



На правах рукописи



Гуляева Наталья Александровна

Основные белки митохондрий и их роль в
сохранении митохондриальной ДНК.

03.00.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ПУЩИНО – 2007

Работа выполнена в институте теоретической и экспериментальной биофизики
РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Газиев Ажуб Ибрагимович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Миронова Галина Дмитриевна
доктор биологических наук
Равин Виктор Константинович

Ведущая организация:

Институт химической физики
им НН Семенова РАН, г Москва

Защита состоится 24.01 2007 г в 13³⁰ часов на заседании
Диссертационного совета Д 002 093 01 в Институте теоретической и
экспериментальной биофизики РАН по адресу
142290 г Пушкино, Московская обл , Институтская ул , 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИТЭБ РАН

Автореферат разослан «12» декабря 2006 г

Ученый секретарь
Диссертационного совета
к ф -м н



Ланина Н Ф

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. За последние 10-15 лет интерес к изучению молекулярных механизмов функционирования, мутагенеза, сохранения и стабилизации митохондриальной ДНК (мтДНК) в клетках значительно повысился в связи с выявлением множества «митохондриальных» заболеваний, с выяснением роли мтДНК в развитии дегенеративных процессов, канцерогенезе, клеточной гибели, старении (Wallace, 2005, Scharira, 2006, Maguszak et al, 2006)

В настоящее время мтДНК принято рассматривать как более уязвимую, по сравнению с ядерной ДНК (ядДНК), мишень для различных повреждающих агентов (LeDoux and Wilson 2005) Во многих исследованиях было показано, что в результате действия экзогенных и эндогенных агентов в мтДНК образуется больше нарушений, чем в соразмерном фрагменте яДНК (Khrapko et al, 1997, Marcelino et al, 1999, Kujoth, 2006) ДНК и другие макромолекулы в митохондриях постоянно подвергаются атакам активных форм кислорода (АФК), генерируемых в митохондриях, хотя они и имеют достаточно высокий уровень низкомолекулярных и ферментативных антиоксидантов (Beckman and Ames, 1998; Kelso et al, 2002, Armstrong et al, 2003) Эти органеллы также содержат ряд ферментов репарации ДНК (по крайней мере, ферменты эксцизионной репарации оснований), способных снижать частоту мутаций мтДНК, индуцируемых окислителями или ионизирующей радиацией (ИР) (LeDoux et al, 2001, Газиев и Подлукский, 2003) Однако ни антиоксиданты, ни репарационные ферменты в митохондриях не обеспечивают защиту и стабильность мтДНК в такой же мере, как яДНК, в клетках от действия АФК и свободных радикалов.

Во многих исследованиях и обзорах указывается, что повышенная чувствительность мтДНК к повреждающим агентам обусловлена, прежде всего, отсутствием гистонов и других ДНК-связывающих белков, обеспечивающих компактную укладку мтДНК и ее защиту от действия АФК, генерируемых в самих митохондриях и под действием экзогенных физических и химических агентов (Kang and Hamasaki, 2005, LeDoux and Wilson 2005, Graziewicz et al, 2006) Как известно, в ядрах гистоны играют ключевую роль в структурной организации и упаковке яДНК в хроматине и в значительной мере обеспечивают защиту ДНК от воздействия повреждающих агентов Что касается мтДНК, то вопрос о ее структурно-функциональной организации в митохондриях и возможности формирования комплексов мтДНК с белками, способными снижать атаки АФК и других повреждающих агентов на митохондриальный геном, к началу наших исследований оставались не достаточно ясными Развитие исследований в этом направлении важно для понимания путей защиты, сохранения генома в митохондриях, косвенно участвующего в регуляции множества клеточных процессов Более того, хорошо установлено, что накопление значительного количества повреждений в мтДНК клеток приводит к ухудшению энергозависимого метаболизма в тканях, развитию различных патологий, дегенеративных процессов, ускорению старения и гибели клеток (Brandon, 2006, Kujoth, 2006, Scharira, 2006)

Цель исследования. Цель настоящей работы состояла в исследовании ДНК-связывающих основных белков митохондрий клеток млекопитающих и способности этих белков в составе ДНК-белковых комплексов снижать повреждения мтДНК

Основные задачи исследования.

- 1 Выяснить наличие ДНК-связывающих основных белков в митохондриях тканей крыс, определить их состав и способность формировать комплексы с ДНК *in vitro*
- 2 Исследовать ДНК-белковые комплексы в митохондриях *in vivo* по формированию ДНК-белковых сшивок и активации поли(АДФ-рибозил)ирования белков, индуцируемых ионизирующим излучением.
- 3 Исследовать способность основных белков митохондриальных нуклеоидов снижать уровень повреждений мтДНК, индуцируемых перекисью водорода и ионизирующей радиацией

Научная новизна. Впервые установлено, что митохондрии млекопитающих содержат более 20 основных ДНК-связывающих полипептидов, которые образуют комплексы с ДНК *in vitro*, аналогично ядерным гистонам Впервые показано, что ионизирующая радиация вызывает образование ДНК-белковых сшивок и активацию поли(АДФ-рибозил)ирования белков в митохондриях тканей облученных животных, также как и в ядрах, что свидетельствует о существовании *in vivo* в митохондриях ДНК-белковых комплексов и связи мтДНК с поли(АДФ-рибозил)полимеразой, активируемой при возникновении разрывов цепей мтДНК Впервые продемонстрировано, что основные белки, образующие комплексы с мтДНК и формирующие с ней компактные структуры - нуклеоиды, обеспечивают защиту митохондриального генома, как и гистоны яДНК, от повреждающего действия ионизирующего излучения и перекиси водорода

