

М. А. ДИУЕР, Б. Ф. ВАНЮШИН, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

ЩЕЛОЧЕСТАБИЛЬНЫЕ ДИНУКЛЕОТИДЫ
ИЗ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ РНК ПЕЧЕНИ СОМА
(SILURUS GLANIS L.)

Среди продуктов полного щелочного гидролиза самых различных РНК обнаруживается относительно небольшое количество щелочестабильных динуклеотидов (¹⁻⁴). Устойчивость этих динуклеотидов к щелочи обусловлена присутствием 2-О-метильной группы в рибозном остатке соседнего с 5'-конца нуклеотида. 2-О-метильные группы в РНК появляются

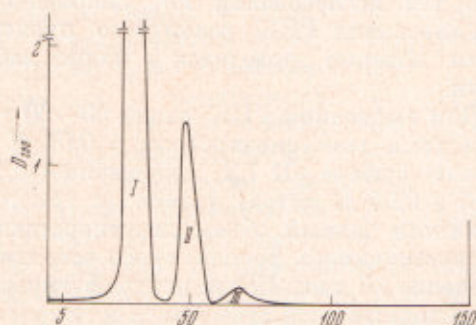


Рис. 1

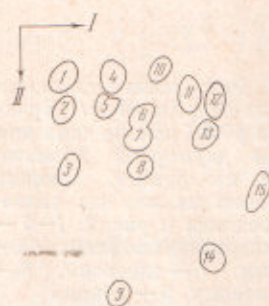


Рис. 2

Рис. 1. Разделение продуктов щелочного гидролиза высокомолекулярных РНК из печени сома с помощью хроматографии на ДЭАЭ-Сефадексе. На колонку (1 × 50 см) с Сефадексом А-25 (средний) в ацетатной форме нанесен гидролизат рРНК печени сома (30 500 ед. D_{260}). Элюцию нуклеотидного материала осуществляли линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,4 M) в 0,02 M ацетатном буфере pH 5,3 и 7 M мочевины. Общий объем элюента 1000 мл. Скорость элюции 0,5 мл/мин. Объем фракций 7 мл. Фракция I содержит мононуклеотиды (Np), фракция II — динуклеотиды (NmpNp), а фракция III — тринуклеотиды (NmpNmpNp) и нуклеозиддифосфаты (pNp)

Рис. 2. Разделение динуклеозидмонофосфатов (NmpN) из рРНК печени сома при помощи двумерной хроматографии на бумаге. Около 10 μ мол. смеси NmpN наносили на лист (50 × 56 см) хроматографической бумаги Ленинградская медленная, предварительно промытой 2 N CH_3COOH и водой и пропитанной сульфатом аммония (⁶). В направлении I NmpN разделяли в течение 48 час. в растворителе 96% этанол — вода (80 : 20); в направлении II NmpN разделяли в течение 24 час., пропуская смесь насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и изопропанола (80 : 2). I — GmpG, 2 — GmpC + CmpG, 3 — CmpC, 4 — GmpA, 5 — AmpG, 6 — GmpU, 7 — UmpG, 8 — CmpU, 9 — UmpC, 10 — AmpA, 11 — AmpC, 12 — CmpA, 13 — NmpN; содержащий G, 14 — AmpU + UmpA, 15 — UmpU

вследствие специфического ферментативного метилирования отдельных нуклеотидных остатков в готовых полинуклеотидных цепях в ходе «созревания» рРНК или рибосом (⁵⁻⁷). Специфичность такого метилирования РНК изучена еще слишком мало, а значение этой природной модификации РНК все еще остается загадкой. Известное представление о специфичности метилирования тех или иных РНК можно составить как по определению суммарного содержания 2-О-метилрибозы, так и, в особенности, по изучению природы и количественного содержания щелочестабильных ди-

и более длинных олигонуклеотидов. Содержание этих динуклеотидов с 2-О-метильной группой (NmpNp) в разных РНК может варьировать от 0,2 мол. % (рРНК *E. coli*) (8), до 2,6 мол. % (рРНК зародышей пшеницы) (9), а частота встречаемости отдельных NmpNp существенно отличается от хаотической. Таким образом, количество и характер распределения щелочестабильных олигонуклеотидов, и в частности динуклеотидов, может служить дополнительным способом охарактеризования рРНК из разных организмов и субклеточных структур. До сих пор природа и количество NmpNp изучены только у единичных рРНК (*E. coli* (8), фибробласты мыши (10), клетки HeLa (11), дрожжи (12) и зародыши пшеницы (9)), а рРНК рыб в этом отношении еще совсем не исследованы.

