

М. В. ПАВЛОВА

**О ЗНАЧЕНИИ ПОЛИМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ  
КИСЛОТЫ И СВЯЗИ ЕЕ С БЕЛКОМ ДЛЯ ПРОЦЕССА  
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ**

*(Представлено академиком А. И. Опариным 21 VII 1953)*

За последнее время с помощью метода дробного центрифугирования установлено, что в митохондриях сосредоточена подавляющая часть цитохромоксидазной активности, а также ферментные системы, обеспечивающие осуществление протекающих в цитоплазме (1) процессов сопряженного окислительного фосфорилирования.

Имеются данные (2), указывающие на существенное значение сохранности структуры митохондрий для их метаболизма. Все воздействия, вызывающие морфологические нарушения, в митохондриях (5-минутное измельчение в «блендере», обработка 30% мочевиной, холатом натрия и др.) приводят к подавлению дыхания и окислительного фосфорилирования. Фазовая микроскопия обнаруживает, что полная потеря циклофоразной активности наблюдается при растворении плотной части «тела» митохондрий. Именно в последнем, согласно косвенным данным (3), локализованы рибонуклеопротеиды митохондрий.

В связи с этим нам представлялось важным выяснить, как будет отражаться энзиматическая деполимеризация рибонуклеиновой кислоты (РНК) цитоплазматических элементов на их дыхании и фосфорилировании.

В опытах был использован экстракт почек кролика, полученный путем растирания ткани на холоду с кварцевым песком в М/10 фосфатном буфере (рН 7,4—7,7) в соотношении 1:2. Экстракт затем подвергался кратковременному центрифугированию для удаления ядерной фракции и неразрушенных клеток. Инкубация экстракта производилась в аппарате Варбурга. Субстратом дыхания служила яблочная кислота, акцептором фосфата — глюкоза, флуорид добавлялся для торможения действия фосфатаз.

По окончании инкубации сосудики заливались трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 7,5%). В трихлоруксусном фильтрате определялся неорганический фосфор с молибденовым реактивом и эйконогеном в ступенчатом фотометре. Кислотонерастворимый остаток тщательно отмывался от свободного  $P^{32}$  и обрабатывался последовательно спиртом, эфиром и щелочью по (4) для выделения фракции рибонуклеиновой кислоты, количество которой учитывалось с помощью орциноловой реакции (5) с последующим фотометрированием в спектрофотометре Бекмана. Радиоактивность определялась на счетчике обычным путем.

Кристаллическую рибонуклеазу получали по Макдональд (6). После суточного подвижного диализа на холоду конечного кристаллического препарата против дистиллированной воды, насыщенной углекислотой, фермент высушивался в вакууме при замораживании.

Первые опыты показали, что рибонуклеаза резко подавляет и дыхание и фосфорилирование экстракта. Однако вскоре выяснилось, что это происходит за счет незначительной примеси протеолитических ферментов, сохраняющихся в препарате рибонуклеазы, несмотря на специальные предосторожности, предусмотренные методикой Макдональд. Пятиминутное кипячение раствора рибонуклеазы (на одном из промежуточных этапов ее выделения при pH 3) прямо на плитке, вместо нагревания на водяной бане, рекомендуемого Макдональд, дало нам препарат достаточно высокой активности, но свободный от протеолитических ферментов. В опытах с таким препаратом однозначного ферментного действия получены были совершенно иные результаты (см., например, рис. 1).

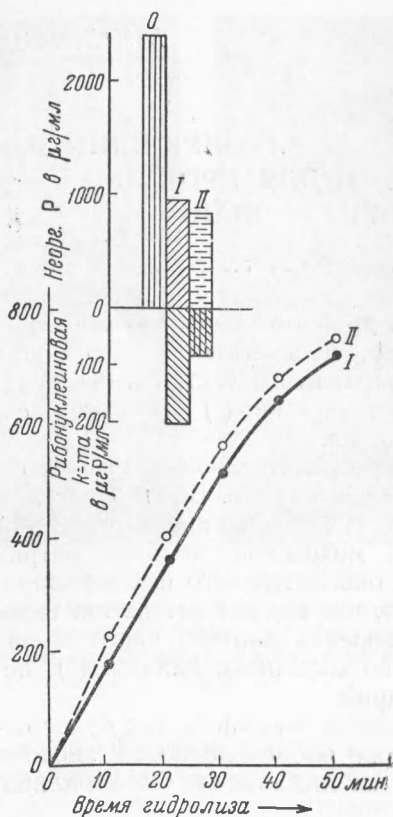


Рис. 1. Содержимое сосудов: экстракт 0,8 мл; глюкоза 0,05 мл 6%; NaF 0,1 мл 0,4 мол;  $MgCl_2$  0,2 мл 0,05 мол; яблочная кислота 0,2 мл 0,1 мол; рибонуклеаза 0,65 мл (содержащая в разных опытах от 3 до 5 мг белка) или 0,65 мл воды. Общий объем смеси 2 мл. 0—исходная, I—полная система (контроль), II—полная система + рибонуклеаза

тавшейся не затронутой ферментом. Однако, как видно из табл. 1, эксперимент не подтверждает этого предположения.

