

Н. Г. ШУПЕ, Н. В. АДРИАНОВ, Ю. А. БЛЕДНОВ

СИНТЕЗ РНК В РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 1 I 1975)

Одним из возможных путей исследования биогенеза митохондрий является изучение их гетерогенности. Гетерогенность митохондрий была показана гистохимическими ⁽¹⁾, электронномикроскопическими ⁽²⁾ и биохимическими методами ⁽³⁾. В последнем случае критериями гетерогенности обычно служили различия в активности ряда митохондриальных ферментов. Очевидно, что наблюдаемая гетерогенность митохондрий должна каким-то образом отражаться и в процессе функционирования собственного генетического аппарата митохондрий. В данной работе исследовался синтез РНК *in vivo* и *in vitro* в различных фракциях митохондрий печени крыс.

Митохондрии выделяли из печени крыс ⁽⁴⁾, центрифугировали в линейном градиенте Фиколла 0–11%, приготовленном на 0,25 М сахарозе + 0,01 М трис-HCl-буфер, pH 7,4. Использование градиента Фиколла, полимера с высоким молекулярным весом, вместо градиента сахарозы позволяет избежать набухания митохондрий, которое наблюдается при использовании высоких концентраций сахарозы ⁽⁵⁾. Результаты фракционирования представлены на рис. 1. Приведена кривая распределения количества белка по фракциям митохондрий. Наибольшее количество митохондрий выделяется из 5–7 фракций градиента. В дальнейшем эти фракции градиента мы будем называть фракцией «средних» митохондрий. Две первые фракции градиента мы обозначим как фракцию «тяжелых» митохондрий, а фракции с 8-й и 10-ю — как «легкие» митохондрии. Полученное распределение не связано с загрязнением митохондрий микросомальной фракцией, так как активность гл-6-фосфатазы, маркерного фермента микросом ⁽⁶⁾, становится заметной только в последних фракциях митохондрий (рис. 1). В остальных фракциях активность гл-6-фосфатазы незначительна и постоянна по величине. Представленное на рис. 1 распределение митохондриального белка не является также следствием различной степени разрушения митохондрий во время выделения. На это указывают результаты определения количества РНК в различных фракциях митохондрий (рис. 2). Во фракциях тяжелых и средних митохондрий содержание РНК на 1 мг белка постоянно и равно 15 мкг РНК на 1 мг белка. Во фракции легких митохондрий, в соответствии с данными по распределению микросом, количество РНК увеличивалось. После обработки РНКазой во всех фракциях митохондрий содержание РНК равно 9 мкг на 1 мг белка, что хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым содержание РНК в митохондриях составляет 10 мкг на 1 мг белка ⁽¹⁰⁾. Поскольку РНКазы не проникают через мембрану целых митохондрий ⁽¹¹⁾, то полученные результаты позволяют считать, что митохондрии после центрифугирования в градиенте Фиколла остаются неразрушенными.

Для изучения биосинтеза РНК в различных фракциях митохондрий крысам внутрибрюшинно вводили ¹⁴C-оротовую кислоту по 12,5 мкС на 1 г веса. Полученные результаты представлены на рис. 3. Наибольшее включение наблюдается во фракции средних митохондрий. Подобное распределение активности меченой РНК по фракциям митохондрий не зависело от времени включения предшественника и оставалось постоянным при 3, 6 и

16 час. включения, изменялась только удельная радиоактивность РНК. В отличие от включения меченого предшественника *in vivo*, активность синтеза РНК в различных фракциях митохондрий в системе *in vitro* имела другую картину распределения (рис. 3). Наиболее активный синтез РНК наблюдался во фракции тяжелых митохондрий, во фракции средних митохондрий активность синтеза РНК резко падала и затем вновь незначительно возрастала во фракции легких митохондрий. Резкий подъем включения меченого предшественника в РНК тяжелых митохондрий мог быть связан

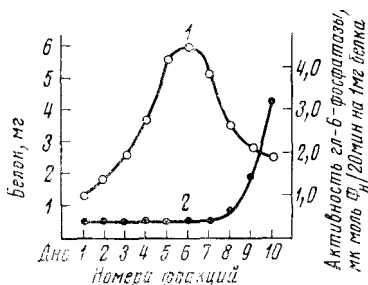


Рис. 1

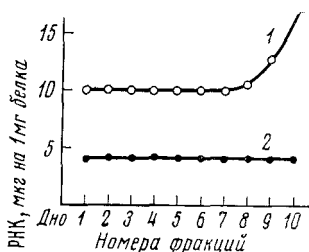


Рис. 2

Рис. 1. Распределение количества белка и активности гл-6-фосфатазы по фракциям митохондрий. Выделенные митохондрии ресуспендировали в растворе выделения, наслаивали на линейный градиент Фиколла 0—11% и центрифугировали 7 мин. при 8000 об/мин на «Spinco» L2 в роторе SW 25.2. Затем в 10 фракциях митохондрий определяли белок по Лоури (7) и активность гл-6-фосфатазы (8). 1 — белок; 2 — активность гл-6-фосфатазы

Рис. 2. Содержание РНК в различных фракциях митохондрий. Митохондрии ресуспендировали в растворе 0,6 *M* сахарозы+0,01 *M* трис-НСI-буфер, рН 7,4, и инкубировали 30 мин. при 30° с 50 мкг/мл РНКазы. РНК определяли орциновым методом (9). 1 — содержание РНК без обработки РНКазой, 2 — после обработки РНКазой

с тем, что в этих митохондриях увеличено содержание ДНК. Кривые распределения ДНК по фракциям митохондрий и активность включения предшественника в РНК в системе *in vitro* в расчете на 1 мкг митохондриальной ДНК приведены на рис. 4. Видно, что в тяжелых митохондриях содержание ДНК значительно выше, чем в других фракциях. Содержание ДНК во фракции легких митохондрий также несколько выше, чем в средних митохондриях. Существенно, что при пересчете активности включения предшественника в РНК на 1 мкг митохондриальной ДНК характер распределения активности по фракциям митохондрий не изменяется. Таким образом, полученное нами распределение активности синтеза РНК не связано только с различным содержанием ДНК во фракциях митохондрий.

