

А. А. ГАЛОЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, Дж. В. ГАРИБЯН

О ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ, ВНЕМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ, ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЕ МОЗГА

Известно, что основные модельные опыты, раскрывающие интимные биохимические механизмы синтеза белков, были сделаны с микроорганизмами, в частности с *Escherichia coli*. Благодаря относительной неспецифичности рибосом они могут служить в равной степени и для синтеза высокоспецифических полипептидов (АКТГ) при наличии в бесклеточной системе синтеза белка соответствующих информационных РНК, выделенных из аденогипофиза [5, 6, 7].

Эти данные показывают сходство не только общих принципов организации механизма синтеза белка (начиная от микроорганизмов и кончая специализированными клетками высших животных), но и основных субстанций, на которых происходит синтез белка.

Однако нам представляется, что у каждого из видов, стоящего на разных ступенях эволюционного развития, а также у клеток с различной степенью дифференцировки, наряду с общими принципами должен быть ряд специфических сторон механизма синтеза белка. Для выявления многообразия механизмов возможных альтернативных путей синтеза различных белков необходимо изучение и сопоставление всех компонентов синтеза их у самых различных организмов и тканей.

Интерес к такой проблеме возник при изучении механизмов синтеза и выделения полипептидно-белковых гормонов гипоталамо-нейрогипофизарной системы.

В связи с этим важно отметить, что, несмотря на наличие незначительной пространственной разобщенности таламических и гипоталамических нейронов, именно в гипоталамических нейронах сосредоточены механизмы синтеза многочисленных полипептидно-белковых гормонов особого значения. В гипоталамических нейросекреторных ядрах сосредоточены в большом количестве различные медиаторы нервной активности, могущие, по нашим данным, сыграть важную роль в синтезе и выделении нейросекреторных гормонов [1, 15]. Уже эти факты наводили на мысль, что механизмы синтеза белков-гормонов в нейросекреторных клетках гипоталамуса, по-видимому, могут идти весьма своеобразно с участием медиаторов нервной активности. Изучение этих специфических сторон синтеза белков-гормонов находится в центре нашего внимания вот уже несколько лет. Интерес представляют и механизмы синтеза полипептидов и белков в нейрогипофизе, где отсутствуют нейроны

и имеются почти только питуициты-глиальные клетки. Долгое время считали, что в нейрогипофизе не образуются биологически активные полипептиды и белки. До настоящего времени считают, что нейрогипофиз является резервуаром гипоталамических гормонов. Однако за последние годы из нейрогипофиза животных нами было выделено 10 водорастворимых белковых фракций, из которых некоторые были физиологически активными [2].

Мы допустили возможность наличия собственных механизмов синтеза специфических белков и полипептидов в самом нейрогипофизе. Нами были выделены из нейрогипофиза все известные типы нуклеиновых кислот: РНК (низкомолекулярная цитоплазматическая), р-РНК (рибосомальная цитоплазматическая), и-РНК (информационная), митохондриальная РНК, ядерная—низкомолекулярная и полимерная РНК.

В супернатанте гомогената нейрогипофиза после осаждения ядер и митохондрий при $1800 \times g$ в течение 45 мин. нам удалось обнаружить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), условно названную нами лабильной ДНК (с целью подчеркнуть возможность ее выхода из ядра) [3]. Мы полагали, что она может принимать участие в механизмах синтеза специфических белков и гормонов, в активных секреторных процессах. Поэтому мы задались целью выделить из различных частей мозга (гипоталамус, нейрогипофиз, большие полушария) «лабильную» ДНК и изучить ее нуклеотидный состав.

Приводим данные о выделении цитоплазматической ДНК, локализованной вне митохондрий.

15 г нервной ткани гомогенизировали в гомогенизаторе Уоринга в течение 2-х мин. в присутствии 6% ПАСК при 20° , в течение часа гомогенат центрифугировали при $18000 \times g$ 30 мин при 4° ; осадок использовали для получения ядерной ДНК. Суспензию осадка в 125 мл 0,14 М NaCl встряхивали с равным объемом 90% фенола, pH 8, в присутствии 6% ПАСК при 20° , в течение часа гомогенат центрифугировали при 0° $700 \times g$. Водный слой вновь депротенизировали 90% фенолом, pH 8, в присутствии ПАСК. К водному слою, полученному после центрифугирования, в течение 1 часа при 0° при $700 \times g$ приливали 2,5 объема 96% этанола. Полученные нити нативной ДНК наматывали на стеклянную палочку и хранили в спирте.

Супернатант, полученный после центрифугирования при $18000 \times g$, использовали для получения «лабильной» ДНК, добавляя равный объем 90% фенола, pH 6; смесь энергично встряхивали при 20° в течение часа и центрифугировали при 0° в течение часа при $700 \times g$. Препарат РНК с ДНК из надосадка осаждали 2,5 объемами 96% спирта в присутствии 1/10 объема 20% ацетата калия в течение ночи при 4° .