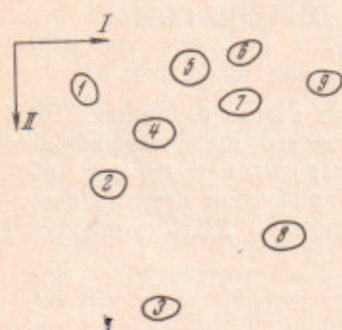


Рис. 3. Разделение олигонуклеотидов NmpNmpN (III фракция) из рРНК печени сома при помощи двумерной хроматографии на бумаге. Условия разделения те же, что указаны в подписи к рис. 2. 1—5 — тринуклеозиддифосфаты; 6 — гуанозин, 7 — аденозин, 8 — цитидин, 9 — уридин

Настоящая работа посвящена анализу содержания различных щелочестабильных динуклеотидов NmpNp в высокомолекулярной рРНК печени рыбы (сома) и является частью тех исследований по специфичности метилирования РНК различного происхождения, которые проводятся в нашей лаборатории.

Для выделения РНК около 50—60 г печени сома гомогенизировали в 0,01 M фосфатном буфере pH 7,2, содержащем 0,15 M NaCl и 0,05 M цитрат натрия; к гомогенату добавляли равный объем свежеперегнанного водонасыщенного фенола, смесь встряхивали в течение 30 мин. После центрифугирования смеси водный слой отсасывали и депротенизировали еще два раза, встряхивая с фенолом и один раз со смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). Все операции проводили на холоду (0—4°). РНК осаждали добавлением 3 объемов 96% этанола, затем осадок растворяли в воде, к раствору добавляли 4 M NaCl до конечной концентрации 1 M и инкубировали на холоду в течение 18 час. Выпавшую при этом высокомолекулярную РНК собирали центрифугированием, трижды промывали 70% этанолом, высушивали 96% этанолом, смесь спирт — эфир и эфиром. Получаемые таким образом препараты РНК представляют собой суммарную высокомолекулярную РНК рибосом, они принадлежат к ГЦ-типу (G 33,0, A 22,2, C 24,4 и U 23,4%) и по составу соответствуют рРНК многих позвоночных. Около 100 мг РНК печени сома гидролизovali 10 мл 1 N КОН при 37° в течение 24 час. Затем гидролизат охлаждали, нейтрализовали HClO₄ и после отделения KClO₄ центрифугированием разбавляли в 10 раз водой, доводили pH раствора аммиаком до 9,0 и наносили на колонку с ДЭАЭ-Сефадексом. Разделение моно-, ди- и тринуклеотидов производили путем элюции линейным градиентом концентрации NaCl в 7 M мочеvine при pH 5,0 (рис. 1). Полученные фракции ди- и тринуклеотидов обессоливали путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (13). Дальнейшее разделение различных олигонуклеотидов производили при помощи двумерной хроматографии на бумаге (9). Около 10 μмол, выделенных ди- или тринуклеотидов инкубировали 2 часа при 37° с 1 мг щелочной фосфатазы из кишечника теленка в 1 мл 0,05 M трис-HCl-буфера pH 9,0, содержащего 0,005 мол. ацетата магния. Инкубационную смесь депротенизировали хлороформом, наносили в виде небольшого пятна на лист бумаги и разделяли двумерной хроматографией (рис. 2 и 3). Компоненты отдельных пятен элюировали водой и идентифицировали с известными олигонуклеотидами (14) по у.-ф. спектрам при pH 1,0. Кроме того, для дополнительной идентификации и определения состава компонентов элюаты из одноимен-