Научно-практическое значение работы. Представленные в настоящей работе результаты исследования имеют существенное значение для понимания путей защиты, сохранения генетического материала митохондрий, участвующего в регуляции множества клеточных процессов Результаты этой работы представляют несомненный практический интерес, поскольку могут быть использованы при разработке способов повышения устойчивости мтДНК, регуляции энергозависимых процессов и метаболической коррекции различных патологий

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференции «От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям» (Пушино, 2002), на 7-ой, 8-ой и 10-ой школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2003, 2004, 2006), на VI международном симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2004), на всероссийской конференции с международным

участием «Биологические аспекты экологии человека» (Архангельск, 2004); на V Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2006)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах, иллюстрирована 4 таблицами и 22 рисунками. Библиографический указатель содержит 22 источников литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали крыс линии Вистар и мышей неинбредной линии Kv SHK, самцов, массой 180-200 г и 22-25 г, соответственно. Крыс подвергали гамма-облучению на установке Гупос (^{137}Cs) при мощности дозы 125 сГр/мин. Контролем служили необлученные животные. Облучение суспензий митохондрий, нуклеоидов и мтДНК проводили при 1-3⁰С рентгеновскими лучами на установке «РУТ-250-15-1» при мощности дозы 2,05 Гр/мин. Контролем служили необлученные образцы. Сразу же после облучения образцы помещали в лизирующий раствор и проводили выделение мтДНК.

Митохондрии выделяли из печени, селезенки и головного мозга животных общепринятым методом дифференциального центрифугирования (Pedersen et al, 1978). Полученные митохондрии дополнительно очищали от примесей в градиенте сахарозы (Ausenda and Chomyn, 1996) или с использованием дигитонина (Pedersen et al, 1978). Ядра выделяли с использованием метода (Blobel and Potter, 1966). Нуклеоиды митохондрий получали, как указано в работе (Garrido et al, 2003). Выделение гистонов из ядер проводили по методу Боннера с соавт. (Bonner et al, 1968). Этот же метод был использован для получения кислоторастворимых белков из митохондрий с соблюдением тех же условий и процедур, что и для ядерных гистонов. Концентрацию белка в образцах определяли по методу Лоури (Lowry et al, 1951).

Ионообменную хроматографию кислоторастворимых белков митохондрий проводили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Элюцию кислых белков, связавшихся с ДЭАЭ-целлюлозой, проводили с использованием ступенчатого градиента NaCl (100-300 мМ) в том же буфере. Для разделения прочносвязанных кислых и основных белков проводили повторную хроматографию несвязавшихся с ДЭАЭ-целлюлозой белков в присутствии 5 мМ дитиотрейтола (ДТТ).

ДНК из митохондрий и нуклеоидов выделяли с помощью набора реактивов Magnet DNA MegaPrep1, полученных от ООО «Лаборатория Изоген», г Москва (Nishimura et al, 2002). Определение концентрации ДНК проводили на спектрофотометре SmartSpecTMPlus («Bio-Rad», США) при длине волны 260 нм.

ДНК-белковые комплексы получали путем инкубации 50 мкг белка и 10 мкг нативной ДНК в буфере, содержащем 10 мМ трис, рН 7,4 и 1 мМ ЭДТА. Смесь разделяли центрифугированием на супернатант (белки, не связавшиеся с ДНК) и осадок (ДНК-белковый комплекс), которые подвергали электрофорезу в 15%-ПААГ по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Об образовании ДНК-белковых комплексов судили также путем сравнения связывания с актиномицином Д свободной ДНК и ДНК, комплексированной с белком, как указано в работах (Казакова с соавт., 1971, Chen and Sha, 2001). В экспериментах по исследованию защитной функции белков получали ДНК-белковые комплексы в соотношениях белок мтДНК, равных 0, 0,1, 0,5, 1, 5, и 10, которые затем обрабатывали H_2O_2 , как указано в работе (Yakes and van Houten, 1997). Реакцию останавливали добавлением раствора, содержащего детергент, для диссоциации комплекса. Затем из образцов выделяли мтДНК.

Возникновение повреждений в мтДНК оценивали методом ПЦР, путем амплификации длинных фрагментов (long extension PCR). Для синтеза фрагмента мтДНК длиной 15983 пн использовали праймеры MSF1For (5'-TTT ATA GGC TAC GTC CTT CCA TGA GG-3') и MSF1Rev (5'-GGC AGG TAG GTC AAT GAA TGA GTG G-3') (Melov et al 1997). В реакцию вносили 3 нг ДНК. Каждые 25 мкл реакционной смеси для ПЦР содержали: 200 нМ каждого праймера, 200 мкМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 75 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 20 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% твин 20 и 0,5 суммарной единицы смеси *Taq-Pfu* ДНК-полимераз в отношении 16:1. Реакционная смесь была денатурирована при 94°C в течение 4 минут. Далее следовали 27 циклов в режиме денатурация 30 секунд при 94°C и отжиг, и элонгация 12 минут при 68°C, после которых - завершающая инкубация 10 минут при 72°C. Продукты ПЦР разделяли в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Полученные изображения фиксировали с помощью гельдокументирующей системы Док-принт («Vilber Lourmat Systems Inc», Франция) и оцифровывали с помощью программы Windig-2 5-Microsoft Excel.

