

Действие витамина Е на РНК- и ДНК-полимеразные активности митохондрий печени крыс. Роль ионов Са и протеинкиназы С

А. А. Капралов

Научно-исследовательский институт физиологии Киевского университета им. Тараса Шевченко
252017, Киев, ул. Владимирская, 64

Исследовали влияние токоферола на РНК- и ДНК-полимеразные активности изолированных митохондрий печени крыс при его совместном добавлении с Ca^{2+} -ионофором А23187, блокатором каналов Ca^{2+} верапамилом и ингибитором протеинкиназы С форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА). Обнаружено, что эффекты токоферола, А23187 и верапамила на синтез РНК и ДНК в митохондриях проявляются лишь в присутствии фракции токоферолсвязывающих белков. Совместное добавление комплекса токоферолсвязывающие белки — токоферол с А23187 или верапамилом приводило к увеличению РНК-полимеразной активности митохондрий нормальных крыс по сравнению с пробами, к которым были добавлены только токоферол и токоферолсвязывающие белки. В отличие от этого внесение фракции токоферолсвязывающих белков на фоне А23187 или верапамила вызывало ингибирование синтеза ДНК в митохондриях нормальных, но не Е-гиповитаминозных крыс. Токоферол же уменьшал действие этих соединений. Присутствие в пробе ФМА приводило к различиям в РНК-полимеразной активности нормальных и Е-гиповитаминозных крыс. Полученные данные позволяют предположить, что в действие витамина Е на синтез РНК и ДНК в митохондриях могут быть вовлечены ионы Са и протеинкиназа С.

Введение. Ранее обнаружено, что токоферол может связываться с ядрами клеток печени и оказывать влияние на синтез РНК и ДНК в них [1]. Важную роль в этом процессе играют ядерные токоферолсвязывающие белки (ТСБ), структура и функции которых, по-видимому, подобны таковым ядерных рецепторов стероидных гормонов и витаминов А и D [2]. Известно, что, кроме ядер, токоферол обнаруживается в митохондриях [3], содержащих, так же как и ядра, собственную ДНК и обладающих способностью к автономному синтезу ДНК и РНК [4], и оказывает влияние на их РНК-полимеразную активность [6]. Эффекты токоферола на этот процесс изменяются в присутствии ТСБ, выявленных в составе митохондрий [5, 6].

Действие токоферола на синтез РНК в митохондриях может быть обусловлено не только его взаимодействием с ТСБ, но и связано с влиянием

этого витамина на другие регуляторные функции. Показано, что в присутствии витамина Е изменяются процессы транспорта Ca^{2+} в клетку [1], а также ингибируется активность еще одного компонента Са-фосфоинозитольного пути передачи регуляторного сигнала в клетке — протеинкиназы С [7, 8]. Известно, что ионы Са и протеинкиназа С участвуют в регуляции синтеза РНК и ДНК в ядрах [10—12].

Система транспорта Ca^{2+} обнаружена и в митохондриях, вследствие чего они способны регулировать внутримитохондриальное содержание этих ионов [9]. В связи с этим можно предположить, что ионы Са и протеинкиназа С могут быть вовлечены в действие токоферола на синтез РНК и ДНК в митохондриях. Для экспериментальной проверки этого предположения мы исследовали РНК- и ДНК-полимеразные активности изолированных митохондрий печени крыс при изменении концентрации Ca^{2+} и активности протеинкиназы С. В качестве модулятора активности протеинкиназы С

использовали форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), для изменения концентрации Ca^{2+} — Са-ионофор А23187, увеличивающие проникновение ионов Са через мембрану, и верапамил, который, как показано в исследованиях последних лет, не только блокирует Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны электровозбудимых клеток, но и, проникая через плазматическую мембрану в цитоплазму, оказывает непосредственное влияние на многие внутриклеточные процессы [13, 14].

Материалы и методы. В опытах использовали крыс-самок массой 150—200 г. Ядра выделяли и фракционировали при 0—4 °С. Используемые растворы в качестве ингибитора протеаз содержали 1 мМ фенолметисульфонилфторид. Митохондрии из печени крыс получали по методу [15] в среде, содержащей 0,225 М маннит, 0,07 М сахарозу, 0,002 М ЭДТА в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,4. ТСБ из митохондрий выделяли по методу [5].

Концентрация А23187 в пробе составляла 0,01—0,1 мкг/мл, верапамила — 10^{-6} — 10^{-5} М, ФМА — 100 нг/мл.

