

В. А. ЧУГУНОВ, Г. Н. ЗАЙЦЕВА

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О ДНК-ПОДОБНЫХ РНК  
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ЖГУТИКОВОГО ПРОСТЕЙШЕГО —  
STRIGOMONAS ONCOPELTI (СЕМ. TRIPANOSOMIDAE)

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 23 IX 1969)

В отличие от бактерий у эукариотов синтез РНК происходит в ядре, а основной массы белков — в цитоплазме. Следовательно, в этих клетках должен осуществляться транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Поскольку синтез белка происходит в полисомах, ассоциированных с мембранами клетки, естественно, что мРНК, образованные в ядре, должны обнаруживаться во фракции микросом.

Ранее <sup>(1)</sup> было показано, что состав оснований ДНК кинетопласта *S. oncopelti* отличается от нуклеотидного состава ДНК ядра. В связи с этим встает вопрос о том, синтезируются ли мРНК автономно в различных органеллах клетки, в частности в кинетопластах, или же их синтез происходит преимущественно в ядре.

В данной работе мы попытались установить наличие полисом, а следовательно, и мРНК, во фракции микросом, в ядрах и кинетопластах лентомонадной формы *S. oncopelti*. Кроме того, был исследован нуклеотидный состав быстромеченных РНК перечисленных структур клетки и проведено его сравнение с составом оснований ДНК ядра и кинетопласта.

Условия выращивания культуры даны в <sup>(2)</sup>. Ядра и кинетопласты из клеток выделяли при использовании дифференциального центрифугирования с дальнейшей очисткой структур в линейном градиенте концентрации сахарозы <sup>(2)</sup>. Фракцию микросом получали центрифугированием гомогената клеток в течение 45 мин. в интервале от 11 000 до 40 000 *g*. Способ выделения рибосом из микросом и ядер, а также условия их разделения в градиенте концентрации сахарозы даны в <sup>(3)</sup>. Для обнаружения полирибосом в кинетопластах использовали <sup>14</sup>C-аденин (1  $\mu$ C/мл, у.а. 53  $\mu$ C/мг). Для выделения рибосом фракцию кинетопластов обрабатывали смесью тритона X-100 (1%) и дезоксихолата Na (0,5%). Нерастворимую часть кинетопластов отделяли центрифугированием (18 000 *g*, 10 мин.) и отбрасывали. Суспензию меченных по <sup>14</sup>C-аденину рибосом из кинетопластов наслаивали на линейный градиент (от 15 до 34%) сахарозы.

Кроме того, мы изучали гетерогенность суммарных РНК различных структур клеток, меченных по <sup>14</sup>C-урацилу или <sup>14</sup>C-аденину. Для включения <sup>14</sup>C-урацила в РНК ядер и микросом клетки *S. oncopelti* (6 г сырой массы в 100 мл среды) преинкубировали 30 мин. при 25° с аэрацией в «бедной» среде <sup>(4)</sup>, после чего прибавляли <sup>14</sup>C-урацил (1  $\mu$ C/мл, у.а. 45  $\mu$ C/мг) и проводили включение в течение 1 часа. Из полученных ядер и микросом выделяли <sup>14</sup>C-РНК детергентно-фенольным методом <sup>(5)</sup> в присутствии бентонита (2,5 мг/мл). Включение <sup>14</sup>C-аденина во внутриклеточные кинетопласты проводили, как описано выше. Для изучения седиментационных свойств РНК к фракции кинетопластов добавляли 1% додецилсульфата натрия и полученный лизат наслаивали на линейный градиент (5—20%) сахарозы <sup>(6)</sup>. Радиоактивность фракций <sup>14</sup>C-РНК измеряли на газопроточном счетчике «Telefunken» с эффективностью 30%.

