

В. Л. ЛЕИТИН, О. В. ПОДОБЕД, М. И. ЛЕРМАН

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ПОЛИРИБОСОМ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 26 I 1971)

В 1965 г. было выяснено, что обнаруживаемая в цитоплазме наиболее быстро метящаяся рНК седиментирует между 30 S и 90 S и содержит мРНК на пути в полирибосомы (¹⁻⁴). Было указано, что эти цитоплазматические структуры включают комплексы мРНК с 40 S рибосомной частицей и что указанные комплексы являются транспортной формой мРНК и метаболическими предшественниками полирибосом (¹⁻⁵). Согласно другой гипотезе, рассматриваемые частицы содержат мРНК, не связанную с рибосомными частицами, а являются специфическими комплексами мРНК с белками-информосомами (^{6, 7}). Вместе с тем допускалось и существование информосомно-рибосомных комплексов. Однако авторы не представили доказательств того, что эти цитоплазматические частицы действительно являются предшественниками полирибосом и что они естественным путем поступают в цитоплазму, а не вытекают из ядра в ходе гомогенизации. Эти проблемы и являются предметом данного сообщения.

В первой серии экспериментов исследовали кинетику включения мРНК в предполагаемые предшественники полирибосом и в полирибосомы.

Белым крысам самцам, весом 180—220 г, голодавшим в течение суток, внутривенно вводили актиномицин D для избирательного ингибирования синтеза рНК (^{9, 10}) (0,2 мг на 1 кг веса), через час таким же способом вводили C¹⁴-оротовую кислоту (40 мС на крысу) и забивали через 40 мин., 2 часа и 4 часа. Выделение осаждаемого Mg²⁺ цитоплазматического материала (P_{Mg}) и анализ в градиенте концентрации сахарозы и градиенте плотности CsCl описаны в предыдущих работах (^{8, 11}).

На рис. 1 представлены результаты седиментационного и плотностного распределения цитоплазматического материала, полученного после различных периодов мечения животных C¹⁴-оротовой кислотой. Профиль у.-ф. поглощения (рис. 1 A₁, B₁, B₁) в градиенте сахарозы показывает, что исследуемая цитоплазматическая фракция содержит полирибосомы (> 100 S), рибосомы (84 S) и рибосомные субъединицы (64 S и 45 S) в соотношении: 80—85%, 9—10%, 4—5%, 2,5% соответственно, что совпадает с данными прямого анализа цитоплазматического экстракта. После введения актиномицина D у.-ф. профиль остается неизменным в течение, по крайней мере, 5 час., и это доказывает, что в данных условиях опыта клетки печени способны образовывать полирибосомы с нормальной скоростью. Рассмотрение профиля распределения радиоактивного материала (рис. 1, A₁, B₁, B₁) обнаруживает, что при исследованных сроках мечения радиоактивный материал распределяется в широкой зоне градиента от 30 S и дальше, включая зону тяжелых полирибосом, причем наиболее быстро метятся структуры, седиментирующие в легкой зоне градиента (от 30 S до 150—200 S). С увеличением времени мечения удельная активность этих структур возрастает значительно медленнее, чем удельная активность полирибосом. Удельная активность (имп/(мин·D₂₆₀)) составила для полирибосом (фракции 1—18): 71 (A₁ на рис. 1); 272 (B₁); 925 (B₁); для частиц, седиментирующих в легкой зоне градиента (фракции 19—30): 81 (A₁); 210 (B₁); 727 (B₁). Другими словами, происходит перемещение