Среда инкубации для определения ДНК-полимеразной активности в изолированных ядрах содержала 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 6 мМ MgCl_2 , 15 мМ КСI, 6 мМ бета-меркаптоэтанол, 2 мМ АТФ, по 200 мкмоль/л каждого из дАТФ, дЦТФ, дГТФ и 20 мкМ [^3H]-дТТФ. ДНК-полимеразную реакцию начинали добавлением 50 мкл суспензии ядер с начальной концентрацией 1—2 мг ДНК в 1 мл. Конечный объем инкубационной среды составлял 100 мкл. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С.

О РНК-полимеразной активности судили по уровню включения [^3H]-уридинтрифосфата в РНК *in vitro* [16]. При этом инкубационная среда содержала 0,12 М КСI, 0,25 мМ Mg-ацетат, 0,5 ммоль/л каждого из нуклеозидтрифосфатов — АТФ, ЦТФ, ГТФ и 0,05 мМ [^3H]-УТФ (удельная радиоактивность 940 ТБк/моль). РНК-полимеразную реакцию начинали добавлением 50 мкл суспензии ядер при концентрации 1—2 мг ДНК в 1 мл. Конечный объем инкубационной среды составлял 100 мкл.

При определении как РНК-, так и ДНК-полимеразной активности реакцию останавливали добавлением охлажденного раствора, содержащего 10 % трихлоруксусной кислоты, 1 % пиррофосфата натрия. Дальнейшую отмывку ядер от невключившегося в ДНК [^3H]-дТТФ осуществляли на фильтрах «Millipore» с использованием прибора «Домбидот» (Диа-М).

Результаты и обсуждение. В наших опытах обнаружено, что эффекты токоферола, А23187 и верапамила на синтез РНК в митохондриях проявляются лишь в присутствии фракции ТСБ, которая сама по себе ингибирует этот процесс (рис. 1, 2). Совместное добавление ТСБ, токоферола и А23187

или верапамила приводило к увеличению РНК-полимеразной активности митохондрий нормальных крыс по сравнению с пробами, к которым были добавлены только токоферол и ТСБ. При исследовании Е-гиповитаминозных животных эти эффекты не проявлялись. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить возможное участие ионов Са в действии токоферола на синтез РНК в митохондриях. Это предположение подтверждается нивелированием в присутствии токоферола увеличения синтеза РНК, вызванного добавлением ЭГТА-соединения, известного своими Са-связывающими свойствами, а также уменьшения синтеза РНК при совместном добавлении А23187, токофе-

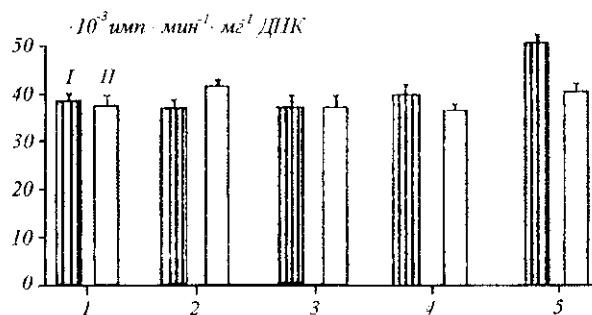


Рис. 1. РНК-полимеразная активность митохондрий печени крыс в присутствии: 1 — без добавок; 2 — + А23187; 3 — + верапамил; 4 — + А23187 + ионы Са; 5 — + ЭДТА (I — без токоферола; II — + токоферол)

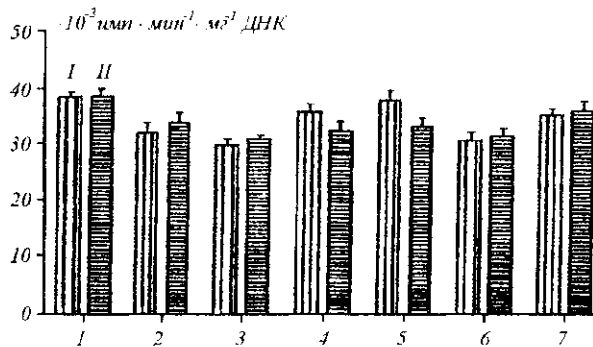


Рис. 2. РНК-полимеразная активность митохондрий печени крыс в присутствии: 1 — без добавок; 2 — + ТСБ; 3 — ТСБ + токоферол; 4 — + А23187 + ТСБ; 5 — + А23187 + ТСБ + токоферол; 6 — верапамил + ТСБ; 7 — + верапамил + ТСБ + токоферол (I — норма; II — Е-гиповитаминоз)

рола и ионов Са по сравнению с пробами, к которым добавляли только А23187 и верапамил (см. рис. 1).