Анализ ДНК-белковых сшивков (ДБС) проводили путем количественного определения ДНК, связанной с миллипорвыми фильтрами, после элюции с них лизатов ядер и митохондрий в условиях полного удаления свободной одно- и двунитовой ДНК, как указано в работах (Strniste and Rall, 1976, Chiu et al, 1984). Содержание ДНК определяли флуоресцентным методом после реакции с Hoechst 33258, как указано в работе (Cesarone et al, 1979).

Уровень поли(АДФ-рибозил)ирования и моно(АДФ-рибозил)ирования белков ядер и митохондрий определяли как описано в работе (Masmoudi et al, 1988) с введением в реакционную смесь [аденин-2,8- 3H]-НАД («NEN», Германия). Для ингибирования поли(АДФ-рибозил) полимеразы в реакционной смеси использовали 3-аминобензамид (3-АБ) (Banasiak and Ueda, 1994). Реакция АДФ-рибозилирования контролировалась путем обработки модифицированных белков фосфодиэстеразой I. Результаты выражали в имп/мин/200 мкг белка/фильтр. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили на компьютере с использованием программы «Microsoft Excel». Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в виде средних значений ($M \pm m$) (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение основных кислоторастворимых белков митохондрий.

Известно, что процедуры кислотной экстракции (серной или соляной кислотой) обычно используются для получения основных белков ядер - гистонов (Bonner et al., 1968; Yu and Bender, 1995). При кислотной экстракции ядер клеток млекопитающих основные белки (гистоны) растворяются, в то время как негистоновые белки выпадают в осадок. Из митохондрий печени и селезенки крыс экстракцией 0,2 М H_2SO_4 нами были получены кислоторастворимые белки. На рис. 1 представлены электрофореграммы кислоторастворимых белков митохондрий и ядер печени крыс.

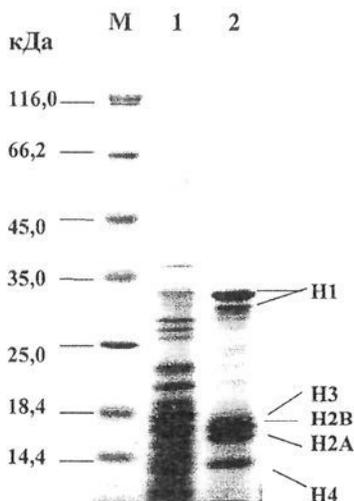


Рис. 1. Электрофореграммы кислоторастворимых белков митохондрий и ядер печени крыс. Дорожки: М – белковые маркеры; 1 – кислоторастворимые белки митохондрий; 2 – гистоны (кислоторастворимые белки) ядер.

Электрофореграммы кислоторастворимых белков ядер представлены пятью фракциями гистонов (рис. 1, дорожка 2), что согласуется с литературными данными (Bonner et al., 1968; Hnilica, 1975). При аналогичной обработке митохондрий печени и селезенки 0,2 М H_2SO_4 также экстрагируются кислоторастворимые белки (рис. 1, дорожка 1). С помощью электрофореза в 15% SDS-ПААГ данные белки разделяются на более чем 20 полипептидов с молекулярными массами от 10 до 120 кДа.

Общепринято, что при обработке ядер клеток млекопитающих 0,2 М H_2SO_4 экстрагируются основные белки – гистоны, поэтому можно предположить, что при аналогичной обработке митохондрий H_2SO_4 экстрагируемые кислоторастворимые белки также преимущественно будут обладать свойствами основных белков и связываться с ДНК.

Полученные препараты митохондриальных кислоторастворимых белков были подвергнуты дальнейшей очистке для удаления возможных примесей в них кислых белков. Для этого нами была проведена ионообменная хроматография кислоторастворимых белков митохондрий на ДЭАЭ-целлюлозе, которая показала, что большая часть данных белков представлена основными белками. Незначительные минорные кислые белки, присутствующие в исходной фракции кислоторастворимых белков, удается отделить на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (рис. 2).

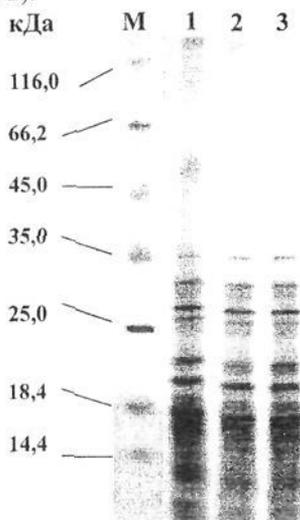


Рис. 2. Электрофореграммы кислоторастворимых белков митохондрий до и после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Дорожки: М – белковые маркеры; 1 – кислоторастворимые белки до хроматографии; 2 – кислоторастворимые белки после хроматографии в отсутствие ДТТ; 3 – кислоторастворимые белки после хроматографии в присутствии 5 мМ ДТТ.

Таким образом, из митохондрий экстракцией 0,2 М H_2SO_4 с соблюдением режима получения препаратов гистонов из ядер мы получили кислоторастворимые белки. Минорные примеси кислых белков из фракции митохондриальных суммарных кислоторастворимых белков удается задержать на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Полученные указанным методом белки мы будем в дальнейшем называть основными белками митохондрий (ОБМ).

2. Исследование комплексов основных белков митохондрий с ДНК *in vitro*.

