

Biogenesis of mitochondria in the differentiation and aging of cells. A.N. Lobachev,  
Moscow 1985. VINITI 19.09.85, №6756-B85 Dep.(28p.)  
Mitochondrial theory of development, aging and carcinogenesis (Part II)

А.Н.Лобачев  
БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ  
И СТАРЕНИИ КЛЕТОК

Митохондриальная теория развития, старения и злокачественного роста (часть II)

Москва – 1985

С точки зрения термодинамики клетка является открытой системой, удаленной от термодинамического равновесия, и для поддержания ее жизнедеятельности требуется определенный поток отрицательной энтропии. Иными словами, для удовлетворения потребностей клетки, связанных с обновлением ее структуры, ростом и выполнением специализированных функций, требуется определенный поток нужных компонентов.

В отсутствие клеточных нарушений и при оптимальных внешних условиях клетка как самоорганизующаяся система производит необходимые структурные и функциональные элементы, т.е. производит представляющую ценность упорядоченность.

Качественный и количественный состав клеточных элементов задается генетическим кодом, поэтому потребности клетки в потребляемых из окружающей среды компонентах являются генетически запрограммированными.

При возникновении ограничений производству упорядоченности в клетке, вследствие уменьшения в окружающей среде важных компонентов или уменьшения синтеза нужных компонентов внутри клетки из-за клеточных нарушений или вследствие исчерпания биосинтетических потенций генома, появляется необходимость такого изменения экспрессии генетического кода, при котором генетически заданный уровень производства упорядоченности клетки приводится в соответствие к фактическому уровню.

Иными словами, потребности клетки должны целесообразно снижаться с уменьшением возможностей ее обеспечения.

Если генетическая программа задает структуру, которая может существовать только при более высоком уровне необходимых компонентов, чем тот, который клетка может получить при данных ограничениях, то со временем в единице ее объема увеличивается количество дефектных структурных элементов, т. е. увеличивается не представляющая ценности упорядоченность, или, иначе, растет структурная разупорядоченность клетки. Это ведет к снижению эффективности ее функционирования, увеличению вероятности ее гибели.

В качестве примера можно привести несбалансированный рост

бактерий или клеток HeLa в культуре при недостатке тимидина, индуцированном одним из двух агентов аметоптерином или 5-флуороурацил-2-дезоксирибозидом (54). После того, как синтез ДНК блокируется и клетки перестают делиться, РНК и белок продолжают накапливаться. Аккумуляция РНК происходит в течение 24 часов, затем полностью прекращается. Белок продолжает накапливаться сверх этого периода, но с меньшей скоростью. Размеры клеток увеличиваются на протяжении 72 часов и более. После 24 часов несбалансированного роста быстро растет вероятность гибели клеток. Аминокислотное голодание избавляет клетки от смерти обусловленной недостатком тимидина. Несбалансированный рост отсутствует, полностью предотвращается аккумуляция РНК и белка (54).

Гибель от несбалансированного роста объясняется тем, что в отсутствие удвоения ДНК ограниченные биосинтетические потенции генетического материала не соответствуют росту клетки. После 24 часов несбалансированного роста увеличение размеров клетки сопровождается увеличением отношения белок/РНК. Недостаток РНК, обусловленный в свою очередь недостатком ДНК, ведет к снижению скорости обновления белков и росту накопления дефектных пептидов. Аминокислотное голодание предотвращает несбалансированность, активируя механизм, координирующий рост и белок синтезирующие потенции клетки с доступностью питательных веществ.

Выделим два возможных пути адаптации, которые реально могут осуществляться клеткой одновременно. Первый путь - когда клетка имеет возможность избежать или обойти ограничения, уменьшающие производство упорядоченности в ней.

Например, бактерии *Paracoccus denitrificans* имеют классическую цитохромную цепочку подобную митохондриальной. При ингибировании дыхания цианидом в них разрабатывается альтернативный путь окисления с помощью включения в цитоплазматическую мембрану дополнительного переносчика - цит. а. Таким образом, бактерии обходят ограничивающее дыхание препятствие, становятся к нему резистентными (29).

Второй путь - когда возможности клетки недостаточны, чтобы обойти ограничения, и возникает необходимость соответствующего изменения ее генетически запрограммированных потребностей.

Биологический смысл этого заключается в том, что генетически заданный уровень производства структурных элементов клетки должен целесообразно снижаться в соответствии со снижением поступления незаменимых компонентов, необходимых для их построения. В противном случае увеличивается количество дефектных, незавершенных, неспособных нормально функционировать структурных элементов.

Основными структурными и функциональными элементами клетки являются белки. Спектр белков задается генетическим кодом клетки и определяет ее специфические свойства. Белковые компоненты определяют потребности клетки в других небелковых структурных элементах (например, липидах, входящих в состав всех клеточных мембран). Поэтому, при отсутствии возможности устранить дефицит небелковых компонентов изменением ассортимента или количества соответствующих ферментов, адаптация клетки фактически сводится к соответствующему уменьшению генетически заданной упорядоченности ее белковой части-снижению потребностей.

Многие незаменимые компоненты и предшественники являются общими и в одинаковой степени необходимыми для реализации всей или основной части генетической информации. Например, дефицит незаменимых аминокислот или внутриклеточных компонентов, таких как АТФ, рРНК, факторов инициации, некоторых рибосомальных белков и т.д., затрагивает общий синтез белка. При целесообразном укорочении генетической программы за счет избирательной депрессии или делеций (см. ниже) генетических участков, кодирующих наименее существенные белки, дефицитный компонент сохраняется для ускорения синтеза продуктов более важных генов.

Таким образом, обострение "конкуренции" между структурными элементами клетки при дефиците нужных компонентов и ее ослабление в процессе адаптации составляют суть сформированного

выше термодинамического принципа, выполнение которого необходимо для обеспечения максимальной стабильности генетически заданной структуры клетки или, другими словами, минимального уровня накопления в ней повреждений.

Примером механизма адаптации клеток к дефициту незаменимых компонентов может служить механизм строгого ответа бактерий (59) или сходный с ним механизм плейотипического ответа клеток животных (31). Бактерии быстро координируют свой рост и генетически заданный уровень синтеза белка в соответствии с доступностью аминокислот, энергии и других питательных веществ. Так, у аминокислотных ауксотрофов при недостатке требуемой аминокислоты в ростовой среде постепенно замедляется рост, и они переходят в стационарную фазу. Механизм строгого ответа заключается в том, что в условиях дефицита в бактериях накапливается гуанозин-5-дифосфат-3-дифосфат (фаГФФ), вызывающий множество эффектов. Наряду со снижением общего синтеза белка, ограничивается общий синтез РНК, селективно подавляется синтез компонентов белок синтезирующего аппарата: р и тРНК, рибосомальных белков, факторов трансляции и др., активируется протеолиз (59). Аналогичный ответ наблюдается в клетках животных (16, 31, 56).