Полученный осадок высушивали и гидролизовали 0,5н NaOH в течение 24 часов, из гидролизата негидролизованную ДНК осаждали на холоду при pH 2.

Нуклеотидный состав ядерной и «лабильной» ДНК определяли после кислотного гидролиза 57% HClO_4 в течение 2,5 часов при 100° , методом хроматографии на бумаге в системе метанол-НСl-вода (7:2:1); ультрафиолетпоглощающие пятна оснований элюировали в 5 мл 0,1н HCl, в случае гуанина—0,5н HCl. Для количественного анализа пользовались расчетными коэффициентами Уайта [8]. Элюаты спектрофотометрировали на спектрофотометре СФ-4А.

Нуклеотидный состав «лабильной» ДНК приводится в таблице. Как видно из таблицы, коэффициент отношения $\frac{Г+А}{Ц+Т}$ для нейрогипо-

физа и гипоталамуса равен единице как для ядерной, так и для цитоплазматической ДНК, что свидетельствует, по-видимому, о специфичности спаривания нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Этот коэффициент, а также отношения $\frac{A}{T}$, $\frac{G}{C}$, которые равны почти единице, также свидетельствуют о двойной спирали цитоплазматической ДНК. Представляет интерес также коэффициент отношения $\frac{A+T}{G+C}$, равный в нейрогипофизе и в гипоталамусе для ядерной ДНК 1,6, в то время как для цитоплазматической ДНК, немитохондриальной локализации, в гипоталамусе и в нейрогипофизе—1,4.

Почти такой же коэффициент имеет ДНК высших животных и человека [9]. Следует отметить, что указанный коэффициент варьирует у различных видов животных.

Таблица

Нуклеотидный состав лабильной и цитоплазматической ДНК мозга

	Г	А	Ц	Т	$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{G+A}{C+T}$
Нейрогипофиз						
Ядерная	21,0	30,0	17,0	32,0	1,6	1,04
Надосадовочная	21,0	29,5	19,0	29,5	1,4	1,04
Гипоталамус						
Ядерная	21,0	30,0	17,0	32,0	1,6	1,04
Надосадовочная	21,0	28,8	18,9	30,6	1,4	1,02
Большие полушария головного мозга						
Ядерная	20,5	28,0	21,0	30,5	1,4	0,94
Надосадовочная	20,0	29,8	17,5	33,5	1,6	0,93

Как видно из таблицы, в нуклеотидном составе ядерной и «лабильной» ДНК изученных частей мозга существенной разницы нет.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ДНК в цитоплазме нервных клеток и глии (например, гипофиза), где имеются только глиальные клетки, физико-химические свойства и роль которой изучаются нами.

Имея в виду многообразие функций нервных элементов, а также быстроту нервных процессов нам представляется, что в цитоплазме нервных клеток может иметь место ряд альтернативных путей синтеза белка. Вместе с тем высокоспециализированные нервные клетки должны иметь механизмы исключительно экономного синтеза белка. Поэтому мы допускаем, что обнаруженная нами цитоплазматическая ДНК может играть важную роль в механизмах синтеза белка в цитоплазме, вне митохондрий.

По-видимому, наиболее целесообразным является выход из ядра определенных количеств ДНК, временами, непосредственно в цитоплаз-

му и образование РНК на матрице ДНК. Поэтому представляет интерес выявить ДНК-зависящую РНК-полимеразу, а также ДНК-зависящую ДНК-полимеразу в цитоплазме вне митохондрий. Не исключена возможность, что сама «лабильная» ДНК при взаимодействии с рибосомами может служить непосредственно матрицей для синтеза белка. При этом, можно полагать, что выделенная нами ДНК из цитоплазмы является гетерогенной. Для выяснения вышеуказанных гипотез нами предприняты соответствующие исследования.

Можно полагать, что существуют глубокие механизмы взаимоотношений и взаимодействий цитоплазматической ДНК с рибосомами в процессе синтеза белка, контролируемом ядром. Возможность образования ДНК-рибосомального комплекса *in vitro* показал Ниренберг [19]. В доступной нам литературе мы не нашли данных о наличии цитоплазматической ДНК немитохондриальной локализации в клетках животных. Ее локализация вне ядра доказана только для клеток овоцитов и яйцеклеток пресмыкающихся, птиц, костистых и осетровых рыб [10].

О неоднородности ядерной ДНК в последнее время появилось значительное число исследований [4, 11, 13, 14, 16, 26, 27, 28, 29].

