

УДК 577.21

А.В.Васин (асп., каф. БФ), Л.В.Пучкова, д.б.н., проф.

СИСТЕМА IN VITRO ПЕРЕНОСА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В МИТОХОНДРИИ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ КРЫСЫ

Медь является важнейшим микроэлементом, который необходим для жизнедеятельности практически всех организмов. У млекопитающих одним из ключевых участников транспорта не клеточной меди и переноса железа через клеточные мембраны является медьсодержащий гликопротеин церулоплазмин (ЦП, КФ 1.16.3.1), продукт уникального гена. Несмотря на то, что выявлено несколько белковых форм ЦП, описаны только две молекулярные формы ЦП-мРНК. Это ЦП-мРНК, кодирующая синтез секреторного ЦП, и ЦП-мРНК, кодирующая сигнал присоединения к гликозилфосфатидилинозитоловому (GPI) якорю, образующаяся в ходе альтернативного сплайсинга. Ранее нами было показано, что иммунореактивные полипептиды ЦП присутствуют в митохондриях крысы, выделенных из мозга, печени, семенников и молочной железы методом изопикнического центрифугирования. В митохондриях ЦП локализован в матриксе и во внутренних мембранах, его молекулярная масса соответствует негликозилированной форме белка. В данной работе был изучен процесс переноса молекул ЦП в митохондрии крысы в реконструированной системе *in vitro* переноса белков в митохондрии.

На первом этапе методом дифференциального центрифугирования нами был получен супернатант гомогената клеток печени крысы, не содержащий мембран секреторного пути, в котором в условиях, обеспечивающих достройку полипептидных цепей, были «накоплены» новосинтезированные полипептиды ЦП. После трансляции осадили рибосомы и осуществили тотальное химическое мечение белков супернатанта с помощью [¹²⁵I]. Параллельно выделяли фракцию интактных митохондрий печени крысы. Далее полученный супернатант инкубировали в течение 45 минут с митохондриями печени крысы в присутствии АТФ при 0 и 35°C (процедура доставки цитозольных белков в митохондрии). После инкубации митохондрии осадили центрифугированием и лизировали в 0.5% SDS и 0.5% Triton X-100, а затем в лизатах митохондрий, отмытых от неимпортированных белков цитозоля, иммунопреципитировали ЦП антителами к ЦП крысы. Наконец, методом денатурирующего электрофореза в ПААГ провели молекулярно-весовой анализ иммунопреципитата. Полученные результаты показали, что в митохондрии печени при +35°C переносится ЦП-подобный полипептид с молекулярной массой 110 кДа. При 0°C переноса не наблюдалось.

На втором этапе работы изучали способность ЦП крови крысы импортироваться в митохондрии из разных органов крысы при различных условиях. Для этого электрофоретически чистый препарат ЦП крови крысы, полученный хроматографическими методами, радиойодировали и инкубировали его с митохондриями при разных условиях. Результаты показали, что [¹²⁵I]ЦП крови переносится в митохондрии печени. Для переноса необходимы присутствие факторов цитоплазмы (S23) и температура +35°C. При 0°C перенос не наблюдался. Варьирование условий, при которых осуществлялся перенос, показало, что перенос не подавляется валиномицином и олигомицином. Перенос [¹²⁵I]ЦП осуществляется в митопласты, при этом на митохондриях имеются сайты специфического связывания для ЦП. Сходный перенос осуществляется и в митохондрии семенников, мозга и сердца, причем S23

годятся из любого органа, а количество перенесенного [125 I]ЦП пропорционально концентрации S23. Удаление лабильных ионов меди и ионов меди из медьсвязывающих центров ЦП не влияет на перенос ЦП в митохондриях. Набухание митохондрий также не влияет на перенос.

В опытах на крысах методом полуколичественного ОТ-ПЦР анализа было проверено присутствие ЦП-мРНК, существование которой предсказано методами компьютерного анализа. Предположительно точка инициации транскрипции этой изоформы ЦП-мРНК лежит внутри интрона 2 гена ЦП. В результате образуется мРНК, которая программирует продукт, соответствующий ЦП крови с экзона 2, но на N-конце содержит дополнительный участок длиной 25 а.о., начинающийся с метионина. Предполагаемый продукт трансляции предсказанной мРНК не содержит сигнального пептида и теоретически может быть импортирован в митохондрии. Методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами на участок в интроне 2 было показано присутствие таких транскриптов в печени крысы. В настоящее время ведется работа по изучению тканеспецифического профиля присутствия данной изоформы ЦП-мРНК в клетках различных органов крысы. Обсуждается возможная биологическая роль ЦП, локализованного в митохондриях.