

Intramitochondriale Deoxyribonukleinsäure in Säugetierzellen

Von

G. Schatz, E. Haslbrunner und H. Tuppy

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Mai 1964)

Hochgereinigte Mitochondrien aus Rattenleber, Rattenniere und Rinderherz enthalten 0,17—0,57 μg Deoxyribonukleinsäure pro mg Mitochondrienprotein. Diese DNA-Menge ist weder auf Verunreinigung der Mitochondrienfraktionen mit Zellkernen noch auf Adsorptions-artefakte zurückzuführen. Die Mitochondrienfraktionen wurden durch differentielles Zentrifugieren und nachfolgende Flotation in einem mit Hilfe des Röntgenkontrastmittels „Urografin“ hergestellten Dichtegradienten gereinigt. Deoxyribonukleinsäure ist als eine universelle Komponente von Mitochondrien anzusehen, die von genetischer Bedeutung sein dürfte.

Highly purified mitochondria from liver and kidney of the rat as well as from bovine heart have been found to contain from 0.17 to 0.57 μg deoxyribonucleic acid per mg mitochondrial protein. This amount of DNA is attributable neither to contamination of the mitochondrial fractions by nuclei nor to adsorption artefacts. Purification of the mitochondria was achieved by differential centrifugation and subsequent flotation in a density gradient of „Urografin“, an X-ray contrasting agent. It is suggested that deoxyribonucleic acid is a universal component of genetical importance in all mitochondria.

In einer vorausgegangenen Mitteilung¹ berichteten wir über den Nachweis geringer, jedoch signifikanter Mengen von DNA* in Hefe-

* Verwendete Abkürzungen: DNA, Deoxyribonukleinsäure; DNAase, Deoxyribonuklease; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan; EDTA, Äthylendiaminotetraessigsäure.

¹ G. Schatz, E. Haslbrunner und H. Tuppy, Biochem. Biophys. Res. Comm. **15**, 127 (1964).

mitochondrien, die durch Flotation in einem Dichtegradienten gereinigt worden waren. Die gefundenen Mengen an DNA übertrafen bei weitem jene, die sich aus dem Polydeoxyribonukleotidgehalt des Cytochroms b_2 der Hefemitochondrien² errechnen lassen. Auf Grund dieser Befunde äußerten wir die Vermutung, daß mitochondriale DNA an der extrachromosomalen genetischen Steuerung von Struktur und Funktion der Hefemitochondrien beteiligt sein könnte¹.

Hinsichtlich der Morphologie und des Enzymgehaltes entsprechen zwar Mitochondrien aerober Bäckerhefe weitgehend den Mitochondrien aus Säugetiergeweben; im Gegensatz zu Säugetiermitochondrien können sie jedoch durch Mutation³ oder durch Variation der bei der Zellzüchtung gewählten Bedingungen^{4, 5} tiefgreifend verändert werden. Es erschien deshalb von Interesse zu untersuchen, ob die Existenz mitochondrialer DNA auf Hefezellen beschränkt ist oder ob es sich um eine allgemeinere Erscheinung handelt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß hochgereinigte Mitochondrienfraktionen aus Leber und Niere der Ratte sowie aus Rinderherz ebenfalls geringe, jedoch signifikante und reproduzierbare DNA-Mengen enthalten. DNA scheint ein universeller und essentieller Bestandteil von Mitochondrien zu sein.

Material und Methoden

Die rohen Mitochondrienfraktionen aus Leber und Niere der Ratte wurden nach der von *Weinbach* angegebenen Vorschrift⁶, die Rinderherzmitochondrien nach *Crane et al.*⁷ isoliert. Alle Mitochondrienfraktionen wurden 2mal mit einer eiskalten Lösung, die 0,25 *m* D-Mannit, 20 *mm* Trispuffer (pH 7,4) sowie 1 *mm* EDTA enthielt, gewaschen. Die anschließende Reinigung erfolgte durch Flotation in einem Dichtegradienten aus „Urografin“¹ (einstündiges Zentrifugieren bei 25000 UpM im SW 25-Rotor der Spinco Modell L Ultrazentrifuge). Die Verteilung von DNA im Gradienten wurde sodann mit jener von einigen Mitochondrien-enzymen und von Protein verglichen. Die Unterteilung des Gradienten in Fraktionen verschiedener Dichte, die neuerliche Zentrifugierung einzelner Partikelfraktionen, die Behandlung der gereinigten Mitochondrien mit DNAase und die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten, von DNA und Protein waren gleich wie in vorausgegangenen Untersuchungen^{1, 8}; die Aktivität von Succinat—Phenazinmethosulfat-Oxido-

² *C. A. Appleby* und *R. K. Morton*, *Biochem. J.* **75**, 258 (1960).