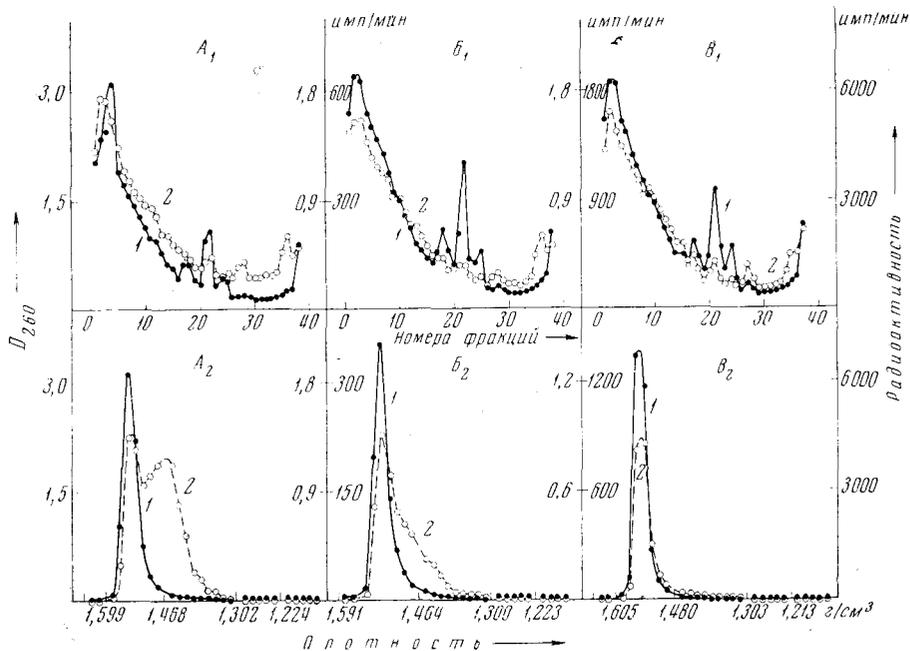


Рис. 1. Кинетика включения мРНК в цитоплазматические рибонуклеопротеиды. Седиментационный (A_1 , B_1 , B_1) и плотностный (A_2 , B_2 , B_2) анализ. Сроки мечення животных после введения C^{14} -оротовой кислоты: A_1 , A_2 40 мин, B_1 , B_2 2 часа, B_1 , B_2 4 часа. 1 — D_{260} , 2 — радиоактивность

меченого материала из легкой зоны градиента в полирибосомы. Это указывает на то, что быстрометящийся материал может быть предшественником последних.

Для выяснения строения указанных структур и для их отделения от полирибосом, что необходимо для количественной обработки результатов кинетики мечення, цитоплазматический материал анализировали в градиенте CsCl (рис. 1, A_2 , B_2 , B_2). У.-ф. профиль представлен острым и почти симметричным пиком с плавучей плотностью 1,55—1,56 г/см³. Эта величина характерна для очищенных рибосом и полирибосом (¹¹, ¹²). Некоторая асимметрия пика в менее плотную зону градиента указывает на присутствие в исследуемом материале определенного количества (около 20%) менее плотных и гетерогенных по плотности частиц.

Профиль радиоактивности, дающий распределение новообразованного материала, обнаруживает два компонента: гомогенный с ρ 1,55—1,56 г/см³ и сильно гетерогенный, расположенный в зоне с ρ 1,40—1,55 г/см³. Этот гетерогенный материал метится быстро, и при коротких сроках мечення на его долю приходится значительная часть всей радиоактивности (рис. 1 A_2). С увеличением времени мечення вклад гетерогенного материала резко уменьшается и метка накапливается в гомогенном компоненте.

На основании этих данных можно предположить, что быстрометящийся материал, имеющий гетерогенное плотностное распределение в градиенте CsCl, идентичен гетеродисперсному материалу, седиментирующему в легкой зоне сахарозного градиента (30 S — 150 S), и представляет собой предшественники полирибосом, а гомогенный компонент — зрелые, полностью активные, новообразованные полирибосомы.

Для доказательства этого предположения, данные по кинетике мечення этих компонентов, представленные на рис. 1 (A_2 , B_2 , B_2), а также других независимых опытов были обработаны количественно. Для этого профили у.-ф. поглощения и радиоактивности разлагали на гомогенный и гетерогенный компоненты исходя из гауссова распределения для гомогенного ком-

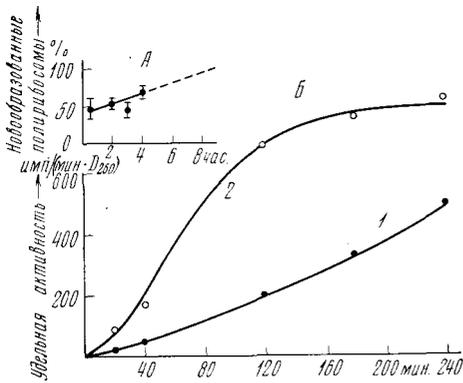


Рис. 2. Кинетика меченя мРНК гомогенного и гетерогенного по плотности компонентов цитоплазматической фракции P_{Mg} . А — кинетика включения метки в гомогенный компонент; В — кинетика включения метки в гомогенный (1) и гетерогенный (2) компоненты. Для 40 мин. меченя проведено 4 опыта; для 2, 3, 4 час. — по 2 опыта