Ранее нами было показано, что добавление токоферола к изолированным ядрам приводит к устранению ингибирования синтеза РНК, вызванного добавлением А23187 и верапамила, т. е. в действие токоферола на транскрипцию ядерного генома также могут вовлекаться ионы Са [17]. Полученные нами в этой работе результаты свидетельствуют о том, что эффекты совместного добавления А23187, верапамила и токоферола на синтез РНК в митохондриях и ядрах различны. Эти различия могут быть обусловлены особенностями строения и функционирования геномов этих структур клетки [14].

Нами было также исследовано возможное вовлечение протеинкиназы С в действие токоферола на РНК-полимеразную активность митохондрий. Для этого мы использовали ФМА, активирующий этот фермент (рис. 3). В присутствии ФМА оказались достоверными различия в РНК-полимеразной активности нормальных и Е-гиповитаминозных крыс, составляющие 20 %. Предынкубация же с токоферолом приводила к уменьшению абсолютных показателей синтеза РНК в митохондриях как нормальных, так и Е-гиповитаминозных крыс в равной степени, что может быть обусловлено ингибированием протеинкиназы С в присутствии токоферола [7, 8]. Добавление ТСБ в этом случае не вызывало изменений показателей синтеза РНК в митохондриях.

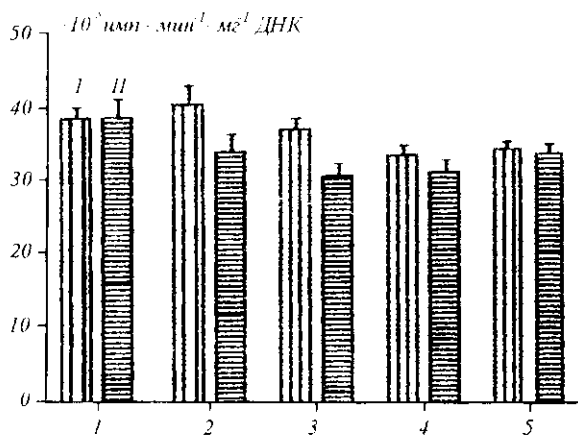


Рис. 3. РНК-полимеразная активность митохондрий печени крыс в присутствии: 1 — без добавок; 2 — + ФМА; 3 — + ФМА + токоферол; 4 — + ФМА + ТСБ; 5 — + ФМА + ТСБ + токоферол (I — норма; II — Е-гиповитаминоз)

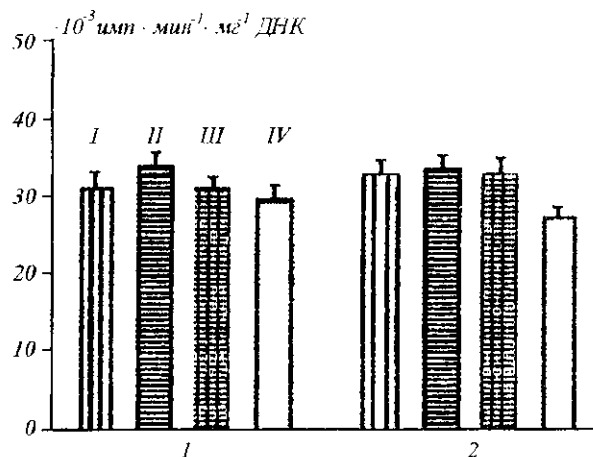


Рис. 4. РНК-полимеразная активность митохондрий печени крыс с Е-гиповитаминозом в присутствии: 1 — + ФМА; 2 — + А23187 (I — без добавок; II — + токоферол; III — + убихинон; IV — + убихинон + токоферол)

Эти результаты согласуются с данными, свидетельствующими об участии протеинкиназы С в процессе транскрипции, полученными при исследовании механизмов регуляции этого процесса в ядрах клеток. Так, в ряде работ [10, 11] показано, что присутствие активаторов протеинкиназы С может как активировать экспрессию индивидуальных генов, так и ингибировать ее.

Таким образом, можно заключить, что витамин Е способен влиять на синтез РНК в митохондриях, причем его эффекты зависят от присутствия ТСБ и могут модулироваться ионами Са или протеинкиназой С.

