

А. С. СТЕПАНОВ, А. С. ВОРОНИНА

ОБРАЗОВАНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ИНФОРМОСОМОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

(Представлено академиком А. С. Спириным 3 VIII 1971)

В предыдущих работах было показано, что РНК-связывающий белковый фактор клеток печени крысы строго стехиометрично взаимодействует с экзогенной РНК, образуя комплексы, названные информосомоподобными частицами (¹⁻³). Информосомоподобные частицы образуются и при добавлении чужеродной РНК к цитоплазматическим экстрактам клеток зародышей вьюна (^{4, 5, 7}). Признаком, отличающим искусственные информосомоподобные частицы от естественных информосом (^{4, 5, 7}), является обратимое

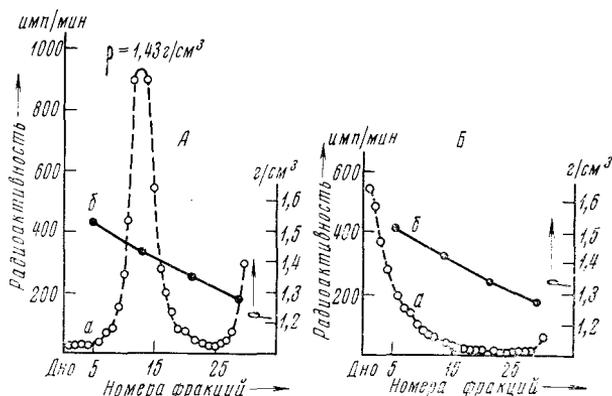


Рис. 1. Плотностное распределение продуктов взаимодействия безрибосомного экстракта клеток печени с экзогенной РНК. А — смесь экстракта с 2 μg 23S C^{14} -РНК E. coli через 20 мин. инкубации при 4° фиксировали формальдегидом; Б — после 5 мин. инкубации к смеси экстракта с 2 μg 23S C^{14} -РНК добавляли 1 мг C^{12} -рРНК E. coli . Через 15 мин. смесь фиксировали формальдегидом. Все операции при 4° . Центрифугирование в роторе SW-39 при 36 000 об/мин 27 час. Здесь и на рис. 2—4: а — радиоактивность, б — плотность CsCl

мость реакции взаимодействия РНК-связывающего белка с чужеродной РНК (нестабильность информосомоподобных частиц). Иными словами, равновесие $\text{РНК} + \text{РНК-связывающий белок} \rightleftharpoons \text{РНК-белок}$ можно сместить в сторону диссоциации комплекса любым способом, удаляющим РНК-связывающий белок. В частности, добавление избытка РНК приводит к изменениям седиментационных и плотностных характеристик информосомоподобных частиц, свидетельствуя о диссоциации комплексов (^{3, 7}). Этого не происходит в случае естественных информосом (^{4, 5}).

Предлагаемая работа показывает, что если реакцию комплексообразования проводить не на холоду, как это делалось ранее (^{3-5, 7}), а при физиологических температурах: 37° для экстрактов печени крысы или 21° для экстрактов зародышей вьюна, то образуются информосомоподобные частицы, не отличимые по стабильности от естественных информосом.

Безрибосомный экстракт клеток печени крысы получали из клеточного экстракта осаждением рибосом при 36 000 об/мин в течение 90 мин. в роторе SW-39 центрифуги Spinco L. Подробнее методика описана ранее (¹, ⁵). Цитоплазматический экстракт получали из клеток зародышей вьюна на стадии 10—12 час. развития, как описано ранее (⁴); для получения из него безрибосомного экстракта применяли ту же методику, что и для получения безрибосомного экстракта клеток печени. Все растворы готовили на стандартном буфере следующего состава: 0,01 M триэтанол-амин (ТЭА) pH 7,8—7,85, 0,01 M KCl, 0,001 M MgCl₂ и 0,001 M β-меркаптоэтанол.

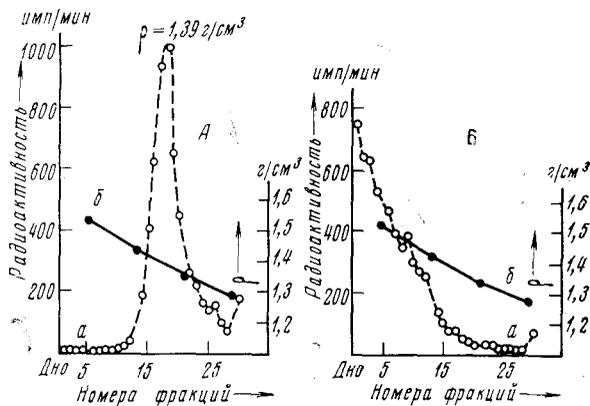


Рис. 2. Плотностное распределение продуктов взаимодействия безрибосомного цитоплазматического экстракта клеток зародышей вьюна с экзогенной РНК. А — смесь экстракта с 1,5 мкг 23S C¹⁴-РНК *E. coli* через 45 мин. инкубации на холоду фиксировали формальдегидом; В — к смеси экстракта с 1,5 мкг 23S C¹⁴-РНК *E. coli* через 30 мин. добавляли 1 мкг C¹²-рРНК, а еще через 15 мин. добавляли формальдегид. Все операции проводили при 4°. Центрифугирование в роторе SW-39 при 36 000 об/мин 20 час.