В остатке РНК опытной пробы после инкубации обнаруживается вся или почти вся радиоактивность, найденная в контрольной пробе, несмотря на значительные потери в количестве рибонуклеиновой кислоты.

Заметим попутно, что в данных табл. 1 обращает на себя внимание некоторая деполимеризация РНК, наблюдаемая после инкубации и в контрольных пробах по сравнению с исходным количеством РНК в экстракте. Это объясняется, повидимому, действием собственной рибонуклеазы экстракта, сосредоточенной в митохондриях.

Оказалось, что присутствие рибонуклеазы в действительности ни в какой мере не сказывается на интенсивности дыхания и фосфорилирования экстракта, несмотря на деполимеризацию и отщепление от белка значительной части рибонуклеиновой кислоты.

Этот факт естественно было бы истолковать как указание на то, что вхождение полимерной рибонуклеиновой кислоты в цитоплазматические структуры безразлично для протекания в них процессов дыхания и фосфорилирования. Однако, учитывая неизменное сохранение в экстракте после действия рибонуклеазы не менее 15—30% связанной с белком нерасщепленной полимерной РНК, следовало считаться с другой возможностью — что именно эта, недоступная действию рибонуклеазы часть РНК главным образом и участвует в окислительном фосфорилировании.

Простой опыт с меченым фосфатом мог бы разрешить вопрос. Если действительно фосфорилирование РНК происходит независимо от степени ее полимеризации и от вхождения в структуры, то при инкубации экстракта с  $P^{32}$  радиоактивность фракции РНК в пробе с рибонуклеазой будет составлять лишь небольшую часть таковой контрольной пробы (без рибонуклеазы) и должна соответствовать доле РНК, оставшейся не затронутой ферментом.

Все изложенное приводит к следующим заключениям. Не вся рибонуклеиновая кислота экстракта доступна энзиматической деполимериза-

Таблица 1

№№ опытов	Радиоактивность * фракции РНК в числе отсчетов мин. на 1 мл исходн. экстракта			Количество РНК в $\mu$ г пентозы на 1 мл исходн. экстракта			
	контроль- ная	с рибонук- леазой	в % к контр.	исходн. (до инкубации)	контроль- ная	с рибонук- леазой	в % к контр.
23	583	454	78	—	252	94	37
25	1219	1210	99	616	551	260	47
27	545	447	83	500	400	120	30
30	426	350	83	388	243	117	41
32	4600	4700	102	525	304	155	51
33	3285	3310	101	460	326	134	42

\* Радиоактивность во фракции РНК экстракта в нулевой пробе (без инкубации) не была обнаружена вовсе, а в случае отсутствия субстрата дыхания — яблочной кислоты — была крайне незначительной.

ции, хотя, как известно, свободная РНК в присутствии рибонуклеазы полностью деградирует до кислоторастворимых нуклеотидов. Следовательно, устойчивость к действию рибонуклеазы части РНК экстракта должна обуславливаться наличием особого характера связи ее с белком, препятствующей, очевидно, воздействию фермента на субстрат. Неполное освобождение рибонуклеазой рибонуклеиновой кислоты митохондрий наблюдал также Шнейдер (7).

Окислительному фосфорилированию подвергается в основном только эта часть рибонуклеиновой кислоты, более прочно связанная с белком, так как именно в ней сосредоточивается весь меченый фосфат, внедряющийся в общую фракцию РНК.

Приношу благодарность В. С. Шапотову за предложенную тему и руководство работой.

Отдел биохимии  
Института экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
11 IX 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. C. Schneider, G. Hogeboom, J. Cancer Research, 11, 1, 1 (1951).  
<sup>2</sup> J. W. Harman, Experimental Cell Research, 31, 382, 394 (1950). <sup>3</sup> H. V. Zollinger, Experientia, 6, 1, 16 (1950). <sup>4</sup> W. C. Schneider, J. Biol. Chem., 164, 747 (1946). <sup>5</sup> В. Мейбаум, Биохимия, 10, 353 (1945). <sup>6</sup> M. R. MacDonald, J. Gen. Physiol., 32, № 1, 39 (1948). <sup>7</sup> W. C. Schneider, J. Biol. Chem., 164, 241 (1946).