³ *B. Ephrussi* und *H. Hottingner*, *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.* **16**, 75 (1951).

⁴ *B. Ephrussi*, *P. P. Slonimski*, *Y. Yotsuanagi* und *J. Tavlitzi*, *C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.* **26**, 87 (1956).

⁵ *G. Schatz*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 448 (1963).

⁶ *E. C. Weinbach*, *Anal. Biochem.* **2**, 335 (1961).

⁷ *F. L. Crane*, *J. L. Glenn* und *D. E. Green*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **22**, 475 (1956).

⁸ *G. Schatz* und *J. Klíma*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **81**, 448 (1964).

reduktase wurde jedoch stets in Gegenwart von 0,5% Triton X-100 gemessen. Pankreas-DNAase stammte von der Fa. Fluka (Schweiz), DNA von der Fa. Light (England).

Ergebnisse

Als Reinigungsmethode für die hier untersuchten Säugetiermitochondrien wählten wir die Flotation in einem aus dem Röntgenkontrastmittel „Urografin“ hergestellten Dichtegradienten. Dieses Verfahren hatte sich in früheren Untersuchungen über Hefemitochondrien¹ als besonders wirksam erwiesen, um spezifisch schwere Zellkerntrümmer, die die rohen Mitochondrienfraktionen verunreinigten, von den spezifisch leichteren Mitochondrien abzutrennen. Nach beendeter Flotation ging bei allen hier untersuchten Mitochondrienfraktionen die Verteilung von DNA im Dichtegradienten der Verteilung typischer Mitochondrienenzyme, wie Succinat—Phenazinmethosulfat-Oxidoreduktase, Succinat—Cytochrom-c-Oxidoreduktase, Cytochrom-c—O₂-Oxidoreduktase sowie des NADH—O₂-Oxidoreduktasesystems parallel (Abb. 1 bis 3). Dies weist darauf hin, daß die in der flotierten Mitochondrienbande nachweisbare DNA nicht von verunreinigendem Kernmaterial stammt, sondern in den Mitochondrien selbst lokalisiert ist. Nicht-mitochondriale, DNA-reiche Partikel mit relativ hohem spezifischen Gewicht (> 1,20 g/ml), die offenbar aus Kernmaterial bestanden, wurden bei der Flotation im Dichte-

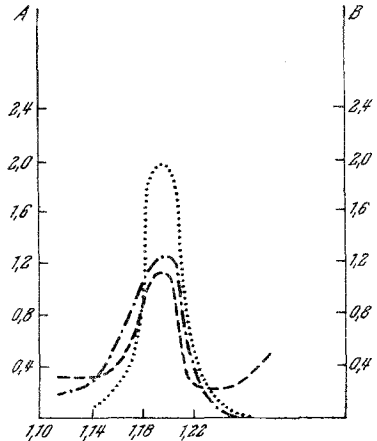


Abb. 1. Verteilung von DNA (-----), Protein (.....) und Succinat—Phenazinmethosulfat-Oxidoreduktase (---) nach Flotation einer rohen Mitochondrienfraktion aus Rattenleber in einem „Urografin“-Dichtegradienten

Ordinate A: mg Protein/ml Fraktion und ΔE_{540} pro Min. pro 0,2 ml Fraktion.
Ordinate B: $\mu\text{g DNA/ml Fraktion}$
Abzisse: Dichte des Gradienten in g/ml

Tabelle 1. Deoxyribonukleinsäuregehalt gereinigter Mitochondrien aus verschiedenen Säugetiergeweben

Herkunft der Mitochondrien		$\mu\text{g DNA/mg Mitochondrienprotein}$
Rattenleber	Experiment 1	0,57
	Experiment 2	0,35
	Experiment 3	0,45
		Mittel: 0,46
Rinderherz	Experiment 1	0,32
	Experiment 2	0,17
	Experiment 3	0,23
		Mittel: 0,24
Rattenniere		0,17

gradienten von den Mitochondrien abgetrennt (Abb. 1 und 2). Die ermittelten DNA-Werte für eine bestimmte Mitochondrientype zeigten von Experiment zu Experiment nur relativ geringe Schwankungen. Auch die in verschiedenen Mitochondrientypen gemessenen DNA-Werte unterschieden sich voneinander nur geringfügig (Tab. 1).