Сателлитная ДНК ядра отличается высокой метаболической активностью и, по мнению ряда авторов, является двунитчатой и способной к репликации независимо от основной, генетически стабильной ДНК [10, 12, 17, 20, 21, 22]. В пользу функциональной автономности сателлитной ДНК при различных физиологических состояниях клетки говорит ряд работ. Розльс [24] наблюдал увеличение содержания ДНК в ядре клеток коры надпочечника при гормональной стимуляции. Избыточный синтез ДНК, независимый от митозов, описан в передней доле гипофиза [18]. Было показано, что в активносекретирующих отделах железы прядильных пауков, при отсутствии митозов, имеет место синтез ДНК [23]. Мирский и сотр. описали активные и репрессивные фракции ДНК лимфоцитов зубной железы телят [14]. Гетерогенность ядерной ДНК по нуклеотидному составу, метаболической активности и физико-химическим свойствам изучена также на примере растительной ткани [4, 25].

Далеко неполный перечень данных показывает, что «избыточная» ДНК синтезируется в клетке в условиях интенсивного синтеза белков.

Полученные нами, а также литературные, данные указывают на то, что цитоплазматическая ДНК может играть важную роль в синтезе белков в цитоплазме, а также, возможно, выполнять другие неизвестные функции.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 7.V 1970 г.

Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ, Զ. Վ. ԳԱՐԻԲՅԱՆ

ՈՒՂԵՂԻ ԶԻՏՈՊՈՒՄԱՅԻՆ ԱՐՏԱՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԼ
ԴԵԶՈՔՄԻՌԻՐՈՆՈՒԿԼԵԱԹԹՎԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներդրողները, հիպոթեզային և ուղեղի կիսագնդերի բջիջների կորիզների և միտոքոնդրիանների հեռացումից հետո ցիտոպլազմայից անջատել են

դեգոբսիոնիբոնուկլիաթթու և ուսումնասիրել վերջինիս նուկլեոտիդային կազմը: Այս ԴՆԹ-ն պայմանականորեն անվանել ենք լաբիլ ԴՆԹ, նշելու համար այն, որ վերջինս կարող է ֆիզիոլոգիական պայմաններում դուրս գալ կորիզից և ցիտոպլազմայում կարևոր դեր խաղալ սպիտակուցների սինթեզի գործում:

Ննթադրվում է, որ այդ ԴՆԹ-ն կարող է իր մակերեսի վրա, ցիտոպլազմայում սինթեզել ինչպես ԴՆԹ, ԻԴՆԹ, այնպես էլ որոշ սպիտակուցներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965.
2. Галоян А. А., Абелян Ж. Г. Тезисы доклада на IV Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Тарту, 1966.
3. Галоян А. А., Захарян Р. А., Абелян Ж. Г. Вопросы биохимии мозга, т. IV, 157, Ереван, 1968.
4. Конарев В. Г., Гилязетдинов Ш. Я., Тютерев С. А. ДАН СССР, 166, 2, 480, 1966.
5. Тодоров И. Н., Блок Л. Н., Васильченко В. Н. Нуклеиновые кислоты, М., 149, 1966.
6. Тодоров И. Н., Блок Л. Н. Доповіді АН УССР, 10, 1331, 1964.
7. Тодоров И. Н., Васильченко В. Н., Панкова Г. А., Набутовская Е. В. Биохимия, 32, 2, 283, 1967.
8. Уайт Г. Нуклеиновые кислоты, И. Л., 448, 1957.
9. Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М., 1967.
10. Шмерлинг Ж. Г. Успехи современной биологии, т. 59, 1, 33, 1965.
11. Ben-Porat. Biochim. Biophys. Acta 61, 150, 1962.
12. Chun E., Littlfield Y. J. Mol. Biol. 7, 245, 1963.
13. Corneo G., Ginnelli E., Polli E. J. Mol. Biol. 23, 619, 1967.
14. Frenster J. M., Allfrey B. G., Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 1026, 1963.
15. Galoian A. A. Pathol. et Biologic. Paris, 9, 566, 1961.
16. Giacomoni D., Corneo G. Biochim. Biophys. Acta 166, 586, 1968.
17. Greenberg L. J., Uhr J. W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 523, 1967.
18. Hymer W. C., Therrien C. D. Exptl. Cell. Res. 54, 3, 407, 1969.
19. Nirenberg M. W. J. Mol. Biol. 11, 1, 1965.
20. Kit S. Mol. Biol. 3, 711, 1961.
21. Kit S. Nature 193, 274, 1962.
22. Mezger-Freed J. Cell. Biol. 18, 471, 1963.
23. Nigen V., Leday M., Nonnemacher I. Bull. Biol. France Belg. 95, 127, 1961.
24. Roel's H. Exptl. Cell. Res., 31, 407, 1963.
25. Sampson M., Kato A., Hotta J., Stern H. Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 459, 1963.
26. Schildkraut L., Mat'o J. Biochim. Biophys. Acta 161, 1, 76, 1968.
27. Skinner D. M., Triplett L. L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 6, 892, 1967.
28. Waring M., Britten R. J. Science 154, 376, 791, 1966.
29. Welsch R. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 887, 1962.