Нуклеотидный состав быстромеченных РНК определяли по соотноше-



нию радиоактивности отдельных рибонуклеотидов. Для этого к суспензии преинкубированных клеток (6 г на 100 мл) в среде (7) добавляли  $P^{32}$  в количестве 2,6  $\mu\text{C}/\text{мл}$  для РНК ядер и микросом и 7,5  $\mu\text{C}/\text{мл}$  для РНК кинетопластов. Включение радиоактивного ортофосфата проводили в течение 30 и 60 мин. при 25° и аэрации. Из тщательно отмытых от изотопа клеток выделяли микросомы, ядра и кинетопласты. Для определения нуклеотидного состава быстромеченных РНК проводили обработку перечисленных структур по методу (8).  $P^{32}$ -нуклеотиды РНК разделяли на колонке Дауэкс  $1 \times 10$  с использованием линейного градиента (0—5 N) муравьиной кислоты (9). После измерения оптической плотности при 260 м $\mu$  фракции  $P^{32}$ -нуклеотидов объединяли и просчитывали их радиоактивность на счетчике СИ-2Б (эффективность 10%).

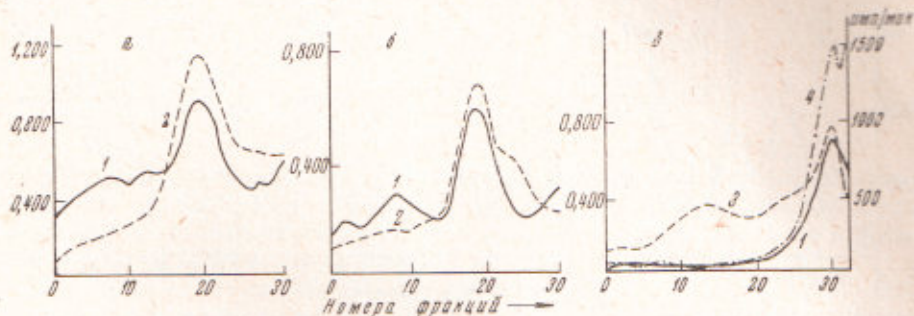


Рис. 1. Разделение рибосом из микросом (а), ядер (б) и кинетопластов (в) *S. oncospelti*; для разделения рибосом из микросом и ядер использовали линейный градиент концентрации от 10 до 30% сахарозы в буфере: 0,015 M трис-НСl pH 7,4,  $MgCl_2$  0,01 M, KCl 0,01 M и поливинилсульфат 10  $\mu\text{г}/\text{мл}$ . Для разделения рибосом кинетопластов использовали градиент концентрации от 15 до 34% сахарозы в буфере: 0,05 M трис-НСl pH 7,4,  $MgCl_2$  0,005 M, KCl 0,025 M. Рибосомы (5 опт. ед. при 260 м $\mu$ ) наслаивали на 4,8 мл градиента. Центрифугирование проводили в бакет-ротаторе SW-39 (Superspeed-50) при 39 000 об/мин при температуре 2°. Время разделения рибосом из ядра и микросом 90 мин., рибосом из кинетопластов 60 мин. 1 — оптическая плотность при 260 м $\mu$ ; 2 — оптическая плотность после обработки рибонуклеазой (5  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , 37°, 15 мин.); 3 — радиоактивность; 4 — радиоактивность после обработки рибосом рибонуклеазой (5  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , 15 мин., 37°)

На рис. 1 видно, что во всех изучаемых структурах, кроме мономеров, содержатся полирибосомы, особенно богато представленные во фракции микросом. В кинетопластах полисомы могли быть обнаружены лишь по седиментационному профилю быстроосаждаемого радиоактивного материала. Для доказательства того, что тяжелые компоненты рибосом являются полирибосомами, мы параллельно с основным опытом проводили обработку рибосомного материала рибонуклеазой. При этом наблюдали заметное увеличение количества мономеров и соответствующее исчезновение полирибосом (см. рис. 1).

Наличие полирибосом в ядре и кинетопласте подтверждалось также электронной микроскопией срезов целой клетки *S. oncospelti*, (И. А. Манукян, ЦИЭМ).

Полученные нами результаты согласуются с данными о нахождении полирибосом в ядре печени крыс (10) и в митохондриях *Neurospora crassa* (11).