Для выяснения вопроса о специфичности действия токоферола нами было исследовано изменение РНК-полимеразной активности митохондрий Е-гиповитаминозных крыс в присутствии убихинона, родственного токоферолу соединения, также обладающего антиоксидантными свойствами. Нами обнаружено, что убихинон практически не влиял на этот показатель, в то время как совместное внесение токоферола и убихинона на фоне А23187 и ФМА ингибирует синтез РНК по сравнению с пробами, в которых присутствовал только токоферол (рис. 4). Эти данные свидетельствуют о возможном взаимодействии этих соединений в составе митохондрий, что подтверждается данными литературы о возможности восстановления токоферола из токофероксильных радикалов с помощью убихинона [18]. Выявлено также, что *in vivo* уменьшение

количества токоферола после ишемии и реоксигенации предотвращается предварительным введением убихинола 10, являющегося восстановленной формой убихинона [19].

Наряду с анализом влияния токоферола и ТСБ на РНК-полимеразную активность мы исследовали действие этих соединений на синтез ДНК, также являющийся показателем функциональной активности генома митохондрий. Как и при исследовании синтеза РНК, нами не обнаружено влияния токоферола на синтез ДНК в митохондриях печени крыс в отсутствие фракции ТСБ. Изменений не обнаружено и при совместном добавлении токоферола, А23187 и верапамила (данные не представлены). Добавление ТСБ вызвало ингибирование ДНК-полимеразной активности митохондрий, составляющее 23 % в митохондриях нормальных крыс и 34 % в митохондриях недостаточных по витамину Е крыс. Совместное добавление этой фракции и А23187 или верапамила вызвало еще большее ингибирование синтеза ДНК в митохондриях нормальных, но не Е-гиповитаминозных крыс. Токоферол же уменьшал действие этих соединений (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют о том, что Са-зависимые механизмы могут быть вовлечены и в действие токоферола на синтез ДНК. В то же время можно заключить, что эффекты токоферола и агентов, изменяющих концентрацию ионов Са, на синтез РНК и ДНК в митохондриях различны.

Механизмы действия токоферола на процессы синтеза РНК и ДНК в митохондриях неясны. С одной стороны, как и стероидные и глюкокортикоидные гормоны, этот витамин может образовывать

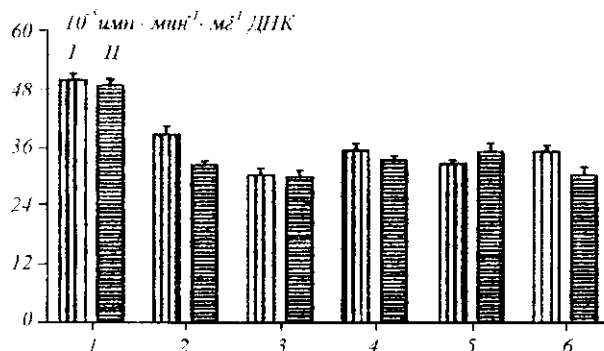


Рис. 5. ДНК-полимеразная активность митохондрий печени крыс в присутствии: 1 — без добавок; 2 —+ ТСБ; 3 —+ А23187 + ТСБ; 4 —+ А23187 + ТСБ + токоферол; 5 —+ верапамил + ТСБ; 6 —+ верапамил + ТСБ + токоферол (I — норма; II — Е-гиповитаминоз)

комплекс с рецепторами [2] и в его составе непосредственно связываться с геномом митохондрий [4]. При этом известно, что регуляция синтеза РНК и ДНК гормонами и витаминами является комплексным процессом, в который наряду с их рецепторами могут вовлекаться вторичные мессенджеры [20, 21]. Кроме того, показано, что стероидные гормоны и витамины А и Д могут оказывать негеномное действие, взаимодействуя с мембранами клеток и вызывая изменения концентрации ионов Са, цАМФ и, возможно, протейкиназы С [22]. Можно предположить, что в действие токоферола вовлекаются подобные механизмы.