Das Ergebnis der folgenden Experimente macht es sehr unwahrscheinlich, daß im Verlaufe der Zellhomogenisierung eine Adsorption von DNA

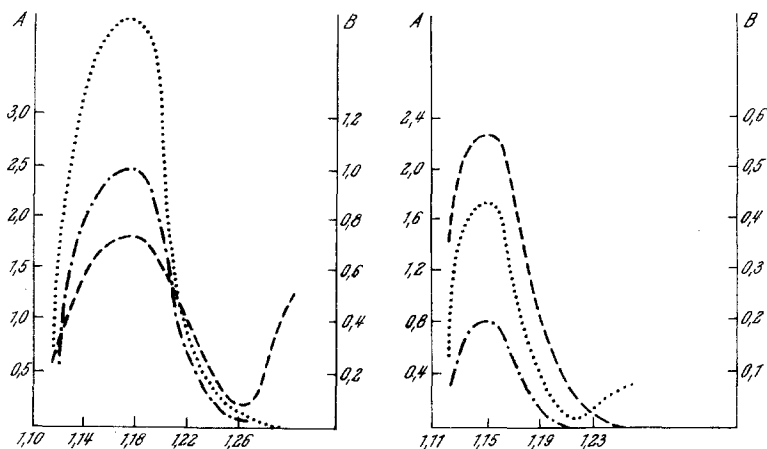


Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 2. Verteilung von DNA (-----), Protein (.....) und Succinat—Phenazinmethosulfat-Oxidoreduktase (-.-.-.-) nach Flotation einer rohen Mitochondrienfraktion aus Ratteniere in einem „Urografin“-Dichtegradienten

Ordinate A: mg Protein/ml Fraktion und ΔE_{540} pro Min. pro 0,2 ml Fraktion

Ordinate B: μg DNA/ml Fraktion

Abszisse: Dichte des Gradienten in g/ml

Abb. 3. Verteilung von DNA (-----), Protein (.....) und Succinat—Phenazinmethosulfat-Oxidoreduktase (-.-.-.-) nach Flotation einer rohen Mitochondrienfraktion aus Rinderherz in einem „Urografin“-Dichtegradienten

Ordinate A: mg Protein/ml Fraktion und ΔE_{540} pro Min. pro 0,2 ml Fraktion

Ordinate B: μg DNA/ml Fraktion

Abszisse: Dichte des Gradienten in g/ml

an die Mitochondrien erfolgt ist: Ein Teil einer Suspension von Rattenlebermitochondrien in Homogenisationsmedium wurde mit reiner DNA versetzt (Endkonzentration $10 \mu\text{g}$ DNA/ml entsprechend ca. $20 \mu\text{g}$ DNA/mg Mitochondrienprotein), während der zweite Teil als Kontrolle diente. Beide Aliquote wurden 10 Min. bei 0° gehalten, worauf die Mitochondrien abzentrifugiert und 4mal mit Homogenisationsmedium durch Zentrifugieren gewaschen wurden. Schließlich wurde in den beiden Mitochondriensedimenten der Gehalt an DNA ermittelt, wobei sich kein signifikanter Unterschied ergab (Kontrolle: $0,35 \mu\text{g}$ DNA/mg Mitochondrienprotein; mit DNA vorinkubierte Mitochondrien: $0,38 \mu\text{g}$ DNA/mg Mitochondrienprotein).

Eine Behandlung gereinigter Rinderherzmitochondrien mit DNAase baute 55 bis 64% der mitochondrialen DNA zu einem mit 0,5 *n*-Perchlorsäure nicht mehr fällbaren Produkt ab. In diesen Versuchen erwies es sich auch, daß die Wirksamkeit der Enzymbehandlung stark vom Dispersionsgrad der Mitochondriensuspension abhängig war. Der unvollständige Abbau der mitochondrialen DNA ist also offenbar durch teilweise Unzugänglichkeit für das von außen zugefügte Enzym bedingt.

Diskussion

Über den DNA-Gehalt von Mitochondrienfraktionen, die durch differentielles Zentrifugieren isoliert worden sind, liegen bereits mehrere Berichte anderer Autoren vor (eine Übersicht findet sich in der Arbeit von Nass und Nass⁹). Die in verschiedenen Untersuchungen für Mitochondrien des gleichen Gewebes ermittelten DNA-Werte unterschieden sich jedoch beträchtlich voneinander und wurden stets als Maß für die Verunreinigung durch Zellkerne angesehen.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, lassen sich jedoch auch in hochgereinigten Säugetiermitochondrien, die durch differentielles Zentrifugieren und nachfolgende Flotation in einem mit Hilfe von „Urografin“ hergestellten Dichtegradienten erhalten worden waren, signifikante und reproduzierbare, wenn auch geringe Mengen von DNA nachweisen. DNA wurde — ebenso wie in den vorausgegangenen Untersuchungen über Hefemitochondrien¹ — durch ihren Gehalt an Deoxyribose, durch die Fällbarkeit mit Säure sowie durch Abbau mit DNAase identifiziert. Es ist nicht wahrscheinlich, daß die in den gereinigten Mitochondrienfraktionen nachweisbare DNA eine adsorbierte Verunreinigung darstellt, da Kontrollexperimente zeigten, daß isolierte Rattenlebermitochondrien DNA, die dem Suspensionsmedium zugefügt wurde, nicht nennenswert adsorbierten.