Различия в синтезе РНК *in vivo* и *in vitro* можно объяснить следующим образом. Известно, что *in vivo* предшественник включается во все виды РНК митохондрий: рРНК, мРНК и тРНК, тогда как в системе *in vitro* предшественник включается в основном в рРНК. Поэтому наблюдаемое отличие может объясняться синтезом различных типов РНК в различных фракциях митохондрий. Кроме того, следует иметь в виду, что *in vivo* наблюдается значительный транспорт (13, 14) мРНК ядерного происхождения в митохондрии. Следовательно, полученные различия могут указывать на разную способность активности такого транспорта в различных фракциях митохондрий. В свою очередь различное содержание мРНК может обуславливать различную активность белкового синтеза во фракциях митохондрий. Однако эти предположения требуют экспериментального подтверждения.

В заключение нам хотелось бы обратить внимание на следующее обстоятельство. В последнее время значительный интерес вызывает изучение взаимосвязи энергодающих систем и биосинтетических процессов (^{3, 15, 16}). Однако все указанные работы были выполнены с использованием ингибиторов энергетического обмена, что не всегда позволяет удовлетворительно объяснить полученные результаты. В то же время показано, что митохондрии можно разделить на фракции, различающиеся по активности некото-

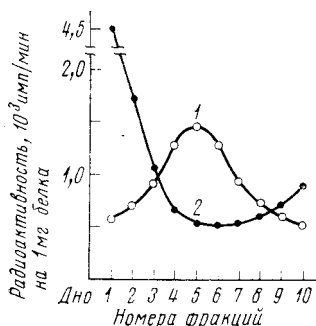


Рис. 3

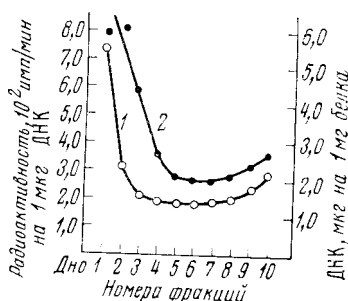


Рис. 4

Рис. 3. Синтез РНК *in vivo* и *in vitro* в различных фракциях митохондрий. Митохондрии в системе *in vitro* инкубировали в стандартных условиях (⁴). Реакцию останавливали добавлением 5% ТХУ и осадок наносили на мембранные фильтры AUF5 («Hirana», «Sinprot»). Радиоактивность определяли в сцинтиляционном счетчике «Intertechnik» SL-30, Франция. 1 — включение меченого предшественника в РНК *in vivo*, 2 — в РНК *in vitro*

Рис. 4. Синтез РНК *in vitro* в различных фракциях митохондрий в зависимости от содержания ДНК. ДНК определяли по методу Бартона (¹²). 1 — содержание ДНК; 2 — включение меченого предшественника в РНК в расчете на 1 мкг ДНК

рых дыхательных ферментов (^{3, 17}). Эти результаты наряду с данными, полученными в настоящей статье, позволяют надеяться, что предложенная модель может быть с успехом использована для изучения взаимосвязи энергетики с процессами биосинтеза.

Второй Московский государственный
медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поступило
23 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. B. Novikoff, J. Histochem. Cytochem., v. 7, 240 (1959). ² A. B. Novikoff, W. I. Shin, J. Microsc. (Paris), v. 3, 187 (1964). ³ M. A. Wilson, J. Cascarano, Biochem. J., v. 129, 209 (1972). ⁴ Ю. А. Бледнов, Л. Ф. Панченко, Н. Г. Шунне, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 11, 44 (1974). ⁵ H. Beaufay, P. Jacques et al., Biochem. J., v. 92, 184 (1964). ⁶ G. E. Palade, P. Siekevitz, J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 2, 171 (1956). ⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁸ H. Matthies, Acta biol. med. germ., v. 1, 405 (1958). ⁹ В. В. Мейбаум, Биохимия, т. 10, 353 (1945). ¹⁰ В. С. Гайцхоки, Л. С. Рахимбекова, Мол. биол., т. 3, 315 (1969). ¹¹ D. G. Humm, I. H. Humm, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 55, 114 (1966). ¹² K. Burton, Biochem. J., v. 62, 315 (1956). ¹³ О. И. Киселев, В. С. Гайцхоки, Биохимия, т. 37, 1224 (1972). ¹⁴ N. G. Avadhani, N. Battula, R. J. Rutman, Biochemistry, v. 12, 4122 (1973). ¹⁵ Г. Г. Гаузе, Л. Г. Фаткуллина, ДАН, т. 202, 1208 (1972). ¹⁶ Е. А. Пинус, Я. М. Рабинович, В. П. Скулачев, Биохимия, т. 38, 730 (1973). ¹⁷ Ю. А. Бледнов, Л. Ф. Панченко, Н. Г. Шунне, Матер. Всесоюз. симп. Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур, М., 1974, стр. 20.