Вследствие сбалансированного уменьшения генетически заданного уровня мощности белок синтезирующего аппарата, с одной стороны - сокращаются неоправданные материальные и энергетические затраты на его содержание, с другой - сокращается количество пептидов, одновременно находящихся в процессе синтеза. В результате уменьшается "конкуренция" между пептидами за дефицитный компонент, что ведет к усилению синтеза индивидуальных пептидов.

Уменьшению накопления дефектных белков и ускорению синтеза пептидов способствует также активирование протеолиза, благодаря которому увеличивается пул аминокислот.

Ослабление "конкуренции" является целесообразным не только на уровне синтеза пептидов, но и на других уровнях структурной организации клетки.

При сборке комплексов сбалансированное уменьшение синтеза всех элементов при дефиците одного из них уменьшает аккумуляцию дефектных комплексов.

Снижение под действием строгого контроля одновременно с синтезом белка синтеза липидов и фосфолипидов, видимо, отражает скоординированное изменение производства структурных элементов клетки.

В отличие от прокариотов, представляющих собой самостоятельные организмы, клетки высших эукариотов организованы в сложную структуру, и их жизнедеятельность зависит друг от друга. Функциональная активность клеток в организме не направлена только на решение их собственных проблем, как это имеет место у прокариотов. Значительную часть работы они совершают в интересах всего организма.

Вследствие специализации размножение клеток тормозится, при этом в хроматине увеличивается содержание гистонов, повышающих стабильность ДНК. Торможение размножения клеток в процессе специализации обусловлено не критическим снижением синтеза белка из-за недостатка каких-либо незаменимых компонентов, а происходит вследствие перераспределения метаболических ресурсов клетки с процесса роста на синтез новых функциональных элементов для выполнения клеткой работы соответствующей ее назначению в организме. Ясно поэтому, что для поддержания малодифференцированного состояния клетки (без воспроизведения) требуется меньше материальных и энергетических затрат, чем это необходимо для ее терминальной дифференциации.

В процессе развития организма баланс между пролиферацией и дифференциацией смещается в сторону дифференциации. Это означает несбалансированное уменьшение синтеза ДНК по отношению к уровню синтеза РНК и белка. В этом заключается основное сходство между терминальной дифференциацией и несбалансированным ростом клеток, обусловленным недостатком тимидина.

Уместно отметить, что снижение синтеза тимидиновых предшественников, в отличие от других предшественников ДНК, играет ключевую роль в депрессии репликации ДНК дифференцирующихся клеток (24, 25). Аккумуляция РНК и белка в процессе терминальной дифференциации связана с развитием специализированных функций.

Рост клеток при этом тормозится, что отличает дифференциацию от несбалансированного роста. Антагонизм между дифференциацией и пролиферацией клеток имеет место во многих тканях (21, 24, 27, 35, 62, 71). Он свидетельствует о том, что одни и те же метаболические ресурсы вовлекаются либо в процесс пролиферации, либо в процесс дифференциации.

Перераспределение производимой клеткой работы с процесса роста на выполнение специализированных функций ведет к уменьшению скорости роста клетки и, следовательно, к увеличению работы производимой в единицу ее объема. Это предполагает повышение концентрации митохондриального материала и увеличение потока компонентов через единицу клеточной поверхности для поддержания нормального состояния митохондриального метаболизма. Поэтому при низких концентрациях в окружающей среде важных для функционирования митохондрий компонентов, перераспределение метаболических ресурсов клетки с процесса роста на специализацию не является предпочтительным.

В самом деле, в результате такого перераспределения уменьшается поток незаменимых компонентов в митохондрии, что снижает энергетическое обеспечение клетки. Клетка может избежать энергетический недостаток, отдавая предпочтение пролиферации, либо приспособиться к нему, сокращая избыток метаболических ресурсов, высвобождающихся вследствие торможения ее роста. Это, однако, препятствует прогрессированию специализации клетки, что делает бессмысленным перераспределение ресурсов на дифференциацию, как процесс, не дающий в данных условиях нужного результата и вместе с тем сокращающий производимую клеткой полезную работу и замедляющий ее рост. В отсутствии же такого рода адаптации прогрессирование дифференциации ведет к росту структурной разупорядоченности клетки, ввиду несоответствия ее потребностей возможностям обеспечения, что увеличивает вероятность ее гибели.

Таким образом, в условиях недостатка в окружающей среде необходимых для функционирования митохондрий компонентов, предпочтительнее является смещение баланса между пролиферацией и дифференциацией в сторону пролиферации. Это ослабляет "конкуренцию" между

митохондриями за недостающие компоненты, что увеличивает энергетическое обеспечение клетки.

В процессе специализации может происходить перераспределение не только энергетических, но и других клеточных ресурсов. Например, усиление синтеза специфических белков за счет уменьшения синтеза белков роста ведет к увеличению уровня синтеза белка в единице объема клетки, что соответственно требует более высокого потока незаменимых аминокислот и других компонентов через единицу клеточной поверхности. Ясно, что в зависимости от специфической функции может происходить увеличение потребления тех или иных компонентов из окружающей среды. Однако любая специфическая функция требует энергетических затрат и отвлекает энергетические ресурсы от процесса роста.

Поэтому при разных видах специализации клеток наиболее общим в процессе смещения баланса между дифференциацией и пролиферацией в сторону дифференциации является увеличение концентрации митохондриального материала в клетках и усиление потока компонентов, необходимых для поддержания нормального состояния митохондриального метаболизма, через единицу клеточной поверхности. Это придает особое значение митохондриям в контроле баланса между процессами дифференциации и пролиферации.

Рассмотрим следующие экспериментальные данные. Проводились исследования *in vivo* заживления ран и развития экспериментальной гранулирующей ткани у крыс при различных напряжениях потребляемого кислорода (42). В гранулирующей ткани отношение РНК-рибоза/ДНК (РНК исследовалась как рибоза) отражает способность фибробластов синтезировать белок и, кроме того, может рассматриваться как индекс клеточной дифференциации. Ингаляция газовой смеси с содержанием кислорода 12%, 18%, 35% и 70% ассоциирует с соответствующим увеличением на 15й день отношения РНК-рибоза/ДНК и увеличением скорости синтеза специфического белка каллогена.