Далее мы изучали с применением радиоактивных предшественников ( $C^{14}$ -урацила и  $C^{14}$ -аденина) возможную гетерогенность РНК в ядре, кинетопласте и микросомах клетки *S. oncospelti*. Для установления гетерогенности РНК из меченых клеток получали структуры с последующим выделением из них суммарной РНК. Радиоактивные РНК подвергали седиментационному анализу в линейном градиенте концентрации сахарозы (рис. 2). Профиль по у-ф. поглощению при 260 м $\mu$  показывает, что суммарный препарат РНК микросом, ядра и кинетопласта состоит в основном из двух



типов рРНК и некоторого количества низкомолекулярной фракции (сРНК и, возможно, продуктов деградации рРНК). Ранее (3) было показано, что основную часть РНК цитоплазмы и ядра *S. oncopelti* составляют рРНК (26 и 17 S). Из наших предварительных данных следует, что кинетоласт содержит рРНК (23 и 16 S), отличную от рРНК цитоплазмы и ядра.

При относительно коротком времени инкубации клеток с радиоактивным предшественником (60 мин.) в бедной среде, в которой синтез рРНК замедлен, происходит преимущественное включение  $C^{14}$ -урацила и  $C^{14}$ -аденина в быстрообменивающиеся фракции РНК структур. Из радиоактивного профиля видно, что быстромеченная РНК микросом, ядра и кинетоласта довольно гетерогенна (рис. 2). При этом радиоактивность РНК

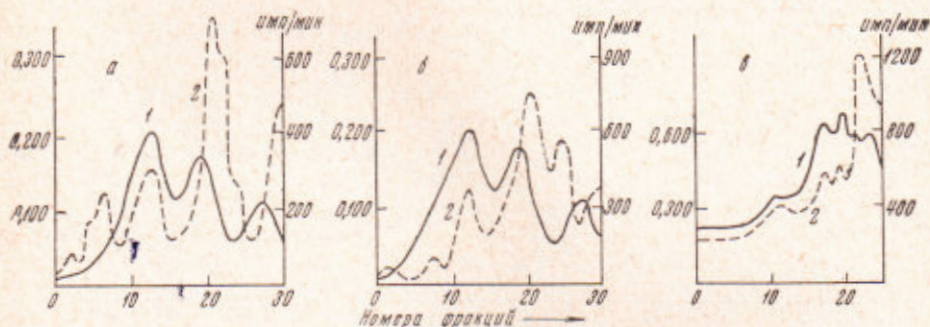


Рис. 2. Разделение РНК из микросом (а), ядер (б) и кинетоластов (в) *S. oncopelti*. Для разделения РНК из микросом и ядер (меченные 1 час по  $C^{14}$ -урацилу) использовали линейный градиент концентрации от 5 до 20% сахарозы в 0,02 M К-ацетатном буфере pH 5,1, содержащем 0,05 M NaCl. Растворы сахарозы обрабатывали бентонитом. Центрифугирование РНК (2 опт. ед. при 260 мμ) проводили на ультрацентрифуге Spinco L-2 в роторе SW-39 при 3900 об/мин 5 час. при 2°. 5 опт. ед. РНК кинетоластов (меченной по  $C^{14}$ -аденину) разделяли в градиенте концентрации от 5 до 20% сахарозы в 0,0125 M трис-HCl-буфере pH 7,5, содержащем Na-додецилсульфат 0,2% и 0,5 M NaCl. Бакет-ротор SW-39,  $v = 4,8$  мл, 39 000 об/мин. Центрифугирование 3 часа при 10°. После измерения у-ф. профиля при 260 мμ к полученным фракциям добавляли 500 мкг/мл дрожжевой РНК (в качестве носителя) и ТХУ до конечной концентрации 5%. Осадки  $C^{14}$ -РНК наносили на миллиметровые фильтры № 4, промывали 5% ТХУ и считывали. 1 — поглощение при 260 мμ, 2 — радиоактивность

заметно смещена в сравнительно низкомолекулярную зону, следующую за рРНК. Это может указывать на преимущественное включение метки в быстро синтезирующиеся РНК внутриклеточных структур. Не исключено, что эти быстромеченные РНК, являющиеся, по-видимому, информационными и предшественниками рРНК, частично деградированы. (Появление вновь синтезированной РНК митохондрий дрожжей в низкомолекулярной области при градиентном центрифугировании наблюдали и другие авторы (12, 13).)