зательства существования предшественников и их превращения в полирибосомы, исследовали судьбу предшественников в условиях блока синтеза РНК (чейз), а также наблюдали накопление их в условиях, когда синтез белка блокирован циклогексимидом (рис. 3). Видно, что при блоке синтеза РНК метка чейзируется в полирибосомы (рис. 3Б, б), распада полирибосом и меченого материала не происходит, более того, наблюдается небольшой дополнительный перенос метки в цитоплазму (рис. 3А, а). Следует, однако, отметить, что некоторая часть меченого гетерогенного компонента не входит в полирибосомы в условиях чейза. Причины этого явления в настоящее время остаются невыясненными. В условиях блока синтеза белка циклогексимидом (96% ингибирования через 1 час и 85% через 4 часа) происходит задержка перехода метки из предшественников в полирибосомы (рис. 3В).

Таким образом, эти результаты доказывают, что быстрометящийся материал, дающий гетерогенное распределение в градиенте $CsCl$, является метаболическим предшественником полирибосом.

Из данных по кинетике меченя полирибосом и их предшественников можно заключить следующее: 1) Наличие лаг-периода на кривой предшественника означает, что предшественники появляются естественным путем в цитоплазме, а не попадают в цитоплазматическую фракцию при гомогенизации. 2) Время, необходимое для синтеза, созревания, переноса мРНК в цитоплазму и ее включения в предшественники, составляет около 10 мин. 3) Поскольку мРНК появляется в зрелых полирибосомах через 20 мин., то время, необходимое для ее перехода из предшественника в полирибосомы, составляет около 10 мин.; эта величина превышает время, которое необходимо для трансляции большинства мРНК⁽¹³⁾. 4) Пул метаболических предшественников полирибосом довольно велик (около 60% всей мРНК цитоплазмы), и содержащаяся в нем мРНК полностью обновляется через 9 час. (рис. 2А).

Полученные результаты дают определенные указания относительно строения предшественников и процесса новообразования полирибосом. Исходя из данных по седиментационному распределению в градиенте сахарозы и величины плавающей плотности в градиенте $CsCl$ материала из соответствующих зон сахарозного градиента, можно заключить, что наиболее ранние предшественники представляют собой комплексы 40 S рибосомной частицы с мРНК, которая покрыта белком. К этим структурам присоединяются 60 S рибосомные частицы, и образуются активные транслирующие ри-

понента. Из рис. 2 видно, что оба компонента имеют различную кинетику меченя. Скорость включения мРНК в зрелые полирибосомы линейно растет в течение исследованного периода времени и характеризуется наличием лаг-периода, равного приблизительно 20 мин. Гетерогенный компонент метится быстрее, и задержка его при поступлении в цитоплазму составляет около 10 мин. Через 3—4 часа гетерогенный компонент насыщается меткой, а радиоактивность полирибосом к этому времени еще не достигает максимума. Эти данные подтверждают, что гетерогенный компонент содержит предшественники полирибосом.