Влияние токоферола на процесс синтеза РНК и ДНК может быть связано и с его антиоксидантными свойствами. Известно, что дыхательная цепь митохондрий является источником активных форм кислорода, инициирующих процессы перекисного окисления [23]. В то же время система репарации там недостаточно активна. Это обуславливает высокую интенсивность образования «окислительных повреждений» в митохондриальной ДНК [24]. Присутствие свободных радикалов влияет и на транскрипцию в митохондриях [25]. В связи с этим можно предположить, что витамин Е, являющийся одним из наиболее сильных природных антиоксидантов, способен взаимодействовать с активными формами кислорода и свободными радикалами в митохондриях и вследствие этого оказывать влияние на транскрипцию и синтез ДНК. Вероятнее всего, изменения синтеза РНК и ДНК в митохондриях являются следствием комбинированного действия токоферола, в которое вовлекается несколько механизмов.

Таким образом, получены данные о том, что действие комплекса токоферол — ТСБ на синтез нуклеиновых кислот может модулироваться А23187 и верапамилем, влияющими на концентрацию Са, причем эффекты этих соединений на синтез РНК и ДНК различаются. В присутствии ФМА проявляются различия в РНК-полимеразной активности митохондрий нормальных и Е-гиповитаминозных крыс. Это позволяет сделать вывод о том, что в действие витамина Е на синтез РНК и ДНК в митохондриях могут быть вовлечены ионы Са и протеинкиназа С.

О. О. Капралов

Дія вітаміну Е на РНК- та ДНК-полімеразні активності митохондрий печінки шурів. Роль іонів Са і протеїнкінази С

Резюме

Вивчали дію токоферола на РНК- та ДНК-полімеразні активності ізольованих митохондрий печінки шурів при його сумісному додаванні з Са²⁺-іонофором А23187, блокатором каналів Са²⁺ верапамілом та інгібітором протеїнкінази С форбол-12-мірестат-13-ацетатом (ФМА). Виявлено, що ефекти токо-

ферола, А23187 и верапаміла на синтез РНК та ДНК в мітохондріях виявляються лише у присутності фракції токоферолзв'язуючих білків. Якщо комплекс токоферолзв'язуючі білки — токоферол додавали разом з А23187 та верапамілом, це призводило до збільшення РНК-полімеразної активності мітохондрій нормальних щурів порівняно з пробами, до яких додавали тільки токоферол та токоферолзв'язуючі білки. На відміну від цього внесення фракції токоферолзв'язуючих білків на фоні А23187 чи верапаміла викликало пригнічення синтезу ДНК у мітохондріях нормальних, але не Е-гіповітамінних щурів. Токоферол зменшував дію цих сполук. Присутність у пробі ФМА призводила до виникнення розбіжностей у РНК-полімеразній активності нормальних та Е-гіповітамінних щурів. Отримані результати дозволяють припустити, що до дії вітаміна Е на синтез РНК та ДНК у мітохондріях можуть бути залучені іони Са та протейніназа С.

A. A. Kapralov

The action of vitamin E on RNA- and DNA-polymerase activity of rat liver mitochondria

Summary

The action of tocopherol on RNA- and DNA-polymerase activity of isolated rat liver mitochondria in condition of its joined addition with Ca^{2+} -ionophor A23187, Ca-channel blocker verapamil or protein kinase C inhibitor phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) were studied. It was found, that tocopherol, A23187 and verapamil effected RNA and DNA synthesis in mitochondria only if added together with fraction of tocopherol-binding proteins. In case of addition of this fraction together with tocopherol and A23187 or verapamil, the RNA-polymerase activity of mitochondria of normal rats increased compared to assays in which only tocopherol and tocopherol-binding proteins were added. Unlike this, joint addition of tocopherol binding protein, A23187 and verapamil caused inhibition of DNA synthesis in mitochondria of normal but not vitamin E-deficient rats. The addition of tocopherol decreased the action of these compounds. There were found the differences between RNA-polymerase activity of normal and vitamin E-deficient rats in presence of PMA. It was suggested that Ca ions and protein kinase C may be involved in action of vitamin E on RNA synthesis in rat liver mitochondria.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Капралов А. А., Петрова Г. В., Донченко Г. В. Фізико-хімічні властивості та біологічна роль альфа-токоферолзв'язуючих білків // Успехи соврем. биологии.—1993.—113, № 3.—С. 313—326.
2. Розен В. Б. Суперсемейство ядерних рецепторів гормонів — адаптивних факторів транскрипції // Біохімія.—1991.—56, № 3.—С. 565—571.
3. Донченко Г. В. Біохімія убихінона.—Київ: Наук. думка, 1988.—240 с.
4. Минченко А. Г., Дударева Н. А. Митохондриальний генетичний код.—Новосибірськ: Наука, 1990.—194 с.
5. Петрова Г. В., Капралов А. А., Кузьменко И. В., Донченко Г. В. Исследование токоферолсвязывающих белков мембран митохондрий печени крысы // Укр. биохим. журн.—1990.—62.—С. 29—35.
6. Петрова Г. В., Капралов А. А., Ижогина И. А., Донченко Г. В. Влияние α-токоферола и убихинона на РНК-полимеразную активность митохондрий. Роль токоферолсвязывающих белков // Биохимия.—1994.—59, № 4.—С. 575—581.
7. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C. Azzi A. Inhibition of cell proliferation by tocopherol // J. Biol. Chem.—1991.—266, № 10.—Р. 6188—6174.