Экспозиция 12% O<sub>2</sub> ингибировала клеточную дифференцировку. Скорость пролиферации фибробластов судя по концентрации ДНК в грануломах была ниже на 15й день при 12% O<sub>2</sub>, чем при 18% O<sub>2</sub>. Вместе с тем, более значительное ингибирование пролиферации по сравнению с экспозицией 12% O<sub>2</sub> наблюдалось на 15й день при соответствующем повышении парциального давления кислорода от 18% до 35% и особенно при 70% (46). В других экспериментах исследовалось влияние ингибиторов гликолиза на пролиферацию эпидермиса у личинок и взрослых угрей (51). Иодацетат натрия и фтористый натрий, добавленные в окружающую рыб среду, резко усиливают митозы во всех слоях эпидермиса. Эффект ингибиторов гликолиза не проявлялся, если одновременно с ними добавляли пиродифосфат натрия, пируват натрия или в два раза повышали парциальное давление кислорода. Авторы считают, что снижение энергетического баланса приводит к уменьшению клеточной дифференцировки.

В этом же аспекте интерес представляют эксперименты по исследованию значения метионина в дифференциации зачатка поджелудочной железы зародышей мыши и крысы в органной культуре (49). Рост поджелудочной железы в среде дефицитной по метионину был в отношении веса и размера почти таким же, что и в контрольной среде (с экстраметионином), при этом отсутствовала сколь-нибудь существенная дифференциация. Добавка метионина или S-аденозилметионина в значительно большей степени способствует прогрессу дифференциации, чем пролиферации. Таким образом, при недостатке метионина баланс между дифференциацией и пролиферацией смещается в сторону пролиферации.

С другой стороны, дефицит какой-либо одной из десяти других аминокислот тестированных в данной работе (глицин, цистеин, аргинин, лизин, лейцин, изолейцин, тирозин, фенилаланин, серин и триптофан) не имел подобного эффекта. Напротив, наблюдалось значительное уменьшение роста эксплантата, ассоциированное с дифференциацией выживаемых клеток. Количество некрозов при этом было гораздо больше, чем в среде дефицитной по метионину (49). Недостаток метионина может затрагивать многие клеточные процессы: трансаминирование, синтез

белка, полиаминов и др. Вместе с тем, метионин имеет особое значение в поддержании нормального функционирования митохондрий, поскольку N-формилметионин-тРНК инициирует синтез пептидов на митохондриальных 70s рибосомах.

В сумме эти экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что митохондрии представляют одно из основных звеньев, контролирующих баланс между процессами дифференциации и пролиферации, и что ограничение потока незаменимых компонентов, имеющих особое значение для поддержания высокого уровня митохондриального метаболизма, способствует смещению баланса в сторону пролиферации. Можно полагать, что некоторые мутации, ведущие к повреждению митохондриальных функции, воспринимаются клеткой как сигнал, свидетельствующий о недостатке потока незаменимых компонентов в митохондрии. Стремясь избежать этот недостаток, клетка "предпочитает" пролиферировать. Генетически детерминированное смещение баланса между дифференциацией и пролиферацией в сторону пролиферации должно ослаблять ингибирование размножения клеток при увеличении их плотности или недостатке сыворотки в среде культивирования и может быть причиной их злокачественного перерождения.

Митохондрии в отличие от других органоидов клетки имеют собственный генетический материал и размножаются делением. Образуются митохондрии, вследствие ассоциации белковых компонентов, синтезируемых на митохондриальных и цитозольных рибосомах. Большинство митохондриальных белков кодируется в ядре и является общим для всех содержащихся в клетках митохондрий, среди них все ферменты, необходимые для репликации митохондриальной ДНК (мтДНК) и для синтеза РНК, а также белки, входящие в состав митохондриальных рибосом и белковые факторы, участвующие в синтезе белков. МтДНК включает лишь незначительную часть генетической информации. На ней кодируются две рРНК митохондрий, тРНК аминокислот и мРНК некоторых субъединиц комплексов дыхательных ферментов (5). Рпликация мтДНК происходит независимо от репликации

ядерной ДНК, а размножение митохондрий частично автономно от размножения клеток (44,45,67,34,63).

Это объясняется избыточным синтезом в цитоплазме быстро растущих клеток белков, необходимых для размножения митохондрий. Замедление размножения клеток, вследствие структурных изменений не связанных с ограничением потока незаменимых компонентов в них, не сопровождается торможением роста популяции митохондрий до тех пор, пока увеличение их количества в клетках не упразднит этот избыток.

В клетках, размножающихся экспоненциально, количество митохондрий на клетку остается постоянным (42,26). При торможении размножения клеток в процессе дифференциации, количество митохондрий в них увеличивается. Исследования, проведенные на спектре гепатом с различными скоростями роста, продемонстрировали, что количество митохондрий в медленно растущих клетках больше по сравнению с быстро растущими малодифференцированными клетками (48). Ряд исследователей продемонстрировал увеличение в период раннего постнатального онтогенеза количества митохондрий в клетках животных. Росс и Или показали, что в печени крыс линии Вистар в возрасте 4х недель, 5-6 месяцев и 21 месяца количество митохондрий на одно ядро приходится соответственно  $303 \pm 36$ ,  $623 \pm 39$ ,  $603 \pm 25$  (53). По данным Онтко (47) количество митохондрий на единицу веса печени крысы резко увеличивается в раннем постнатальном онтогенезе, достигает плато в 5-дневном возрасте и после остается постоянным. У взрослых крыс количество митохондрий на единицу веса печени в три раза больше по сравнению с новорожденными. Ввиду того, что в раннем постнатальном онтогенезе увеличиваются также размеры клеток, автор полагает, что увеличение количества митохондрий на одно ядро должно быть более чем трехкратное. В сердце крыс количество митохондриального белка на единицу сырого веса ткани увеличивается с 26,6 мг/г у новорожденных до 80,7 мг/г у 14-дневных (33). Самсон с сотрудниками (55) докладывали о пятикратном увеличении количества митохондрий в клетках мозга крысы в период возраста от I до 21 дня. Увеличение митохондриального генезиса в раннем постнатальном онтогенезе отмечено также в других работах (19,14,48, 68,18).