Чтобы получить прямые дока-

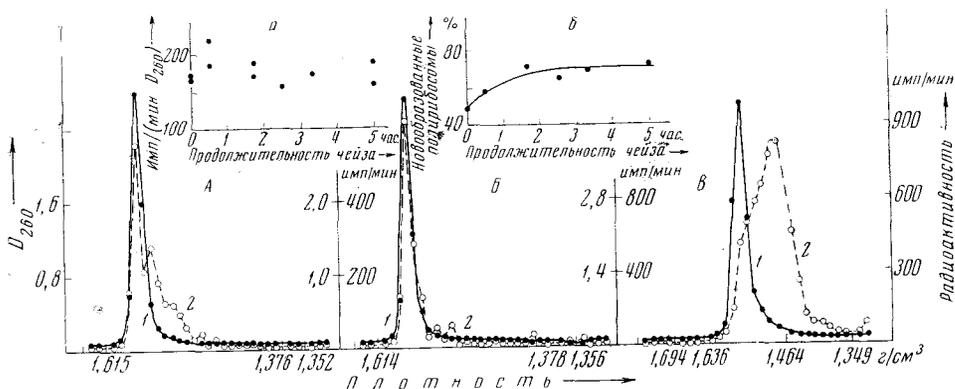


Рис. 3. Судьба предшественников полирибосом в условиях блока синтеза РНК или белка. А — контроль: животным вводили актиномицин D (0,2 мг/кг), через час — C^{14} -оротовую кислоту и через 40 мин. забивали. Б — блок синтеза мРНК: животных метили C^{14} -оротовой кислотой в течение 40 мин. в присутствии малой дозы актиномицина D, затем вводили большую дозу актиномицина D (2 мг/кг) и через 100 мин. забивали. а — мечение P_{Mg} после блока синтеза РНК, б — переход метки из гетерогенного компонента в полирибосомы после блока синтеза РНК. В — блок синтеза белка: животным вводили актиномицин D (0,2 мг/кг), через 1—2 мин. — циклогексимид (50 мг/кг), через час — C^{14} -оротовую кислоту и через 4 часа забивали. 1 — D_{260} , 2 — радиоактивность

босомы, связанные с инициаторным участком мРНК. Постепенно рибосомы заполняют всю цепь мРНК, образуя зрелые полностью активные полирибосомы. Таким образом, в ходе этого процесса могут возникнуть «незрелые полирибосомы», в которых не вся цепь мРНК оккупирована рибосомами. Поскольку мРНК в цитоплазматическом экстракте существует в форме рибонуклеопротеидов, которые в градиенте $CsCl$ дают дискретную полосу ($\rho = 1,40$ г/см³) (¹⁴⁻¹⁶), то плавучая плотность рассмотренных выше предшественников полирибосом и «незрелых полирибосом» должна быть промежуточной между плотностью зрелых полирибосом ($\rho = 1,56$ г/см³) и плотностью указанных рибонуклеопротеидов ($\rho = 1,40$ г/см³), а не превышать плотность предсуществующих полирибосом, что имело бы место, если бы мРНК не была покрыта белком.

Вопрос о том, где происходит присоединение 40 S рибосомной частицы к инициаторному участку новообразованной мРНК, остается в настоящее время нерешенным.

Есть указание, что присоединение может произойти в ядре (¹⁷), в этом случае 40 S рибосомным частицам принадлежит определенная роль в селекции зрелых мРНК и в транспорте мРНК в цитоплазму.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
28 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Girard, H. Latham et al., *J. Mol. Biol.*, **11**, 187 (1965). ² W. K. Joklik, Y. Becker, *J. Mol. Biol.*, **13**, 511 (1965). ³ E. C. Henshaw, M. Revel, H. N. Hiatt, *J. Mol. Biol.*, **14**, 241 (1965). ⁴ E. H. McConkey, J. M. Hopkins, *J. Mol. Biol.*, **14**, 257 (1965). ⁵ М. И. Лерман, Е. В. Владимирцева и др., *Биохимия*, **30**, 375 (1965). ⁶ А. С. Спирич, Н. В. Белицина, Н. А. Айтхожин, *Журн. общ. биол.*, **25**, 321 (1964). ⁷ A. S. Spirin, *Current Topics Developm. Biol.*, **1**, 1 (1966). ⁸ В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, *Биохимия*, **34**, 839 (1969). ⁹ М. И. Лерман, В. Л. Мантьева, Г. П. Георгиев, *ДАН*, **152**, 741 (1963). ¹⁰ R. P. Perry, *Exp. Cell Res.*, **29**, 400 (1963). ¹¹ V. L. Leytin, O. V. Podobed, M. I. Lerman, *J. Mol. Biol.*, **51**, 727 (1970). ¹² A. S. Huang, D. Baltimore, *J. Mol. Biol.*, **47**, 275 (1970). ¹³ H. Fan, S. Penman, *J. Mol. Biol.*, **47**, 263 (1970). ¹⁴ M. Girard, D. Baltimore, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 999 (1966). ¹⁵ Л. П. Овчинников, А. С. Воронина и др., *Мол. биол.*, **2**, 752 (1968). ¹⁶ D. Baltimore, A. S. Huang, *J. Mol. Biol.*, **47**, 263 (1970). ¹⁷ E. Seidebottom, H. Harris, *J. Cell Sci.*, **5**, 351 (1969).