечивающего взаимодействие между митохондриями.

Повреждающим агентом в наших опытах служил тироксин в относительно высоких концентрациях. Митохондрии печени кролика (14 мг белка в 1 мл) преинкубировали в 0,1 *M* KCl+0,01 *M* трис (pH 6,35) 30 мин. в присутствии $6 \cdot 10^{-5}$ тироксина. Затем суспензию митохондрий центрифугировали 30 мин. в присутствии $6 \cdot 10^{-5}$ *M* тироксина, после чего суспензию митохондрий центрифугировали 30 мин. на холоду при 10 000 *g*. Надосадочную жидкость нагревали 20 мин. при 93° и подвергали повторному цент-

рифугированию. Надосадочную жидкость № 2 концентрировали на роторном испарителе и наносили на колонку с сефадексом G-50 (колонка 25×600 мм), которую уравнивали и элюировали средой инкубации митохондрий.

В полученных фракциях определяли оптическую плотность при 280 нм. Было получено 5 пиков по оптической плотности, причем активность обнаружена только в последнем пике (рис. 1). Измерение оптической плотности

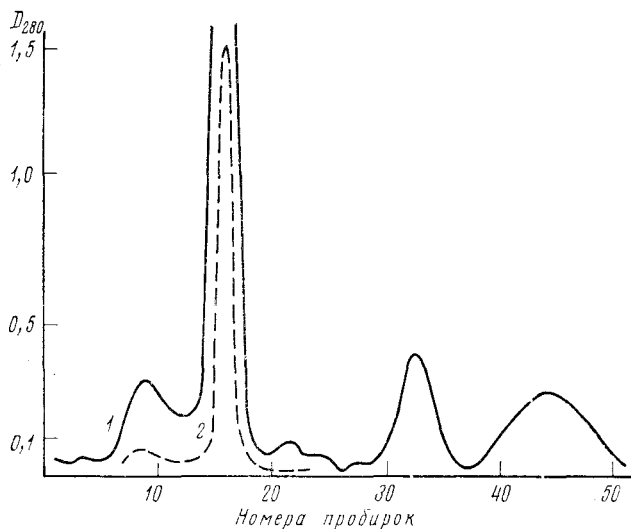


Рис. 2. Гель-фильтрация пика № 5 после колонки сефадекса G-50 на колонке сефадекса G-10. Пробы собирали по 5 мл

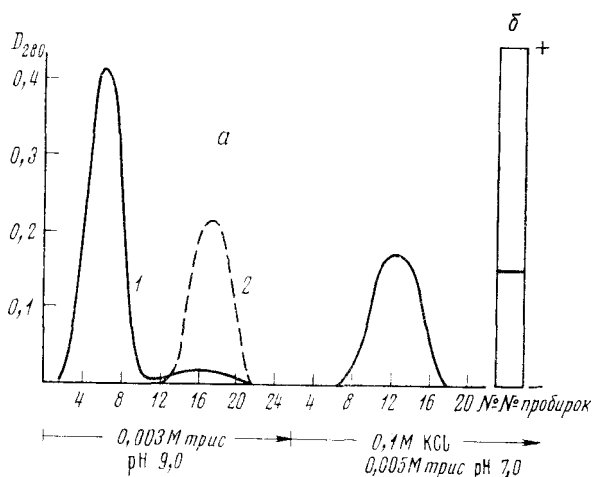


Рис. 3. а — очистка «фактора» на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Колонку уравнивали и элюировали 0,002 М трис-хлоридом, pH 8,7, с последующей элюцией 0,002 М трис-хлоридом + 0,1 М KCl pH 7,2. Пробы собирали по 5 мл. б — электрофорез фракции, обладающей активностью, на полиакриламидном геле

при 260 нм показало наличие в этой фракции свободных нуклеотидов. Зону пика № 5 собирали, концентрировали на роторном испарителе и наносили на колонку с сефадексом G-10 (колонка 15×400 мм), которую уравнивали и элюировали дистиллированной водой. Получено 4 пика по оптической плотности при 280 и 260 нм. Активность обнаружена в самом боль-

шом втором пике (рис. 2), в котором основную часть препарата составляли свободные нуклеотиды. Было выявлено и некоторое количество белкового материала (определение белка по Лоури) ⁽³⁾.

На основании сефадекс-гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-50 и G-10 можно сделать вывод о небольшой величине молекулярного веса нашего «фактора».

Дальнейшую очистку «фактора» проводили на колонках с ионообменными целлюлозами. После гель-фильтрации на сефадексе G-10 фракцию 2,

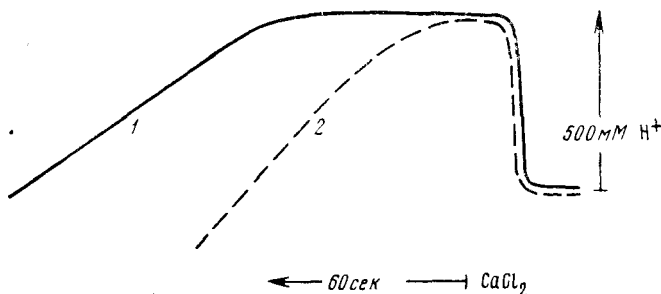


Рис. 4. Влияние фракции № 2 (после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе) на параметры транспорта Ca^{2+} в митохондриях. Состав среды инкубации в M : KCl 0,1, сукцинат $5 \cdot 10^{-3}$, трис 10^{-2} , рН 6,35; фосфат $1 \cdot 10^{-3}$ M , ротенон 0,5 мкг/мл, MgCl_2 0,5 M , митохондрии 2 мг белка в 1 мл, «фактор» добавляли в концентрации 0,3 мг белка на 1 мл.
1 — «фактор», 2 — контроль

содержащую активный компонент, наносили на колонку с КМ-целлюлозой (15×200 мм), которую уравнивали и элюировали 0,003 M трисхлоридом, рН 6,0. При этом часть материала, содержащая активность, не сорбировалась на колонке, но дальнейшее элюирование 0,2 M KCl показало наличие балластных компонентов, не содержащих активность. Во фракции, которая содержала активность, доводили рН до 8,7 и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (15×200 мм).

При этом было получено 3 пика по оптической плотности, причем активность обнаружена во втором пике (рис. 3а). Во фракции, содержащей активность, показали наличие пептидных связей (определение белка по Лоури) ⁽³⁾. Так как экстинкция при 260 нм незначительная, можно предположить отсутствие нуклеотидов. Далее был поставлен диск-электрофорез по Дэвису ⁽⁴⁾ в щелочной среде (трис-глициновый буфер рН 8,3). При этом на электрофореграмме выявлено одно пятно (окраска амидочерным) (рис. 3б). На рис. 4 показано, что эта фракция увеличивает способность митохондрий печени крыс поддерживать градиенты Ca^{2+} и H^+ на мембране.

Полученные данные говорят о полипептидной природе «фактора», обеспечивающего взаимодействие между интактными и поврежденными митохондриями.

Таким образом, при набухании митохондрий, индуцированном тироксинам, из них выходит «фактор» пептидной природы, который обладает стабилизирующим действием на митохондриальную мембрану.

Институт биохимии
Академии наук УзССР
Ташкент

Поступило
4 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Х. Гайнутдинов, В сб.: Биология и научно-технический прогресс, Пушкино, 1974, стр. 183. ² Я. Х. Туракулов, М. Х. Гайнутдинов и др., ДАН, т. 220, № 1 (1975).
³ O. Lowry, J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁴ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 404 (1964).