В последующих экспериментах мы обнаружили, что полученные нами ОБМ образуют устойчивые комплексы с мтДНК и яДНК при физиологической концентрации $NaCl$ (0,15 М). Данные комплексы легко отделяются центрифугированием от ДНК и белков, не образовавших комплекс и находящихся в растворе (рис. 3).

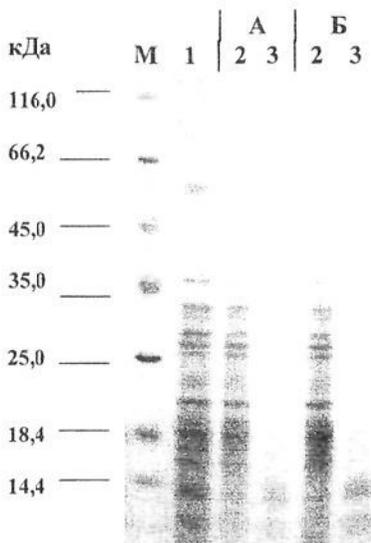


Рис. 3. Электрофореграммы ОБМ, образующих комплексы с ДНК при 0,15 М NaCl. А – ОБМ и яДНК. Б – ОБМ и мтДНК. Дорожки: М – белковые маркеры; 1 – исходные ОБМ; 2 – белки, связавшиеся с ДНК; 3 – белки, не связавшиеся с ДНК.

Об образовании ДНК-белковых комплексов судили также по способности белка конкурировать с актиномицином Д за места связывания с ДНК. Известно, что связывание актиномицина Д с ДНК сопровождается изменением его оптических свойств (Muller and Crothers, 1968; Chen and Sha, 2001). Оказалось, что добавление ОБМ к ДНК в соотношении 1,5:1 уменьшает связывание актиномицина на 47% (кривая 3 приближается к кривой 1), что свидетельствует об образовании ДНК-белкового комплекса (рис. 4).

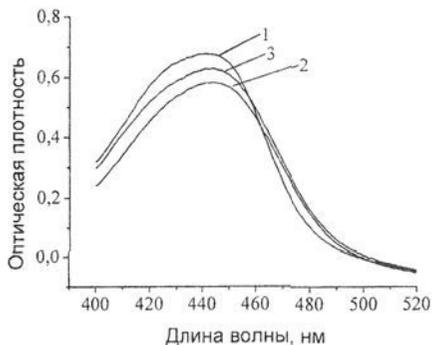


Рис. 4. Спектры поглощения комплексов актиномицина Д с ДНК и комплексом ДНК-ОБМ, реконструированным из ДНК и ОБМ. Кривые: 1 – свободный актиномицин Д; 2 – комплекс ДНК - актиномицин Д; 3 – комплекс ДНК - ОБМ - актиномицин Д (белок:ДНК = 1,5:1).

В отличие от физиологических условий при повышении концентрации NaCl эффективность образования комплексов постепенно снижается, и при 0,6 М NaCl почти не наблюдается (рис. 5). Из литературы известно, что NaCl в

концентрации 0,6 М также предотвращает связывание гистонов ядер с яДНК (Thastrom et al., 2004). Таким образом, ОБМ в отношении формирования ДНК-белковых комплексов ведут себя аналогично гистонам.

NaCl (M) → 0,15 0,35 0,45 0,60 0,70
 1 | 2 3 | 2 3 | 2 3 | 2 3 | 2 3

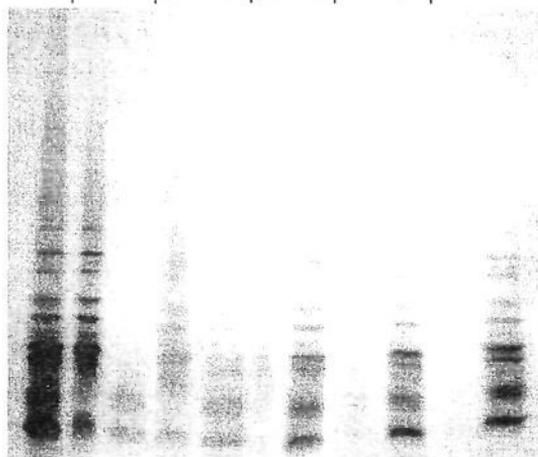


Рис. 5. Электрофореграммы ОБМ, комплексированных с ДНК при различной концентрации NaCl. Дорожки: 1 – исходные ОБМ; 2 – белки, связавшиеся с ДНК. 3 – не связавшиеся с ДНК белки. Наверху стрелкой указана концентрация NaCl (моль/л).

Таким образом, полученные нами ОБМ по своим свойствам близки к гистонам ядер. И те, и другие экстрагируются 0,2 М H₂SO₄, формируют стабильные комплексы с ДНК, образование которых прекращается при близких значениях NaCl. Возможно, обнаруженные нами основные белки в митохондриях *in vivo* формируют комплексы с мтДНК и участвуют в структурной организации мтДНК, регуляции ее функциональной активности и защите ее от различных повреждающих агентов.

3. Выяснение возможной ассоциации белков и мтДНК в митохондриях *in vivo*.

Известно, что в митохондриях значительное количество копий мтДНК организовано в ДНК-белковые комплексы – нуклеоиды (Garrido et al., 2003; Iborra et al., 2004; Legros et al., 2004), которые ассоциированы с внутренней мембраной этих органелл. Существующие в литературе сведения о полипептидном составе митохондриальных нуклеоидов неоднозначны, что обусловлено применением разными авторами различных методов получения митохондриальных нуклеоидов с использованием высоких концентраций солей и различных детергентов (Van Tuyle and McPherson, 1979; Rickwood, 1981). В ДНК-белковых комплексах, полученных при жестких условиях выделения, могут присутствовать только прочно связанные с мтДНК белки, тогда как

белки, лабильно связанные с ДНК (а их, возможно, большинство), в данных комплексах не выявляются.