8. Пальмина Н. П., Мальцева Е. Л., Курникова Н. В., Буракова Е. Б. Влияние токоферола в широком спектре концентраций (10^{-2} — 10^{-17} М) на активность протейн-киназы С. Связь с пролиферацией и опухолевым ростом // Биохимия.—1994.—59, № 2.—С. 193—200.
9. Kleineke J., Soling H. D. Mitochondrial and extramitochondrial Ca^{2+} pools in the perfused rat liver // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 2.—Р. 1040—1045.
10. Malvia A. N., Block C. Nuclear protein kinase C and signal transduction // Receptor.—1993.—3, N 4.—Р. 257—276.
11. Woodgett J. R., Hunter T., Gould K. L. Protein kinase C and its role in cell growth // Cell Membrane. Methods and reviews /Eds E. L. Elson, W. A. Frasier, R. Glaser.—New York: Plenum Publ. Corp., 1987.—Vol. 3.—Р. 1—88.
12. Левицкий Е. Л., Губский Ю. И. Регуляторное влияние ионов кальция и циклических нуклеотидов на синтез ДНК в клетках млекопитающих // Биохимия животных и человека.—Київ: Наук. думка, 1990.—Вып. 14.—С. 33.
13. Алмазов А., Шляхто Е. В. Антагонисты Са и их применение при артериальной гипертензии // Междунар. мед. обзоры.—1993.—1, № 4.—С. 305—309.
14. Авдонин П. В., Ткачук В. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций.—М.: Наука, 1994.—288 с.
15. Parsons D. F., Williams G. R. Isolation and purification of the outer membrane and inner membrane of liver mitochondria // Meth. Enzymol.—1967.—10.—Р. 443—448.
16. Транскрипция и трансляция. Методы.—М.: Мир, 1987.—285 с.
17. Donchenko G. V., Kapralov A. A., Petrova G. V. Alpha-tocopherol prevents the inhibitory effects of A23187 and verapamil on RNA synthesis in isolated rat liver nuclei: XIIth Int. Congr. of Pharmacol. (July 1994) // Can. J. Physiol. and Pharmacol.—1994.—72, N 1.—Р. 247.
18. Maguire J. J., Wilson D. S., Packer L. Mitochondrial electron transport linked tocopheroxyl radical reduction // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 36.—Р. 21462—21465.
19. Frei B., Kim M. C., Ames B. N. Ubiquinol-10 is an effective lipid soluble antioxidant at physiological concentrations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87, N 12.—Р. 4879—4883.
20. Aronica S. N., Kraus W. L., Katzenellenbogen B. S. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription // Ibid.—1994.—91, N 18.—Р. 8517—8521.
21. Moyer M. L., Borrer K. C., Bona B. J. et al. Modulation of cell signaling pathways can enhance or impair glucocorticoid-induced gene expression without altering the state of receptor phosphorylation // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 30.—Р. 22933—22940.
22. Nemere I., Zhou L.-X., Norman A. W. Nontranscriptional effects of steroid hormones // Receptor.—1993.—3, N 2.—Р. 277—291.
23. Каушаров К. П., Васильева Е. В., Рууге Э. К. Генерация супероксидных радикалов дыхательной цепью митохондрий изолированных кардиомиоцитов // Биохимия.—1994.—59, № 6.—С. 813—818.
24. Shodji I., Uedono H., Ihsikura H. et al. DNA damage induced by tumour necrosis factor α in I.929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation // Immunology.—1995.—84, N 4.—Р. 543—548.
25. Kristal B. S., Chen J. J., Yu B. P. Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species // Free Rad. Biol. and Med.—1994.—16, N 3.—Р. 323—330.

УДК 577.112.7

Поступила в редакцию 27.12.96