Итак, увеличение концентрации митохондрий в клетках является необходимым условием для реализации процесса терминальной дифференциации и при отсутствии прочих ограничений может определять скорость ее прогрессирования. Торможение размножения митохондрий в высококодифференцированных клетках осуществляется по принципу ограничения потока отрицательной энтропии, т.е. посредством уменьшения содержания в митохондриях по мере увеличения их количества синтезируемых в цитоплазме незаменимых компонентов. ДНК митохондрий при этом не стабилизируется белками, подобно ДНК в ядрах клеток. В отношении организации генома и собственной системы белкового синтеза митохондрии имеют большое сходство с прокариотами (30), но геном митохондрий гораздо меньше генома бактерий. Потребность в количестве синтезируемых в цитоплазме митохондриальных компонентов задается количеством мтДНК. С увеличением содержания мтДНК в клетке увеличивается и количество кодируемых на мтДНК компонентов, которые в условиях дефицита могут "конкурировать" между собой за компоненты синтезируемые в цитоплазме. Например, рРНК могут "конкурировать" за синтезируемые в цитоплазме рибосомальные белки, мтДНК - за ДНК-реплицирующие комплексы. Снижение поступления в митохондрии, по мере увеличения их количества в клетке, синтезируемых в цитоплазме митохондриальных компонентов должно приводить к уменьшению производства упорядоченности в митохондриях, снижению их функциональной активности и замедлению размножения. Поскольку митохондрии размножаются в "ограниченном жизненном пространстве", то поток незаменимых компонентов в них будет уменьшаться до тех пор, пока не прекратится рост популяции митохондрий в клетке. Ясно, что в условиях острого дефицита в митохондриях должно увеличиваться количество дефектных структурных комплексов, не способных нормально функционировать вследствие недостатка синтезируемых в цитоплазме митохондриальных компонентов. Замедление размножения митохондрий следует рассматривать

как выработанный в процессе эволюции механизм адаптации, благодаря которому, при уменьшении потока незаменимых компонентов в митохондриях, соответствующим образом снижается синтез мтДНК и кодируемых ею продуктов. Механизм адаптации реализуется у митохондрий через мембрану и имеет значение в поддержании целостности мтДНК (см. ниже). У митохондрий отсутствует система селективной регуляции транскрипции отдельных участков ДНК (5), поэтому митохондрии не могут адаптироваться к уменьшению потока незаменимых компонентов путем депрессии генов, не являющихся необходимыми при данных условиях. Следовательно, остановка размножения митохондрий происходит при таком критическом уровне незаменимых компонентов, который фактически совпадает с критическим уровнем для существования структуры митохондрий, задаваемой с помощью мтДНК. Это значит, что в неразмножающихся митохондриях мтДНК должна находиться в лабильном состоянии и легко распадаться. В процессе распада могут образоваться жизнеспособные мутантные митохондрии, у которых осталась и реплицируется только часть молекулы мтДНК, и которые, благодаря структурной примитивизации, могут иметь селективное преимущество перед нормальными митохондриями, для поддержания целостности структуры которых требуется большой поток отрицательной энтропии. Таким образом, усиление мутагенеза и "дарвиновский" отбор образующихся вследствие делений наилучшим образом приспособленных мутантов может быть одним из основных способов "адаптации" к критическому снижению уровня незаменимых компонентов живых систем (подсистем) с такой примитивной организацией генома, как у митохондрий.

Хороший объект для исследования биогенеза и мутагенеза митохондрий представляют собой факультативные анаэробы *Saccharomyces cerevisiae*. У этих дрожжей известны цитоплазматические *petite*-мутанты или иначе  $\rho^-$ -мутанты, в мтДНК которых отсутствует *rho* детерминанта, определяющая дыхательную компетентность митохондрий (10).  $\rho^-$ -мутации образуются вследствие обширных делеций мтДНК и последующей компенсаторной амплификации остающихся участков молекулы. Благодаря тандемному повторению сохранившегося участка, размеры молекулы становятся

сравнимы с нормальным геномом. Если амплифицирующий фрагмент содержит участок инициации репликации (rep- область), то с большой вероятностью может оказаться, что  $\rho^-$ -мтДНК будет обладать большим сродством к мтДНК-реплицирующему комплексу по сравнению с  $\rho^+$ -мтДНК и в "конкуренции" сможет вытеснить последнюю из клетки, когда эти детерминанты одновременно находятся в ней. В этом заключается феномен супрессивности, который проявляется при скрещивании 2х гомологичных клонов  $\rho^-$  и  $\rho^+$  и степень которого широко варьирует у разных  $\rho^-$  клонов (12). Появление супрессивных  $\rho^-$ -митохондрий в факультативных анаэробах *Sacch. cere.* не сопровождается гибелью этих клеток. Очевидно, противоположным будет результат в случае появления мутантных митохондрий, подобных супрессивным  $\rho^-$ -митохондриям у *Sacch. cere.* в клетках аэробных организмов. В связи с этим, интересны эксперименты по изучению вегетативного старения грибов *Podospora anserina* (9,17). Исследование свойств мтДНК старых культур *Podospora anserina* выявило их значительное сходство с  $\rho^-$ -мтДНК *Sacch. cere.* Авторы высказывают гипотезу, что старение *Podospora anserina* обусловлено спонтанным появлением супрессивных  $\rho^-$ -подобных мутантных митохондрий, доля которых с возрастом увеличивается, что, в конце концов, приводит организм к гибели.

Эти эксперименты дают основания предполагать, что аналогичные явления могут иметь место в высокодифференцированных клетках высших организмов и что иницирующим механизмом для этого является распад мтДНК вследствие торможения размножения митохондрий.

Из соображений термодинамики следует также вывод, что причиной petite-индукции является снижение потока отрицательной энтропии в митохондрии ниже некоторого критического уровня, который необходим для реализации структуры митохондрий задаваемой с помощью мтДНК. Другими словами, при критическом уменьшении представляющей ценность упорядоченности единицы объема митохондрий, например,

вследствие ингибирования дыхания, или ингибирования транскрипции и трансляции антибактериальными антибиотиками, или вследствие острого дефицита таких незаменимых компонентов как АТФ, рРНК, факторов инициации, некоторых рибосомальных белков и др., часть из которых кодируется в ядре и синтезируется в цитоплазме, мтДНК должна переходить в лабильное состояние и распадаться, способствуя образованию делеционных мутантов. Этот вывод подтверждается многочисленными экспериментами по индукции *petite*-мутантов (70,64,43).

Подобно бактериальной ДНК, которая ассоциирует с мембраной на участке начала репликации, мтДНК может образовывать комплекс с белками внутренней мембраны, который имеет большое значение в регуляции репликации мтДНК (6,45,4,52). Такие комплексы изолировались из митохондрии печени крысы, и была продемонстрирована их способность осуществлять синтез мтДНК *in vitro* (57,58). Интересно отметить, что в быстро размножающихся клетках чаще встречаются мтДНК, присоединенные к мембране, чем в митохондриях высококодифференцированных тканей (45). От состояния митохондриальной мембраны зависит скорость репликации мтДНК (28). Вместе с тем, мембрана вовлечена в поддержание целостности мтДНК (70,8,43). Самые разнообразные агенты, индуцирующие *petite*, одновременно прерывают синтез мтДНК. С другой стороны, блокировка синтеза мтДНК сопровождается *petite*-индукцией, при этом снижается содержание мтДНК, вследствие их деградации (70,43).