ном и один раз со смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). Все операции проводили на холоду (0—4°). РНК осаждали добавлением 3 объемов 96% этанола, затем осадок растворяли в воде, к раствору добавляли 4 M NaCl до конечной концентрации 1 M и инкубировали на холоду в течение 18 час. Выпавшую при этом высокомолекулярную РНК собирали центрифугированием, трижды промывали 70% этанолом, высушивали 96% этанолом, смесь спирт — эфир и эфиром. Получаемые таким образом препараты РНК представляют собой суммарную высокомолекулярную РНК рибосом, они принадлежат к ГЦ-типу (G 33,0, A 22,2, C 24,4 и U 23,4%) и по составу соответствуют рРНК многих позвоночных. Около 100 мг РНК печени сома гидролизovali 10 мл 1 N КОН при 37° в течение 24 час. Затем гидролизат охлаждали, нейтрализовали HClO₄ и после отделения KClO₄ центрифугированием разбавляли в 10 раз водой, доводили pH раствора аммиаком до 9,0 и наносили на колонку с ДЭАЭ-Сефадексом. Разделение моно-, ди- и тринуклеотидов производили путем элюции линейным градиентом концентрации NaCl в 7 M мочеvine при pH 5,0 (рис. 1). Полученные фракции ди- и тринуклеотидов обессоливали путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (13). Дальнейшее разделение различных олигонуклеотидов производили при помощи двумерной хроматографии на бумаге (9). Около 10 μмол, выделенных ди- или тринуклеотидов инкубировали 2 часа при 37° с 1 мг щелочной фосфатазы из кишечника теленка в 1 мл 0,05 M трис-HCl-буфера pH 9,0, содержащего 0,005 мол. ацетата магния. Инкубационную смесь депротенизировали хлороформом, наносили в виде небольшого пятна на лист бумаги и разделяли двумерной хроматографией (рис. 2 и 3). Компоненты отдельных пятен элюировали водой и идентифицировали с известными олигонуклеотидами (14) по у.-ф. спектрам при pH 1,0. Кроме того, для дополнительной идентификации и определения состава компонентов элюаты из одноимен-

ных пятен с нескольких хроматограмм объединяли, обессоливали на угле⁽¹³⁾, рехроматографировали на бумаге в смеси изопропанол-НСI-вода (179:41:30) и гидролизovali при 100° в течение 60 мин. в 1 N HCl. Продукты такого гидролиза разделяли при помощи хроматографии на бумаге в присутствии кислотного гидролизата РНК (свидетели) и идентифицировали спектрофотометрически⁽¹⁴⁾. Количество отдельных динуклеотидов определяли спектрофотометрически^(14, 16).

После гидролиза РНК (1 N КОН, 37°) во фракции динуклеотидов наряду с щелочестабильными NmpNp могут присутствовать некоторые трудногидролизуемые обычные динуклеотиды NpNp⁽⁹⁾. Мы установили, что гидролиз (1 N КОН, 37°) всех фосфодиэфирных связей в рРНК сома, за исключением структур NmpNp, через 24 часа заканчивается практически полностью; при увеличении времени гидролиза до 48 час. заметного уменьшения динуклеотидной фракции не происходит. По у.-ф. погло-

щению (260 мμ), во фракции щелочестабильных динуклеотидов (пик II на рис. 1) содержится 2,9%, во фракции III 0,35%, а 1 M NaCl элюируется 0,54% всего нуклеотидного материала РНК печени сома. Таким образом, в рРНК печени сома около 1,5 мол. % рибозы является метилированной. По количеству NmNp рРНК печени сома близка другим животным рРНК (клетки L и HeLa)^(10, 11) и резко отличается от бактериальных рРНК⁽⁸⁾. При дальнейшем фракционировании ди- и тринуклеотидов было найдено, что после предварительной обработки этих олигонуклеотидов щелочной фосфатазой разделение всех полученных динуклеозидмонофосфатов NmpN при помощи двумерной хроматографии на бумаге значительно улучшается. При таком фракционировании во фракции NmpN из рРНК печени сома найдены почти все из 16 возможных динуклеотидов (рис. 2.) После разделения фракции III (рис. 1) на хроматограмме обнаружено 9 пятен (рис. 3), четыре из них были идентифицированы как нуклеозиды (пятна 6—9), соответствующие высвобождающимся при щелочном гидролизе 5'-кошцевым нуклеозиддифосфатам. Идентификация других компонентов фракции III существенно затруднена тем, что они присутствуют в небольших количествах.

Данные по содержанию отдельных олигонуклеотидов NmpN представлены в табл. 1. Они являются средними величинами из шести отдельных определений соответствующих олигонуклеотидов в трех гидролизатах РНК. Из этих данных можно видеть, что 2-О-метилрибозные остатки в рРНК печени сома распределены нехаотично. В частности, об этом свидетельствуют резкие различия по содержанию разных динуклеотидных изомеров одного и того же состава (при хаотическом распределении количество таких изомеров должно быть одинаковым). Так, например, количество AmpG вдвое больше, чем GmpA, а количество AmpC в 6,0 раз больше, чем CmpA. Хотя 2-О-метилрибоза, по-видимому, встречается во всех изомерных динуклеотидах рРНК сома, тем не менее основное ее количество (около 30%) все же сосредоточено в динуклеотидах GmpU и (или) UmpG. Это существенно отличает исследованную РНК от всех других рРНК, в том числе и от рРНК животных.