Die hier untersuchten, aus drei verschiedenen Säugetiergeweben stammenden Mitochondrien enthalten ähnliche DNA-Mengen (0,17 bis 0,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Mitochondrienprotein), die jedoch um fast eine Größenordnung niedriger sind als die früher¹ in Hefemitochondrien beobachteten (1—4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Mitochondrienprotein). Nach den bisher vorliegenden Werten enthalten Mitochondrien verschiedener Herkunft demnach zwischen 0,17 und 4 μg DNA je mg Mitochondrienprotein. Es ist bemerkenswert, daß der DNA-Gehalt von Chloroplasten, die aus verschiedenen Pflanzenzellen isoliert worden sind, sich innerhalb der gleichen Grenzen bewegt (0,16 bis ca. 4 μg DNA/mg Chloroplastenprotein^{10, 11}).

⁹ S. Nass und M. M. K. Nass, J. Cell Biol. **19**, 613 (1963).

¹⁰ A. Gibor und M. Izawa, Proc. Natl. Acad. Sci. **50**, 1164 (1963).

¹¹ J. Biggins und R. B. Park, Bio-organic. Chem. Quart. Rep. UCRL-9900 (1962).

Die hier beschriebenen analytischen Ergebnisse über DNA in isolierten und gereinigten Mitochondrienfraktionen werden durch histologische Beobachtungen anderer Autoren gestützt: Autoradiographische und cytochemische Befunde von *Chèvremont*¹² deuten darauf hin, daß Mitochondrien unter extremen Bedingungen DNA akkumulieren. In letzter Zeit konnten *Nass* und *Nass* mit Hilfe des Elektronenmikroskops DNA-ähnliche Fäden in der Matrix von Mitochondrien aus Hühnerembryonen identifizieren⁹. In einer ihrer Arbeiten bei der Korrektur angefügten Addendum machten diese Autoren auch eine Angabe über die durch Waschen nicht entfernbare DNA-Menge in isolierten Rattenlebermitochondrien (0,4—0,6 µg DNA/mg Protein). Die untersuchten Mitochondrienfraktionen waren zwar offenbar lediglich durch differentielles Zentrifugieren gewonnen worden, doch stimmen die berichteten Werte mit den von uns ermittelten ausgezeichnet überein. Alle diese Beobachtungen erhärten die Annahme, daß es sich bei der in gereinigten Mitochondrien nachweisbaren DNA nicht um eine adsorbierte Verunreinigung handelt. Der Nachweis von DNA in Mitochondrien so verschiedenartiger Zellen wie Bäckerhefe, Rattenleber, Rattenniere und Rinderherz berechtigt zu dem Schluß, daß DNA ein allgemeiner und offenbar essentieller Bestandteil von Mitochondrien ist. Die Funktion dieser mitochondrialen DNA ist gegenwärtig noch unbekannt, doch ist anzunehmen, daß sie an der genetischen Kontrolle einer oder mehrerer Eiweißkomponenten des Mitochondrions beteiligt ist. Ein Rinderherzmitochondrion enthält $1,11 \times 10^{-13}$ g Protein¹³. Aus diesem Wert und aus Tab. 1 ergibt sich für ein Rinderherzmitochondrion ein Gehalt von $2,6 \times 10^{-17}$ g DNA, entsprechend 5×10^4 Nukleotiden. Legt man der Berechnung einen Triplett-Code und darüber hinaus die Annahme zugrunde, daß nur die Hälfte der vorhandenen DNA genetische Information repräsentiert, so folgt daraus, daß die in einem Rinderherzmitochondrion vorliegende DNA die Sequenz von ca. 10^4 Aminosäuren, somit ungefähr 70 Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 17000 determinieren könnte.

Die vorliegende Arbeit wurde durch den U. S. Public Health Service (Grant GM 11225—01) unterstützt. Wir danken Herrn Dr. *Klose* (Fa. Schering, Wien) für die freundliche Überlassung wertvoller Mengen von „Urografin“.

¹² *M. Chèvremont*, *Biochem. J.* **85**, 25 P (1962).

¹³ *D. E. Green* und *T. Oda*, *J. Biochem.* [Tokyo] **49**, 742 (1961).