Ввиду исключительной роли мембраны в поддержании целостности и синтеза мтДНК высказывалось предположение, что митохондриальная мембрана устроена таким образом, что модифицирование компонентов вовлеченных в одну функцию искажает мембрану, вследствие чего другая отдельная функция также меняется, и что такое взаимодействие, по-видимому, имеет место между различными энзимными комплексами ответственными за репликацию и поддержание целостности мтДНК (65).

Итак, экспериментальные данные свидетельствуют о наличии сопряжения через мембрану синтеза мтДНК с поддержанием ее целостности.

Согласно постулируемому механизму адаптации митохондрий к уменьшению потока отрицательной энтропии, мембрана выполняет функцию датчика, регистрирующего степень разупорядоченности митохондрий вследствие дефицита необходимых компонентов, и передает информацию об этом на соответствующие энзимные комплексы. В свете симбиотической гипотезы происхождения митохондрий можно спекулировать, что этот механизм был выработан в процессе эволюции у свободноживущих предков митохондрий и сохранился у них при переходе к жизни внутри клеток. Вместе с тем, достаточно эффективных средств для дополнительной стабилизации мтДНК и ликвидации сопряжения блокировки синтеза мтДНК с усилением ее распада в клетках, по-видимому, не обнаружилось. Поэтому, при значительном торможении размножения митохондрий, происходит деградация мтДНК, что является причиной естественного старения и гибели организмов.

Необходимо отметить, что в клетках имеются механизмы утилизации митохондрий, с помощью которых они могут удалять избыток органелл в случае снижения потребностей в энергетическом обеспечении. Однако в процессе терминальной дифференциации перестройка метаболизма клеток направлена на развитие специализированных функций, и увеличение содержания митохондрий происходит в соответствии с увеличением потребностей клеток.

Приведем некоторые экспериментальные данные о возрастных изменениях биогенеза митохондрий в печени крыс. Синтез мтДНК в митохондриях печени крыс снижается с момента отнятия от матери до 210 дня (41). Общее количество мтДНК в печени крыс возрастает от 1 до 12 месячного возраста, а затем снижается к 24 месячному возрасту на 35% (61). Количество мтДНК (в мкг), приходящееся на 1 мг белка митохондрий,

возрастает от одномесячного возраста ( $0,56 \pm 0,04$ ) к 3х месячному, достигая в этом возрасте максимальной величины ( $0,735 \pm 0,04$ ) и значительно снижается в последующие периоды онтогенеза (12 месяцев-  $0,394 \pm 0,05$ ; 24 месяца-  $0,316 \pm 0,03$ ) (3).

На печени крыс было установлено, что при старении животных снижается скорость оборота белков митохондрий, кодируемых митохондриальным геномом. Время жизни митохондриальных белков, кодируемых ядерным геномом, не зависит от возраста животных (2). Эти данные свидетельствуют о том, что торможение биогенеза митохондрий не является результатом депрессии синтеза митохондриальных белков, кодируемых ядерным геномом, а скорее обусловлено дефицитом этих белков, образующегося вследствие увеличения количества митохондрий в клетках.

Снижение с возрастом скорости обновления синтезируемых в митохондриях белков происходит подобно тому, как это имеет место в бактериях под действием хлорамфеникола, в клетках животных под действием циклогексимида или при дефиците РНК в условиях несбалансированного роста, когда одновременно с замедлением синтеза замедляется и распад белков (31).

В отличие от действия ингибиторов синтеза пептидов, при дефиците аминокислот происходит активация протеолиза, т.е. включаются клеточные механизмы адаптации. Если недостаток аминокислот является незначительным и клетка может к нему приспособиться, то, благодаря ускорению утилизации клеточных структур, в том числе и митохондрий, их обновление поддерживается на уровне выше критического. Это может препятствовать активированию собственных механизмов адаптации митохондрий ведущего к образованию митохондриальных мутантов.

Снижение с возрастом обновления синтезируемых на миторибосомах белков дает основание считать, что распад мтДНК при старении происходит по тому же механизму, что и распад мтДНК под действием хлорамфеникола в экспериментах Вильямсона с сотр. (70) и, что образование делеционных мутантных митохондрий может иметь место, подобно тому, как под действием хлорамфеникола индуцируются

*petite*-мутации (70). Снижение окислительного фосфорилирования вследствие деградации мтДНК, приводит к постепенному уменьшению производства АТФ в клетках. Возможны два пути эволюции клеток.

Первый, естественный для клеток организма путь - старение, выражается он в постепенном снижении функциональной активности клеток до некоторого критического уровня. Обладая хорошо развитой системой регуляции экспрессии генома, клетки (в отличие от митохондрий) могут приспосабливаться к недостатку АТФ депрессией менее существенных генов, в частности сокращая избыточную мощность белок синтезирующего аппарата.

Так, было показано, что при старении сердца у людей и животных доля генов, участвующих в транскрипции рРНК уменьшается на 30% (32).

Благодаря такого рода адаптации продлевается жизнь стареющих клеток, однако в конечном итоге они гибнут.

Второй путь, - дедифференцировка, благодаря которой старые не размножающиеся клетки, слабо функционирующие вследствие низкого производства АТФ дефектными митохондриями, могут, тем не менее, перейти в состояние роста. Более того, митохондриальный дефект, согласно сделанному ранее выводу, может препятствовать редифференцировке клеток, смещая баланс между процессами дифференцировки и пролиферации в сторону пролиферации, на наш взгляд это путь злокачественного перерождения клеток.

Рассмотрим вторую возможность.

Некоторые *petite*-мутанты могут содержать очень маленький сегмент мтДНК с гер-областью. У них может совершенно отсутствовать митохондриальный синтез белка и, тем не менее, оставшийся фрагмент мтДНК может успешно реплицироваться, конкурируя и вытесняя из клетки нормальную мтДНК. Очевидно, что такие *petite*-мутации - экстремальный случай, который свидетельствует о том, что для существования митохондрий не является необходимой большая часть мтДНК, если клетки могут жить анаэробно. Эксперименты по исследованию экстроядерных мутантных линий облигатных аэробов *Neurospora crassa* демонстрируют,