Следует отметить, что помимо этих низкомолекулярных РНК в микросомах, ядрах и кинетоластах *S. oncopelti* присутствуют более тяжелые фракции быстромеченных РНК.

Таким образом, опыты по кратковременному включению радиоактивных предшественников во внутриклеточные РНК с последующим анализом их седиментационных свойств и радиоактивности выявили наличие в ядрах, микросомах и кинетоластах *S. oncopelti* нескольких типов РНК, среди которых присутствовали мРНК. Это подтверждает обнаружение полирибосом во всех перечисленных структурах клетки *S. oncopelti*.

Нуклеотидный состав метаболически активных РНК определяли по кинетике кратковременного включения радиоактивного ортофосфата в условиях подавленного синтеза рРНК. При этом было установлено, что быстрообменивающиеся РНК клеточных структур имеют ДНК-подобный



состав (Д-РНК) (табл. 1): нуклеотидный состав Д-РНК микросом и ядер довольно сходен с таковым ядерной ДНК. Это свидетельствует о том, что Д-РНК микросом синтезируется на ДНК ядра. Сходство нуклеотидного состава Д-РНК кинетопластов на «своей» ДНК дает возможность предполагать определенную автономность синтеза быстрообменивающихся

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК и Д-РНК микросом, ядер и кинетопластов клетки *S. oncosorelти* (мол.%)

	Г	Ц	А	У (Т)	$\frac{\Gamma + \Pi}{\Lambda + \Upsilon (\Gamma)}$
Д-РНК микросом	28	27	23	22	1,22
ДНК ядра	27,13	27,12	22,84	22,81	1,18
Д-РНК ядра	28	28	22	22	1,27
ДНК кинетопласта	21,16	21,12	28,88	28,84	0,73
Д-РНК кинетопласта	21	22	29	28	0,75

Д-РНК (в том числе информационных) в кинетопласте. Однако не исключено, что синтез Д-РНК кинетопластов осуществляется под некоторым контролем ядра. На это могут, по-видимому, указывать опыты по гибридизации ядерной ДНК с кинетопластной Д-РНК.

Приведенные нами данные по изучению ДНК-подобных РНК, выделенных из отдельных структур клетки, могут свидетельствовать об автономности синтеза этих РНК, а следовательно, и белоксинтезирующей системы в жизненно важных органеллах клетки, в частности в кинетопластах.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
27 IX 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., ДАН, 180, 967 (1968). <sup>2</sup> А. В. Ильин, А. В. Шульга и др., Биологические науки, № 9, 118 (1968). <sup>3</sup> Г. Н. Зайцева, В. А. Чугунов и др., Биохимия, 35, в. 2 (1970). <sup>4</sup> O. C. Wallis, J. Protozool., 13, 234 (1966). <sup>5</sup> E. K. Wagner, L. Katz, S. Penman, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 152 (1967). <sup>6</sup> L. D. Weller, A. Kaina, D. B. Johnstone, Biochim. et Biophys. Acta, 157, 558 (1968). <sup>7</sup> Ph. F. Malvey, J. Infect. Dis., 107, 155 (1960). <sup>8</sup> Б. Ф. Ванюшин, В сборн. Современные методы в биохимии, М., 1964, стр. 236. <sup>9</sup> R. V. Hurlbert, H. Schmitz, et al., J. Biol. Chem., 209, 23 (1954). <sup>10</sup> P. D. Sadowski, J. A. Howden, J. Cell. Biol., 37, 163 (1968). <sup>11</sup> H. Kuntzfel, H. Noll, Nature, 215, 1340 (1967). <sup>12</sup> E. Wintersberger, In: Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, 1966, p. 439. <sup>13</sup> Sh. Leon, H. R. Mahler, Arch. of Biochem. and Biophys., 126, 305 (1968).