Мы провели сравнительный анализ состава основных белков, получаемых непосредственно из цельных митохондрий и из нуклеоидов, выделенных из этих же митохондрий (рис. 6). Сравнение электрофореграмм основных белков нуклеоидов и таковых из цельных митохондрий показывает, что полипептидный состав этих фракций различается. Вероятно, при лизисе митохондрий происходит диссоциация лабильно связанных с ДНК белков. Тем не менее, с мтДНК в составе нуклеоидов ассоциировано более 10 полипептидов, что указывает на наличие ДНК-белковых комплексов в митохондриях.

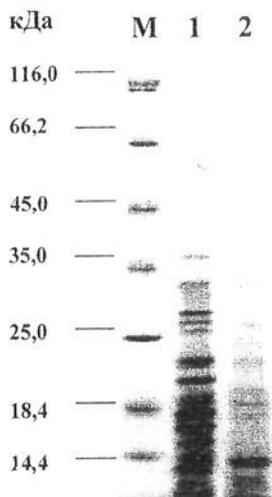


Рис. 6. Электрофореграммы основных белков митохондрий и нуклеоидов из митохондрий. Дорожки: М – белковые маркеры; 1 – основные белки митохондрий; 2 – основные белки нуклеоидов митохондрий.

Таким образом, результаты наших исследований показывают наличие в митохондриях основных белков, образующих стабильные комплексы с ДНК. Несмотря на то, что в митохондриях не обнаруживаются структуры, напоминающие нуклеосомы ядерного хроматина, возможно, *in vivo* в этих органеллах основные белки также образуют компактные комплексные структуры с мтДНК, участвуя в организации ее упаковки и регуляции функциональной активности.

Одним из подходов выявления прочносвязанных нуклеопротеидных комплексов в ядерном хроматине является демонстрация формирования ДБС под действием ИР. Косвенным доказательством прочной ассоциации белков хроматина с ядерной ДНК является также активация поли(АДФ-рибозил)ирования этих белков при индукции разрывов в ДНК, с которой они комплексованы. Мы предположили, что получение данных, свидетельствующих об образовании ДБС и активации поли(АДФ-

рибозил)ирования в митохондриях клеток при действии ИР будет указывать на наличие комплексных структур мтДНК с белками *in vivo*, напоминающих элементы ядерного хроматина

3.1. Формирование ДНК-белковых сшивок в митохондриях тканей крыс, подвергнутых радиационному воздействию. Известно, что радиационный выход повреждений ДНК *in vivo* в значительной мере зависит от уровня оксигенации и эндогенной защиты в микроокружении генома. Это в равной мере относится и к образованию ДБС (Zhang et al., 1995, Газиев, 1999). Уровень оксигенации (или АФК) значительно выше в митохондриях по сравнению с ядрами клеток. Поэтому можно ожидать образование ДБС не только в ядре клетки, но и в митохондриях в результате действия АФК и ИР при наличии в этих органеллах нуклеопротеидных ассоциатов. В формировании ДБС играет роль и компактность укладки ДНК в ассоциации с белками или изменение ее конформации в зависимости от функциональной активности.

Мы обнаружили, что в митохондриях и ядрах клеток тканей головного мозга (постмитотической ткани) и селезенки (пролиферирующей ткани) необлученных животных содержится от 0,5 до 1,5% прочно связанной с белками ДНК (не подвергающейся диссоциации в растворе 3 М NaCl) (табл. 1). Несмотря на то, что в митохондриях процент такой ДНК более чем в два раза меньше, чем в ядрах, данные результаты указывают на наличие прочно связанных ДНК-белковых комплексов не только в ядре, но и в митохондриях. Возможно, прочно связанные с мтДНК белки, регистрируемые в данном случае, относятся к белкам митохондриальных нуклеоидов, которые участвуют в компактизации мтДНК и формировании ее связи с митохондриальным матриксом.

Таблица 1.

Количество ДБС (% ДНК, остающейся на фильтрах) в клеточных ядрах и митохондриях из тканей крыс после воздействия γ -излучения

Доза облучения, Гр	Головной мозг	Селезенка
Ядра клеток		
0	1,45±0,1	1,27±0,09
5	2,28±0,14	1,83±0,12
10	3,23±0,16	2,59±0,19
Митохондрии		
0	0,61±0,04	0,48±0,03
5	1,93±0,13	1,31±0,09
10	3,02±0,20	2,19±0,16

При остром воздействии γ -излучения содержание ДБС в ядрах и митохондриях клеток тканей крыс существенно возросло (табл. 1). Так, прирост количества ДБС в митохондриях клеток головного мозга и селезенки облученных крыс был значительно выше, по сравнению с таковыми в ядрах

клеток тканей этих же животных. Вероятно, высокий уровень АФК в митохондриях способствует увеличению количества ДБС при действии ИР, как и других повреждений ДНК в этих органеллах. Таким образом, результаты анализов ДБС в ядрах и митохондриях тканей необлученных и облученных животных позволяют предположить, что в митохондриях, как и в ядрах, ДНК находится в ассоциации с белками.