Таблица 1

Содержание щелочестабильных динуклеотидов в высокомолекулярной рРНК печени сома

№ пятна на хроматограмме (рис. 2)	NmpN	Молярное колич., на 100 мол. Np рРНК	Содерж., % к общ. колич. (M ± σ)
1	GmpG	0,40	12,4 ± 0,40
2	GmpC + CmpG	0,17	5,3 ± 0,17
3	CmpC	0,11	3,4 ± 0,30
4	GmpA	0,04	1,2 ± 0,10
5	AmpG	0,10	3,1 ± 0,06
6+7	GmpU + UmpG	0,98	30,4 ± 0,90
8	CmpU	0,15	4,7 ± 0,30
9	UmpC	0,03	0,9 ± 0,17
10	AmpA	0,18	5,6 ± 0,40
11	AmpC	0,30	9,3 ± 0,11
12	CmpA	0,05	1,6 ± 0,07
14	AmpU + UmpA	0,35	10,9 ± 0,60
15	UmpU	0,36	11,2 ± 0,70

На высокую специфичность метилирования рибозных остатков в рРНК печени сома указывает также целый ряд других моментов. Так, несмотря на сходство по степени метилирования рибозных остатков, суммарная рРНК печени сома резко отличается от рРНК мышечных фибробластов⁽¹⁰⁾ по количеству некоторых одноименных щелочестабильных динуклеотидов. Так, например, в рРНК печени сома количество GmpU + UmpG и UmpU соответственно в 3,8 и 2,5 раз больше, а CmpC и GmpA + AmpG соответственно в 2 и 3,5 раз меньше, чем в рРНК L-клеток⁽¹⁰⁾. Не исключено, что такой особый характер метилирования рРНК печени сома носит какие-то еще неизвестные черты специфики метилирования рРНК рыб, вместе с тем в нем, по-видимому, могут отражаться и какие-то весьма общие закономерности метилирования животных рРНК вообще. Как бы то ни было, полученные нами данные с определенностью свидетельствуют об уникальном характере распределения щелочестабильных динуклеотидов в высокомолекулярной рРНК печени сома и показывают, что изучение частоты встречаемости этих фрагментов может иметь определенное значение для выяснения специфичности метилирования рибозных остатков в различных РНК.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Smith, D. B. Dunn, *Biochim. et biophys. acta*, **31**, 573 (1959). ² D. B. Dunn, J. H. Hitchborn, A. R. Trim, *Biochem. J.*, **88**, 34 P (1963). ³ S. Morisawa, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, **68**, 147 (1963); **169**, 285 (1968). ⁴ R. H. Hall, *Biochemistry*, **3**, 876 (1964). ⁵ J. L. Nichols, B. G. Lane, *J. Mol. Biol.*, **30**, 477 (1967); *Canad. J. Biochem.*, **46**, 109, 1487 (1968). ⁶ D. T. Dubin, A. Günalp, *Biochim. et biophys. acta*, **134**, 106 (1967). ⁷ P. Fellner, F. Sanger, *Nature*, **219**, 236 (1968). ⁸ J. L. Nichols, B. G. Lane, *Canad. J. Biochem.*, **44**, 1633 (1966). ⁹ H. Singh, B. G. Lane, *Canad. J. Biochem.*, **42**, 1011 (1964). ¹⁰ B. G. Lane, T. Tamaoki, *J. Mol. Biol.*, **27**, 335 (1967). ¹¹ E. K. Wagner, S. Penman, V. M. Ingram, *J. Mol. Biol.*, **29**, 371 (1967). ¹² L. A. Isaksson, J. H. Phillips, *Biochim. et biophys. acta*, **155**, 63 (1968). ¹³ G. W. Rushizky, H. A. Sober, *Biochim. et biophys. acta*, **55**, 247 (1962). ¹⁴ Т. В. Венкстери, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1967. ¹⁵ R. K. Krane, F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, **201**, 235 (1953). ¹⁶ G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, *In Nucleic acids*, **1**, N. Y., 1955, p. 493.