что некоторые митохондриальные гены не являются необходимыми для поддержания жизнеспособности также и аэробных клеток. *N.crassa* обладают цитохромной системой, такой же, как у млекопитающих, и зависят от окисления восстановительных эквивалентов и синтеза АТФ окислительной цепочкой. У *N.crassa* известен класс stopper-мутантов, который характеризуется большим дефицитом цитохромов *b* и *aa3*. Название этих мутантов происходит от необычного ростового фенотипа, который проявляется в неравномерном чередовании периодов роста и остановок роста (11). У 3х stopper-мутантов дефекты мтДНК обусловлены делециями. МтДНК одного из них- (*stp*) представлены преимущественно дефектными молекулами, которые сохраняют приблизительно одну вторую часть мтДНК дикого типа. Авторы высказывают предположение, что необычный рост stopper-мутантов происходит вследствие конкуренции различных вариантов дефектных и менее дефектных мтДНК одновременно существующих в клетке. В этой работе делеции наблюдались также в мтДНК у трех других внехромосомных мутантов *N.crassa*, не проявляющих "стоп-старт" эффекта. У двух из этих мутантов (*roky-HI-10* и *SG-3-551*) сохранены разного размера сегменты той же области мтДНК, которая сохранена у (*stp*)-мутантов. Авторы считают, что образование дефектных мтДНК у *N.crassa* носит неслучайный характер, так что предпочтительно сохраняется определенный сегмент. Этот сегмент содержит гены для митохондриальной рРНК и большую часть митохондриальных генов для тРНК (11). Видимо, эти гены являются необходимыми для существования *N.crassa*. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что некоторые варианты митохондриальных делеционных мутаций совместимы с жизнеспособностью аэробных клеток. Отчасти это объясняется способностью клеток в некоторой степени приспосабливаться к нарушениям митохондриального метаболизма, соответствующим изменением генетической экспрессии в ядре.

В приведенном выше примере на бактериях *Paracoccus denitrificans* было продемонстрировано, как они обходят ограничивающее дыхание препятствие. У митохондрий большая часть генетической информации находится в ядре, поэтому для компенсации митохондриальных дефектов особое значение имеет ядерно-митохондриальное взаимодействие.

Так, у *N.crassa* одним из основных ответов на повреждение цитохромной цепи является индукция альтернативного пути окисления, который ответвляется на уровне флавопротеидов, шунтируя цитохромную цепь. Осуществляемый по этому пути процесс окисления не ингибируется антимицином, цианидом и азидом, но чувствителен к специфическому ингибитору цианид-нечувствительной оксидазы некоторых высших растений – салицил гидроксамовой кислоте. Альтернативный путь окисления разрабатывается в *N.crassa* в ответ на обработку хлорамфениколом (37), антимицином (36) вследствие некоторых респираторных мутаций. Например, у экстроядерных року-мутантов, получивших свое название за медленную скорость роста, наблюдаются ненормально низкие количества цитохромов *aa<sub>3</sub>*, *b* и *C<sub>1</sub>* и заметный избыток цитохрома *C*. Альтернативный путь отвечает за 70% дыхания в митохондриях року (37а). Року-фенотип связан с дефектом в синтезе или сборке рибосомальной 30s субъединицы митохондрий, один из белков которой- S-5 синтезируется в митохондриях и, по-видимому, кодируется мтДНК. Предполагается, что S-5 играет ключевую роль в регуляции сборки 30s субъединицы, стабилизируя связывание остальных рибосомальных белков, а также ускоряя процессинг предшественника 19sРНК (39). При росте *N.crassa* дикого типа в присутствии хлорамфеникола они приобретают фенотип року и у них, как и у року, наблюдаются неполные 30s субъединицы (39). Авторы приходят к выводу, что ингибирование созревания малой субъединицы происходит, по-видимому, вследствие ингибирования синтеза белка s-5 и что это является причиной появления фенотипа року. Исследование механизма индукции альтернативного пути окисления у *N.crassa* обработками хлорамфениколом, циклогексимидом и актиномицином Д (20) показало, что он вписывается в модель, для регуляции ядерных генов специфическим митохондриальным генетическим аппаратом *N.crassa* (7). Согласно этой модели, в митохондриях синтезируются кодируемые мтДНК белки, которые могут транспортироваться в ядро и репрессировать ядерные гены. Ингибирование митохондриального синтеза приводит к дерепрессии репрессированных генов.

Важно отметить что состояние, в котором у *N.crassa* индуцируется альтернативный путь окисления, следует рассматривать как "аварийное", поскольку эффективность альтернативной оксидазы в продукции АТФ и поддержании роста гораздо меньше эффективности цитохромной цепи (60). Вместе с тем, появление альтернативного пути в ответ на повреждение дыхательной цепи имеет, как полагают, по крайней мере, два полезных эффекта: а) помогает избежать ненормально высоких уровней восстановленных пиридин нуклеотидов и других метаболических интермедиаторов и б) стимулирует продукцию АТФ в пункте I и на субстратном уровне, давая возможность гликолизу и циклу Кребса действовать с более высокими скоростями.

Шунтирование поврежденных митохондриальных метаболических путей было продемонстрировано также в дифференцированных клетках экспериментами на политенных тканях *Drosophila hydei* (40). В политенных хромосомах *Drosophila hydei* наблюдается появление комплекса специфических пuffedов в ответ на резкое повышение температуры. Этот комплект называется температуро-чувствительным. Различные обработки затрагивающие митохондриальный метаболизм: блок респираторной цепи ротеноном, амиталом, антимицином А, азидом, блок цикла лимонной кислоты арсенитом, действие разобщителей динитрофенола и дикумарина продуцируют появление специфических пuffedов из температуро-чувствительного комплекта. Вслед за этим, в течение приблизительно 30 минут, становится явным увеличение активности определенных митохондриальных энзимов, что было продемонстрировано для НАДН-дегидрогеназы (EC 1.6.99.3), НАД зависимой изоцитрат дегидрогеназы (EC 1.1.1.41) и тирозин аминотрансферазы (EC 2.6.1.5).

С помощью актиномицина Д, циклогексимида и хлорамфеникола было установлено, что увеличение активности этих энзимов зависит от синтеза яРНК, цитоплазматического синтеза белка, и не зависит от синтеза белка в митохондриях, вместе с тем, активация генов комплекта теплового шока, сопровождается появлением фактора способного модифицировать  $\alpha$ -глицерофосфат дегидрогеназу (EC 1.1.1.8), в результате чего  $K_m$  этого фермента для  $\alpha$ -глицерофосфата уменьшается (69).

Это должно вести к ослаблению Пастеровского эффекта, усилению гликолиза, аэробному накоплению лактата.

В связи с этим интересно заметить, что ослабление Пастеровского эффекта в раковых клетках происходит благодаря снижению эффективности функционирования глицерофосфатного челночного механизма, вследствие недостатка цитоплазматической  $\alpha$ -глицерофосфат дегидрогеназы (13). По мнению авторов, помимо изменения уровня АТФ, специфическими индукторами одного или более генов комплекта теплового шока являются макромолекулярные субъединицы некоторых аллостерических ферментов, которые диссоциируют и выделяются митохондриями, вследствие резкого снижения содержания субстратов, лишаящего энзимы субстратной протекции (40,68). Таким образом, модель ядерно-митохондриального взаимодействия для дифференцированных клеток несколько отличается от таковой для *N.Crassa*, вместе с тем, результат этого взаимодействия в обоих случаях одинаковый - ядерный геном корректирует дефицит митохондриального метаболизма, благодаря чему клетка становится более адаптированной к новой ситуации. Изменение активности перечисленных выше ферментов в ответ на тепловой шок и различные повреждения митохондриального метаболизма, очевидно, способствует снижению уровня восстановленных пиридин нуклеотидов, а также ускорению функционирования цикла Кребса и гликолиза.