3.2. Активация поли(АДФ-рибозил)ирования белков в митохондриях тканей крыс, подвергнутых радиационному воздействию. Поли(АДФ-рибозил)полимераза (ПАРП) и моно(АДФ-рибозил)трансфераза (МАРТ) являются ключевыми ферментами посттрансляционной модификации белков. Известно, что ферменты ПАРП активируются при наличии у них контактов с участками ДНК, в которой индуцируются разрывы (D'Amours et al, 1999, Wieler et al, 2003). Мы обнаружили, что у животных, облученных в дозах 5 и 10 Гр, наблюдалось увеличение уровня АДФ-рибозилирования (суммарная активность ПАРП и МАРТ) в ядрах мозга и селезенки - на 49-103%, а в митохондриях - на 32-47%. Введение в реакционную смесь 3-аминобензамида (ингибитора поли(АДФ-рибозил)ирования, который не влияет на активность ферментов МАРТ) приводило к снижению уровня АДФ-рибозилирования белков в ядрах до 7,2-11,3%, а в митохондриях - до 26,6-33,8%. Таким образом, около 90% в ядрах и 70% в митохондриях связываемого с белками клеточных органелл [³H]-аденина является результатом поли(АДФ-рибозил)ирования этих белков.

Мы обнаружили, что повышение уровня АДФ-рибозилирования в ядрах и митохондриях тканей крыс при воздействии γ -излучения связано исключительно с радиационной активацией ПАРП, поскольку уровень моно(АДФ-рибозил)ирования в них остается без изменения. На рис. 7 представлены данные, демонстрирующие активацию поли(АДФ-рибозил)ирования в ядрах и митохондриях животных после их облучения ИР, которые свидетельствуют об активации фермента ПАРП при возникновении разрывов в ДНК, с которой она ассоциирована.

Таким образом, мы обнаружили, что в митохондриях, большая часть связываемых с белками АДФ-рибозильных групп представляет собой результат поли(АДФ-рибозил)ирования белков, что свидетельствует о наличии в этих органеллах фермента поли(АДФ-рибозил)синтетазы и их белков-акцепторов. Более того, в этих органеллах при радиационном повреждении повышается уровень поли(АДФ-рибозил)ирования белков. Это указывает на то, что поли(АДФ-рибозил)полимераза в митохондриях находится в ассоциации с ДНК и ее активация обусловлена возникновением разрывов в мтДНК.

Исходя из поставленной нами задачи исследования, полученные результаты позволяют полагать, что наблюдаемая нами не только радиационная индукция ДБС, но и активация поли(АДФ-рибозил)ирования белков в митохондриях косвенно указывает на наличие контакта этих белков с молекулами мтДНК, содержащими разрывы, поскольку известно, что сигналом для радиационной активации поли(АДФ-рибозил)ирования белков ядерного хроматина является возникновение разрывов в яДНК (D'Amours et al, 1999, Wieler et al, 2003).

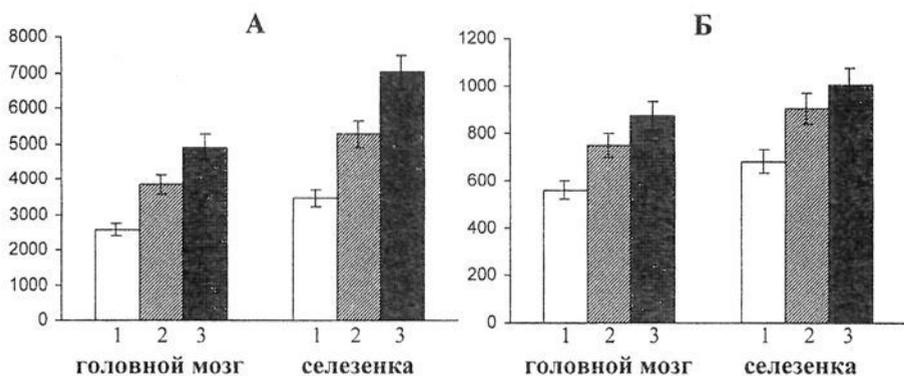


Рис. 7. Уровень поли(АДФ-рибозил)ирования (ингибируемого 3-АБ) белков в ядрах (А) и митохондриях (Б) тканей крыс. По оси ординат – уровень поли(АДФ-рибозил)ирования в имп/мин/200 мкг белка. 1- необлученные животные, 2- облучение 5 Гр, 3- облучение 10 Гр.

4. Участие белков нуклеоидов митохондрий в защите мтДНК при действии повреждающих агентов.

Образование ДФС и активация процесса поли(АДФ-рибозил)ирования в митохондриях при действии ИР свидетельствует о прочной ассоциации белков нуклеоидов митохондрий с мтДНК и их локализации в непосредственной близости от ДНК, по крайней мере, на расстоянии не более нескольких нанометров. Такая близость белков, образующих шивки, указывает на вовлечение их в регуляцию метаболизма ДНК и поддержание ее структуры. Мы предположили, что ОБМ могут не только связываться с мтДНК, но и обеспечивать определенную защиту мтДНК, экранируя ее от атак АФК и других повреждающих агентов.