Образование информосомоподобных частиц обычного типа (нестабильных) проводили на холоду (0°—+4°), добавляя к безрибосомным экстрактам рибосомальную 23S C¹⁴-РНК *Escherichia coli*. Через несколько минут к половине смеси добавляли большой избыток немецкой рибосомальной РНК *E. coli*, а еще через 15—20 мин. обе половины фиксировали формальдегидом. Анализ препаратов в градиенте плотности CsCl проводили по методике, описанной в статье (²). Результаты экспериментов, представленные на рис. 1 и 2, показывают, что искусственные информосомоподобные частицы, образованные на холоду, частично депротенизируются после добавления избытка свободной РНК (их плавучая плотность повышается). Это доказывает обратимость реакции образования комплексов РНК с РНК-связывающим белком как клеток печени крысы (рис. 1), так и клеток зародышей вьюна (рис. 2). В противоположность этим результатам добавление избытка РНК к естественным информосомам, как было показано ранее, существенного влияния на их плотностные характеристики не оказывает (⁴, ⁵).

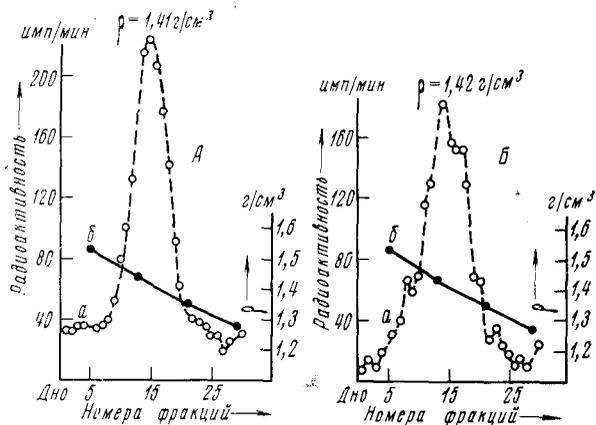


Рис. 3. Плотностное распределение информосомоподобных частиц, образованных при 21,5° в смеси безрибосомного экстракта клеток зародышей вьюна с экзогенной РНК. А — экстракт смешивали с 1,5 мкг 23S C¹⁴-РНК *E. coli* и смесь инкубировали 30 мин. при 21,5°, после чего охлаждали и фиксировали формальдегидом через 15 мин; В — смесь экстракта с 1,5 мкг 23S C¹⁴-РНК после 30 мин. инкубации при 21,5° охлаждали и добавляли на холоду 1 мкг C¹²-рРНК. Через 15 мин. смесь фиксировали формальдегидом. Центрифугирование в роторе SW-39 при 36 000 об/мин 20 час.

Справедливо предположить, что причиной различной стабильности искусственных и естественных РНП-комплексов является различие в условиях образования частиц. Действительно, все этапы реакции экзогенной РНК с РНК-связывающим белком экстрактов животных клеток проводятся на холоду, в то время как образование естественных комплексов, информсомом, *in vivo* должно, очевидно, происходить при физиологических температурах.

Поэтому в следующей серии опытов для получения информсомоподобных частиц мы нагревали смесь $^{23}\text{S } ^{14}\text{C}$ -РНК *E. coli* с немеченым безрибосомным цитоплазматическим экстрактом клеток зародышей вьюна до физиологической температуры этого объекта $21,5^\circ$. Из результатов плотностного анализа препаратов (рис. 3) следует, что комплексование РНК-свя-