Из этого небольшого обзора ясно, что экстроядерные мутации совместимы с жизнеспособностью аэробных клеток, если они детерминируют нарушения митохондриального метаболизма к которым клетки могут адаптироваться.

В отсутствие жестких ограничений размножению митохондрий в клетках, нормальные митохондрии, надо полагать, более конкурентоспособны по сравнению с дефектными слабо функционирующими митохондриями, поэтому сохранение спонтанно возникающих мутантных митохондрий в отсутствие специального воздействия, ускоряющего их образование или создающего селективный пресс, дающего им селективные преимущества, представляется маловероятным.

Вместе с тем, как мы уже видели, ограничения, ведущие к значительному уменьшению уровня компонентов в одинаковой степени необходимых для реализации всех содержащихся в мтДНК генов, ускоряют мутагенез. Одновременно они создают селективные преимущества мутантным митохондриям, утратившим вследствие делеций оптимальное количество генетических участков, наименее существенных в условиях данного селективного пресса. Обладая более примитивной структурой, они в условиях дефицита незаменимых компонентов более жизнеспособны и размножаются быстрее нормальных митохондрий. Очевидно, что несущественными являются митохондриальные гены, которые в силу митохондриальных нарушений, возникающих в условиях селективного пресса, не выполняют возложенную на них функциональную нагрузку, т.е. нормальные митохондрии в данных условиях по фенотипу схожи с мутантными, утратившими эти гены.

Например, недостаток некоторых митохондриальных рибосомальных белков синтезируемых в цитоплазме или обработка хлорамфениколом, как это имеет место у *N.crassa* приводит к дефекту в сборке и замедлению созревания рибосомальных 30s субъединиц. К такому же результату приводит и недостаток митохондриально кодируемого рибосомального белка (s-5 у *N.crassa* ). Поэтому значительный дефицит некоторых цитоплазматически синтезируемых митохондриальных рибосомальных белков может способствовать индукции и селективному отбору делеционных мутантов митохондрий, в которых мутациями затронут рибосомальный белок, кодируемый мтДНК.

Таким образом, можно утверждать, что воздействия вызывающие нарушения митохондриальных функций, которые клетка может обойти, и которые приводят к значительному уменьшению структурной упорядоченности митохондрий, создают благоприятные условия для возникновения и селективного отбора мутантных митохондрий, у которых эти нарушения генетически детерминированы делециями. Образующиеся мутанты в состоянии самостоятельно поддерживать жизнеспособность клетки в отсутствие нормальных митохондрий, которые, при условии достаточно длительного селективного воздействия, они полностью вытесняют.

В результате в клетке стабилизируется состояние, которое сохраняется после снятия селективного воздействия, и которое в клетках с нормальными митохондриями используется обычно только в аварийных ситуациях, как мера, помогающая ей избежать кратковременные нарушения митохондриальных функций. Как уже отмечалось выше, это состояние характеризуется усилением аэробного гликолиза, накоплением лактата. Генетическое детерминирование такого состояния, является, на наш взгляд, причиной злокачественного перерождения клеток.

При старении селективное давление осуществляется ограничением ростовых факторов, тормозящим размножение митохондрий. Эволюция мтДНК под действием такого пресса может происходить только в направлении уменьшения ее линейной упорядоченности. Стимулирование старой клетки к росту в тот момент, когда большая часть митохондрий представлена мутантными, способными самостоятельно обеспечить существование клеток, фактически означает снятие селективного пресса и переход ее в стабильное "аварийное" состояние. В этом состоянии возможности клетки адаптироваться к тепловому воздействию в значительной степени исчерпаны, поэтому раковые клетки менее устойчивы к действию теплового шока по сравнению с нормальными. Таким образом, сходство между старой и раковой клетками в нарушении энергетического обмена нам представляется главной причиной повышения с возрастом вероятности злокачественного перерождения клеток.

Приведем любопытный факт. Ротенон является ингибитором окислительной цепи на уровне между НАДН и Ко Q и оказывает канцерогенное действие на крыс, индуцируя у них опухоли печени и молочной железы (23). С другой стороны, для двух гепатокарциногенов разных классов ААФ и 3-Ме-ДАБ на кусочках печени белых крыс было продемонстрировано ротеноноподобное действие на дыхание. Они также ингибируют окислительную цепь между НАДН и Ко Q (1).

Интересно, что в митохондриях изолированных из опухоли молочной железы, индуцированной у крыс ротеноном, наблюдается альтернативный путь транспорта электронов не чувствительный к ротенону, антимицину и цианиду. Содержание цитохромов близко к норме. Вместе с тем почти отсутствует дыхательный контроль и окислительное фосфорилирование (22). Как показали эксперименты на слюнных железах *Drosophila hydei* специфический ответ хромосом на ротеноновый блок связан с изменением метаболизма  $\alpha$ -глицерофосфата, вследствие изменения ред.-окс. состояния Ко Q (40). Видимо, значительное окисление Ко Q ведет к нарушениям митохондриальных мембран и митохондриальной АТФ-азы, которые генетически детерминируются.

#### Литература

1. Кобляков В.А., Рябых Т. П. 1977. *Вопр. онкологии*, 23, 1, 70.
2. Литошенко А.Я. 1982. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, 94, 12, 49.
3. Новикова Н.М., Бондаренко Ю.В. 1975. В кн.: *Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития*. . Киев, "Наукова думка", 148.
4. Albring M., Griffith., Attardi G. 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 74, 1348.
5. Attardi G. 1981. *Trends Biochem. Sci.*, 6, 86-89, 100-103.
6. Avers C.J., Billheimer F.E., Hoffman H., Pauli R.M. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 61, 90.
7. Barathz Z., Kuntzel. H. 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 69, 1371
8. Bastos R.N. 1975. *J. Biol. Chem.*, 250, 7739.
9. Belcour L., Begel O. 1978. *Mol. and Gen. Genet.*, 163, 2, 113.
10. Bernardi G. 1979. *Trends Biochem. Sci.*, 4, 197.
11. Bertrand H., Collins R.A., Stohl L.L., Goewert R.R., Lambowitz A.M. 1980. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* , 77, 10, 6032.
12. Blanc H., Dujon B. 1980. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 77, 7, 3942.
13. Boxer G.E., Devlin T.M. 1961. *Science*, 134, 1495.
14. Bucher Th. 1965. *Biochem. Soc. Symp.*, 25, i5.
15. Cooper S., Helmstetter C.H. 1968. *J. Mol. Biol.*, 31, 519.
16. Cozzone A.J. 1980. *Biochimie*, 62, 647.
17. Cummings D.J., Belcour L., Grandchamp C. 1979. *Mol. and Gen. Genet.* 171, 3, 239.