Возможное участие белков нуклеоидов митохондрий в защите мтДНК от действия H_2O_2 и ИР исследовали с помощью определения поврежденности мтДНК методом ПЦР на длинных фрагментах (long-extension PCR). Известно, что повреждения ДНК-матриц блокируют работу термостабильных ДНК-полимераз в ПЦР, что приводит к снижению выхода продукта амплификации (Ploskonosova et al., 1999; Santos et al., 2002). Как и следовало ожидать, в образцах мтДНК, изолированных из облученных митохондрий и нуклеоидов, содержится меньше поврежденных копий мтДНК, которые способствуют снижению выхода продуктов ПЦР, по сравнению с таковыми в образцах мтДНК, облученных в растворе. Следует отметить, что мтДНК, облученная в составе нуклеоидов, повреждалась меньше, чем незащищенная мтДНК (рис. 8 Б, В). Вероятно, белки, ассоциированные с мтДНК *in vivo* и формирующие компактную укладку мтДНК в виде нуклеоидов (Legros et al., 2004; Iborra et al., 2004), способны обеспечивать определенную защиту митохондриального генома от действия АФК.

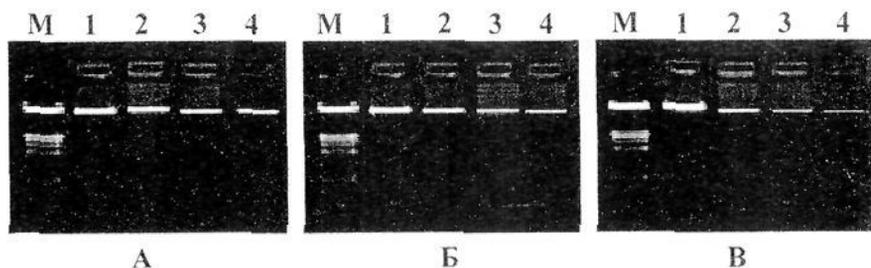


Рис. 8. Электрофореграммы продуктов ПЦР (long extension PCR) мтДНК. ПЦР проводили на ДНК-матрицах, полученных из облученных суспензии митохондрий (А) и нуклеоидов (Б), а также облученной в растворе мтДНК (В). Дорожки: М- маркер - λ -ДНК (EcoRI и HindIII). 1 - необлученные образцы мтДНК. 2 - , 3 - и 4 - облученные в дозах 5, 10 и 20 Гр, соответственно.

Мы также предположили, что основные белки, ассоциированные с мтДНК в составе митохондриальных нуклеоидов, могут оказывать такой же защитный эффект, как ядерные гистоны, от повреждающего действия АФК на ДНК. Для сравнительной оценки защитных эффектов основных белков нуклеоидов митохондрий и ядерных гистонов мы получали комплексы мтДНК с этими белками в различных соотношениях и инкубировали их в присутствии перекиси водорода. Затем из этих комплексов была получена мтДНК и использована для проведения ПЦР-амплификации участка размером 15983 п.н.

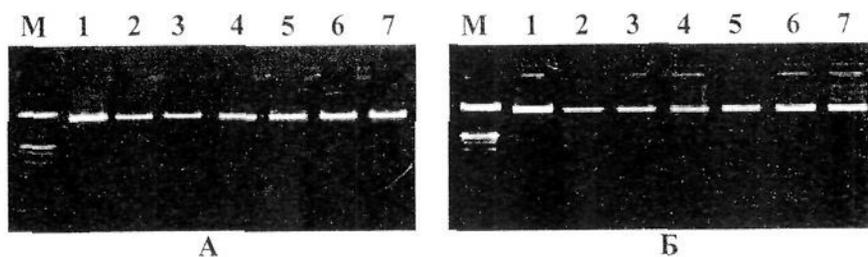


Рис. 9. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации мтДНК, обработанной перекисью водорода в составе комплексов с основными белками нуклеоидов митохондрий (А) и с гистонами (Б). Дорожки: М- маркер молекулярной массы ДНК - λ -ДНК /EcoRI и HindIII. 1 - мтДНК, необработанная H_2O_2 . Дорожки 2-7 - одна весовая часть мтДНК комплексована в соотношении 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 частями белка, соответственно, и обработаны H_2O_2 .

На рис. 9 представлены электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации мтДНК, полученной из комплексов с гистонами и основными белками нуклеоидов митохондрий. Из этого рисунка видно, что с увеличением количества комплексированных с мтДНК белков нуклеоидов митохондрий или

ядерных гистонов повреждений в матрицах мтДНК возникало меньше, а выход продукта ПЦР с данными образцами был больше По-видимому, белки экранировали мтДНК от атак АФК, продуцируемых H_2O_2 , и, таким образом, защищали мтДНК от появления повреждений

Данные, обобщенные на рис 10, указывают на то, что основные белки нуклеоидов митохондрий и ядерные гистоны, связываясь с мтДНК, в одинаковой степени экранируют ее и обеспечивают защиту от воздействия H_2O_2

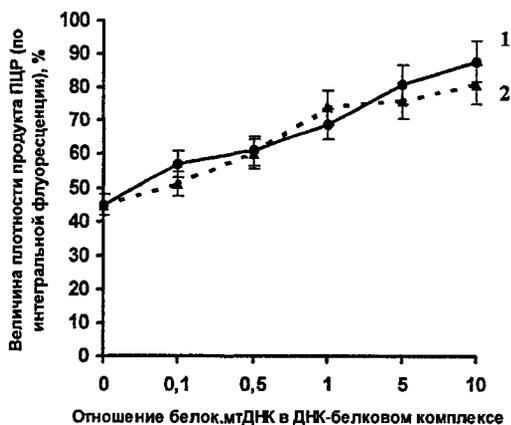


Рис. 10. Возникновение повреждений в матрицах мтДНК при обработке H_2O_2 в зависимости от соотношения белок мтДНК в ДНК-белковом комплексе 1 — комплексы мтДНК с гистонами ядер, 2 — комплексы мтДНК с основными белками нуклеоидов митохондрий. За 100% принята величина плотности продукта ПЦР мтДНК, не обработанной H_2O_2