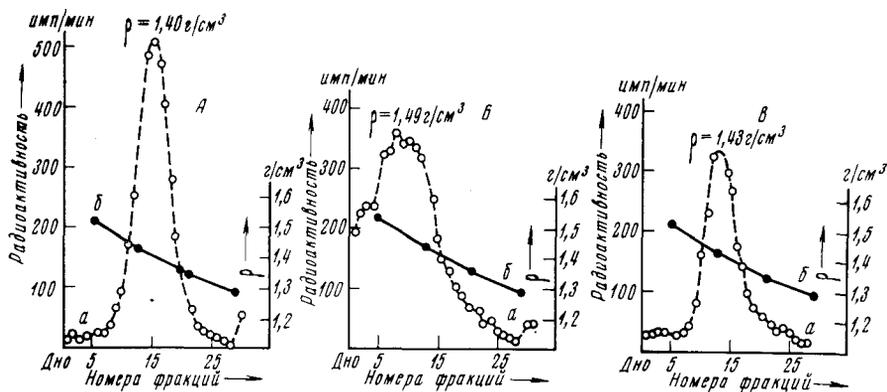


Рис. 4. Плотностное распределение продуктов взаимодействия экзогенной РНК с экстрактом клеток печени. А — экстракт смешивали с 2 мкг $^{23}\text{S } ^{14}\text{C}$ -РНК *E. coli*, смесь прогревали 30 мин. при 20° , охлаждали и через 15 мин. фиксировали формальдегидом; Б — то же, что А, но после охлаждения к смеси добавляли 1 мкг ^{12}C -рРНК. Через 15 мин. фиксировали; В — смесь экстракта с 2 мкг $^{23}\text{S } ^{14}\text{C}$ -РНК прогревали 5 мин. при 37° , охлаждали и добавляли на холоду 1 мкг ^{12}C -рРНК *E. coli*, а через 15 мин. фиксировали формальдегидом. Центрифугирование в роторе SW-39 при 36 000 об/мин 20 час.

зывающего белка с экзогенной РНК, проводимое при физиологической температуре, обеспечивает стабилизацию информсомоподобных частиц: несмотря на добавление большого избытка РНК искусственные частицы с плавучей плотностью $1,39\text{--}1,42 \text{ г/см}^3$ не депротенизируются (рис. 3Б).

Зависимость стабильности информсомоподобных частиц от температуры их образования еще сильнее выражена в реакции экзогенной РНК с РНК-связывающим белком экстрактов клеток печени крысы. Здесь попытка провести реконструкцию стабильных информсомоподобных частиц при 20° не привела к положительному результату. Добавление избытка РНК к смеси $^{23}\text{S } ^{14}\text{C}$ -РНК *E. coli* с безрибосомным экстрактом, прогретой 30 мин. при 20° , приводит к разрушению РНП-комплексов (рис. 4Б); основная часть радиоактивного материала распределена в зоне градиента с плотностью от $1,48$ до $1,55 \text{ г/см}^3$. Следует напомнить, что в случае цитоплазматического экстракта клеток зародышей вьюна при этой же температуре за 30 мин. образуются частицы, не отличимые от естественных информсомом (рис. 3). В экстрактах клеток печени крысы стабильные искусственные РНП-частицы были получены только при нагревании реакционной смеси до физиологической температуры данного объекта 37° , т. е., как можно думать, что температуры образования естественных информсомом *in vivo*. Уже 5-минутного прогревания при 37° достаточно для образования информсомоподобных комплексов, не разрушающихся при добавлении избытка РНК (рис. 4В). В этом случае искусственные комплек-

сы распределяются в зоне с плавучей плотностью от 1,39 до 1,45 г/см³ т. е. в зоне естественных информосом.

Полученные результаты прежде всего демонстрируют сильную зависимость изучаемой реакции от температуры. Однако в нашем случае роль температуры не сводится к увеличению скорости процесса и к увеличению числа белковых молекул, участвующих в реакции. Главным свойством РНК-связывающего белка остается строгая стехиометричность взаимодействия с РНК при всех изученных температурах (см. рис. 1А, 2А, 3А, 4А). Для образования стабильных комплексов необходимым условием является прогревание реакционной смеси до физиологической температуры того организма, чей белок участвует в реакции. Именно РНК-связывающий белок определяет температуру, необходимую для «правильной» сборки.

Таким образом, как показывают результаты данной работы, РНП-комплексы, не отличимые от информосом по всем известным свойствам, могут быть получены искусственно. Полученные результаты не опровергают, а скорее доказывают предобразование информосом в клетке *in vivo*. Действительно, для получения стабильных искусственных информосомоподобных частиц необходимо приготавливаемый на холоду экстракт клеток прогревать до физиологической температуры, тогда как информосомы могут быть обнаружены в экстракте и без предварительного прогревания (при гоменизации на холоду).

Полученные нами данные также не противоречат утверждению, что РНК-связывающий белок может являться естественным белком информосом.

Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Спирину за постоянное внимание к работе и обсуждение результатов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 VII 1971

Институт белка
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. П. Овчинников, А. С. Воронина и др., Мол. биол., 2, 752 (1968).
² А. С. Воронина, А. С. Степанов, Л. П. Овчинников, Биохимия, 37, № 1, 10 (1972).
³ А. С. Воронина, А. С. Степанов и др., Биохимия, 37, № 2 (1972).
⁴ Л. П. Овчинников, А. Ц. Аванесов, А. С. Спирин, Мол. биол., 3, 465 (1969).
⁵ A. S. Spirin, European J. Biochem., 10, 20 (1969).
⁶ А. С. Степанов, А. С. Воронина и др., Биохимия, 37, № 1, 3 (1972).
⁷ Л. П. Овчинникова, А. Ц. Аванесов, Мол. биол., 6, 893 (1969).