18. Dawkins M.J.R. 1966. *Brit. Med. Bull.*, 22, 27.
19. Dawkins M.J.R. 1959. *Proc. Roy. Soc.*, 150, 284.
20. Edwards D.L., Unger B.W. 1978. *FEBS Lett.*, 85, i, 40.
21. Goldberg B., Green H. 1964. *J. Cell Biol.*, 22, 1, 227.
22. Gozalvez M., Dias-Gil J., Coloma J., Salganicoff L. 1977. *Br. J. Cancer*, 36, 2, 243.
23. Gozalvez M. 1983. *Life Sci.*, 32, 8, 809.
24. Grant R. 1960. *Develop. Biol.*, 2, 197.
25. Gray E.D., Weissman S.M., Richards J., Bell D., Keir H.M., Smellie R.M.S., Davidson J.N., 1960. *Biochim et biophys Acta.*, 45, 1.
26. Grimes G.W., Mahler H.R., Perlman P.S. 1974. *J. Cell Biol.*, 61, 565.
27. Grobstein C. 1955. Tissue disaggregation in relation to determination and stability of cell type. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 60, 1095-1107.
28. Hall R.M., Mattick J.S., Marzuki S., Linnane A.W. 1975. *Molec. Biol. Repots*, 2, 101.
29. Henry M.F., Vignais P.M. 1979. *FEBS Lett.*, 100, 1, 41.
30. Herrlich P., Ponta H., Richter D., Pfennig-Yeh M., Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M. 1977. *Mol. and Cell. Biochem.*, 14, 1-3, 143.
31. Hershko A., Mamont P., Shields R., Tomkins G.M. 1971. *Nature. New Biol.*, 232, 3, 206.
32. Jonson L.R., Jonson L.W., Stresler B.L. 1975. *J. molec. cell. Cardiol.*, 7, 128.
33. Kinnula V.L., Hassinen I. 1977. *Acta physiol. scand.*, 99, 4, 462.
34. Kit S., Minekawa Y. 1972. *Cancer Res.*, 32, 2277.
35. Kitano Y.M.D., Hu F.M.D., 1970. *J. Invest. Dermatol.*, 55, 6, 444.
36. Lambowitz A.M., Slayman C.W. 1971. *J. Bacteriol.*, 108, 1087.
37. Lambowitz A.M., Smith E.W., Slayman C.W. 1972a. *J. Biol. Chem.*, 247, 15, 4850; 1972b. *J. Biol. Chem.*, 247, 15, 4859.
38. La Polla R. J., Lambowitz A.M. 1977. *J. Mol. Biol.*, 116, 2, 189.
39. La Polla R.J., Lambowitz A.M. 1982. *J. Cell Biol.*, 95, 1, 267.
40. Leenders H.J., Berendes H.D., Helmsing P.J., Derksen J., Koninkx J.F.J.G. 1974. *Sub-Cell. Biochem.*, 3, 2, 119.
41. Liverini G., Martino G., Barletta A., Di Meo S., De Leo T. 1976. *Ital. J. Biochem.*, 25, 3, 236.

42. LucO.J.L. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 49, 233.
43. Nagley P., Sriprakash K.S., Linnane A.W. 1977. In: Advances in microbial physiology (eds by Rose A.H. and Tempest D.W.), London, N.Y., San Francisco, "Acad. Press", 16, 157.
44. Nass M.M.K., Nass S. 1963. J. Cell Biol., 19, 539.
45. Nass M.M.K. 1969a. Science, 165, 25; 1969b. J. Mol. Biol., 42, 52i.
46. Niinikooski J. 1969. Acta physiol. scand., Suppl 334, 41.
47. Ontko J.A. 1966. Life Sci., 5, 817.
48. Mintz H.A., Yawn D.H., Safer B., Bresnick E., Liebelt A.C., Blailock Z.R., Rabin E.R., Schwartz A. 1967. J. Cell Biol., 34, 513.
49. Parsa I., Marsh W.H., Fitzgerald P.J. 1970. Amer. J. Pathol., 59, 1, 1.
50. Pedersen P.L. 1972. Gann Monograph on Cancer Research, 13, 251,
51. Peters N., Wilkie H. 1972. Experientia, 28, 3, 315.
52. Potter D.A., Fostel J.M., Berninger M., Pardue M.L., Cech T.R. 1980. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 7, 4118.
53. Ross M.H., Ely J.O. 1954. J. Franklin Inst., 258, 63.
54. Rueckert R.R., Mueller G.C., 1960. Cancer Res., 20, II, 1584.
55. Samson F.E., Balfour W.M., Jacobs R.J. 1960. Amer. J. Physiol., 199, 693.
56. Scornik O.A., 1984. Fed. Proc., 43, 5, 1283.
57. Shearman C.W., Kalf G.F. 1975. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 63, 712.
58. Shearman C.W., Kalf G.F. 1977. Arch. Biochem. and Biophys., 182, 573.
59. Silverman R.H., Atherly A.G., 1979. Microbiol. Rev., 43, 1, 27.
60. Slayman C.W., Rees D.C., Orchard P.P., Slayman C.L. 1975. J. Biol. Chem., 250, 2, 396.
61. Stocco D.M., Hutson J.C. 1978. J. Gerontol., 33, 6, 802.
62. Stockdale F.E., Holtzer H. 1961. Exp. Cell Res., 24, 508-520.
63. Storrie B., Attardi G. 1972. J. Mol. Biol., 71, 177.
64. Subik J., Takacsova G., Kovac L. 1978. Mol. and Gen. Genet., 166, 1, 103.
65. Vaughan P.R., Loewe H., Nagley P. 1979. Mol. and Gen. Genet., 172, 259.
66. Vergonet G., Hommes F.A., Molenaar I. 1970. Biol. Neonate, 16, 297.

67. Vesco C, Basilico C 1971. *Nature*, 229, 336.
68. Vossen J.G.H.M., Leenders H.J., Derksen J., Jeucken G. 1977. *Exp. Cell Res.*, 109, 277.
69. Vossen J.G.H.M., Leenders H.J., Knoppien W.G. 1983. *Insect Biochem.*, 13 (4), 349.
70. Williamson D.H., Marouds N.G., Wilkie D. 1971. *Mol. and Gen. Genet.*, 111, 209.
71. Wilson J.T., Spelsberg T.C. 1976. *Biochem. J.*, 154, 433.