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что в митохондриях интактных клеток основные белки, ассоциированные с мтДНК и способствующие ее укладке в виде нуклеоидов, обеспечивают защиту митохондриального генома от действия АФК, генерируемых в процессе окислительного фосфорилирования. Высказываемое многими авторами мнение о том, что мтДНК по сравнению с яДНК больше повреждается, что обусловлено отсутствием в митохондриях связывающихся с мтДНК гистонов и других белков, является, очевидно, недостаточно убедительным, поскольку данные органеллы содержат основные ДНК-связывающие белки, образующие комплексы с ДНК. Очевидно, большая повреждаемость мтДНК по сравнению с ядерной ДНК может быть связана с близостью расположения мтДНК к дыхательным комплексам в компартаментах внутренней мембраны митохондрий, где продуцируются АФК в процессе синтеза АТФ, и недостаточностью систем репарации.

ВЫВОДЫ

- 1 Впервые из митохондрий печени и селезенки крыс, используя метод выделения гистонов из ядер, получены кислоторастворимые основные белки, которые с помощью электрофореза в 15% SDS-ПААГ разделяются на более чем 20 полипептидов с молекулярными массами от 10 до 120 кДа.
- 2 Показано, что основные белки митохондрий, аналогично гистонам ядер, способны образовывать стабильные комплексы с ДНК *in vitro*. Это позволило предположить, что данные белки, возможно, в митохондриях *in vivo* формируют комплексы с мтДНК, участвуют в ее структурной укладке и экранируют от действия различных повреждающих агентов.
3. Впервые показано, что в митохондриях тканей животных, облученных ионизирующей радиацией, возникают ДНК-белковые сшивки, так же как в ядрах. Индукция ДНК-белковых сшивок в митохондриях под действием радиации *in vivo* указывает на то, что мтДНК в митохондриях, как и яДНК в ядрах, находится в ассоциации с белками.
- 4 Впервые показано, что ионизирующая радиация вызывает активацию поли(АДФ-рибозил)ирования белков в митохондриях тканей облученных животных, так же как и в ядрах, что свидетельствует о связи мтДНК с поли(АДФ-рибозил)полимеразой, активируемой при возникновении разрывов цепей мтДНК.
- 5 Впервые показано, что основные белки нуклеоидов митохондрий обеспечивают защиту митохондриального генома, так же как и гистоны, от повреждающего действия ионизирующего излучения и перекиси водорода.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1 Борисов А.М., Гуляева Н.А., Рассказова Е.А., Плосконосова И.И., Газиев А.И. (2004) ДНК-белковые сшивки в ядрах и митохондриях клеток тканей крыс разного возраста после воздействия γ -излучения // Радиационная биология Радиозкология, т 44, №4, с.377-382.

2 Ушакова Т.Е., Плосконосова И.И., Гуляева Н.А., Рассказова Е.А., Газиев А.И. (2004) АДФ-рибозилирование белков в ядрах и митохондриях из тканей крыс разного возраста после воздействия γ -излучения // Радиационная биология Радиозкология, т 44, №5, с 509-515

3 Куцый М.П., Гуляева Н.А., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. (2005) ДНК-связывающие белки митохондрий печени // Известия Российской Академии наук Серия биологическая т 32, №5, С 438-444

4 Kutsy M P, Goulaeva N A, Kuznetsova, E A, Gaziev, A I (2005) DNA-binding proteins of mammalian mitochondria // *Mitochondrion*, 5, pp 35-44

5 Гуляева Н А, Кузнецова Е А, Газиев А И (2006) Белки, ассоциированные с митохондриальной ДНК, защищают ее от воздействия рентгеновского излучения и перекиси водорода // Биофизика, т 51, вып.4, с.692-697

Тезисы

1 Гуляева Н А, Кузнецова Е А (2003) ДНК-связывающие белки и ДНК-активируемые протеазы митохондрий // Тезисы 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пущино, с.324-325

2. Гуляева Н А, Кузнецова Е А, Куцкий М П (2004) Исследование ДНК-связывающих белков митохондрий печени крыс // Тезисы 8-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пущино, с 81

3. Газиев А И, Гуляева Н А, Кузнецова Е.А, Ушакова Т Е (2004) Структурные нарушения митохондриальной ДНК – чувствительные маркеры для оценки генотоксических нагрузок на организм человека // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Биологические аспекты экологии человека». Архангельск, т 1, с 104-107.

4 Плосконосова И И, Ушакова Т Е, Гуляева Н А, Газиев А И (2004) ДНК-белковые сшивки и поли(АДФ-рибозил)ирование белков в ядрах и митохондриях тканей крыс разного возраста после воздействия гамма-излучения. // Тезисы VI Международного симпозиума «Биологические механизмы старения» Харьков, с. 68

5 Гуляева Н А, Кузнецова Е А, Газиев А И (2006) Белки митохондриального нуклеоида защищают митохондриальную ДНК от повреждающего воздействия рентгеновского излучения и перекиси водорода. // Тезисы V съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность) Москва, т II с 34

6 Гуляева Н А, Кузнецова Е А (2006) Исследование роли белков митохондриальных нуклеоидов в защите митохондриальной ДНК от повреждающего воздействия генотоксических факторов // Тезисы 10-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пущино, с 12