

Г. Н. ЗАЙЦЕВА, Т. А. САЛИХОВ

**СРАВНЕНИЕ РИБОСОМ ЦИТОПЛАЗМЫ И БИПОЛЯРНОГО ТЕЛА  
(ЭНДОСИМБИОНТА) КЛЕТКИ ЗООФЛАГЕЛЛИЯТА  
STRIGOMONAS ONCOPELTI**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 4 X 1971)

Клетка *Strigomonas* (*Crithidia*) *oncopelti* содержит несколько крупных биполярных тел, отсутствующих у других представителей семейства трипаносомид (1). По своей морфологии и внутренней организации биполярное тело напоминает грамотрицательную бактерию (1-3). Биполярное тело снабжает клетку *S. oncopelti* лизином, гематином и, по-видимому, тиминном, получая от нее необходимые метаболиты (3, 4). На основании этого можно считать данную структуру своеобразным эндосимбионтом клетки *S. oncopelti*. Однако с достоверностью нельзя утверждать, является ли биполярное тело эндосимбионтом бактериального происхождения или представляет собой специфическую органеллу (3). Для выяснения этого вопроса необходимо изучение структуры и функции биполярного тела в хозяйской клетке и вне ее.

В связи с этим интересно было установить, обладает ли биполярное тело собственной белоксинтезирующей системой и прежде всего основным ее компонентом — рибосомами. Никаких данных о содержании в биполярных телах рибосом в литературе нет.

В предыдущей нашей работе (5) в изолированных биполярных телах химическим анализом было обнаружено 70% белка и 18% РНК (на сухой вес структуры). Нами было сделано предположение о наличии рибосом в биполярных телах *S. oncopelti*.

В настоящей работе мы попытались выделить рибосомы из биполярных тел *S. oncopelti* и охарактеризовать их. Кроме того, мы ставили себе целью сравнить изолированные рибосомы из биполярных тел и цитоплазмы по седиментационным и химическим свойствам.

В работе использовали культуру *S. oncopelti*, выращенную на полноценной жидкой среде с азацией (7). Биполярные тела выделяли из клеток (80—90 час. роста) по методу Мармура и др. (8) с некоторой модификацией (6).

Чистоту изолированных биполярных тел контролировали с помощью световой и люминесцентной микроскопии.

Рибосомы из биполярных тел выделяли в среде следующего состава (в  $\mu\text{мол}$ ): трис-НСI-буфер, pH 7,6, 0,02;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,25;  $\text{KCl}$  0,4;  $\text{NaCl}$  0,04;  $\text{MgCl}_2$  0,01;  $\beta$ -меркаптоэтанол 0,05.

Суспензию биполярных тел обрабатывали на холоду в течение 30 мин. с помощью детергентов тритона X-100 и дезоксихолата Na в конечной концентрации 2 и 0,5%, соответственно.

Нерастворимую часть биполярных тел осаждали при 30 000  $g$  в течение 30 мин. Из полученного гомогената рибосомы отделяли центрифугированием при 105 000  $g$  в течение 2 час.

Рибосомы из биполярных тел подвергали 2—3-кратной очистке детергентами от загрязняющих мембран и цитоплазматических белков. Рибосомы цитоплазмы получали обычным способом после осаждения рибосо-

мальной фракции ( $^{\circ}$ ). Следует отметить, что для очистки рибосом биполярных тел от цитоплазматических фракцию выделенных структур обрабатывали рибонуклеазой (20  $\mu$ г/мл, 30 мин. при комнатной температуре).

Для определения чистоты препаратов рибосом биполярных тел и цитоплазмы снимали их спектры поглощения в интервале от 230 до 290 м $\mu$ . Отношение  $E_{260} / E_{280}$  для рибосом биполярных тел составляло обычно 1,60—1,70, а для цитоплазматических 1,70—1,80.

Концентрацию рибосом и рРНК в растворе определяли при 260 м $\mu$ , принимая для рибосом  $E_{260}^{0,1\%} = 11$ , а для рРНК  $E_{260}^{0,1\%} = 23$ . Количество белка измеряли по Лоури.

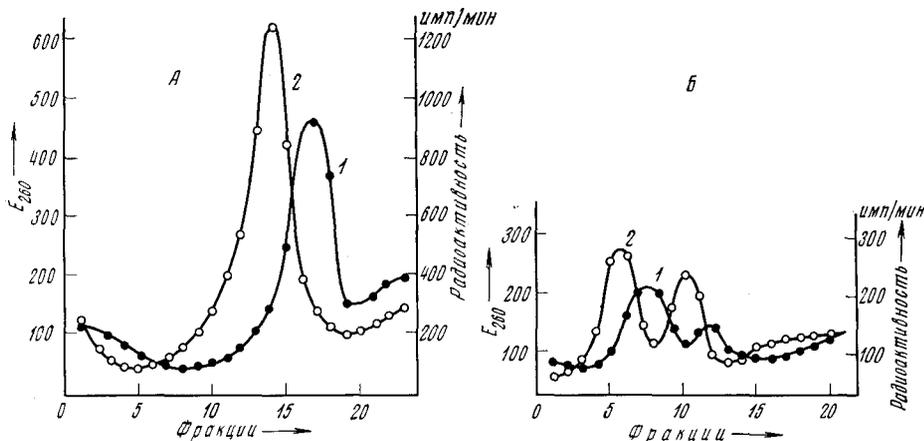


Рис. 1. Седиментация рибосом (А) и рРНК (Б) из биполярных тел и цитоплазмы *S. oncopelti*. 1 —  $E_{260}$  рибосом и рРНК биполярных тел; 2 — радиоактивность рибосом и рРНК цитоплазмы. Для А: линейный градиент концентрации сахарозы от 5 до 20% готовили на буфере трис-НСl, рН 7,6, 0,02 мол/л,  $MgCl_2$  0,01 мол/л,  $KCl$  0,01 мол/л; ультрацентрифуга «Spinco» L-50, ротор SW-25,1,  $V = 25$  мл, 25 000 об/мин, время 240 мин., температура 2 $^{\circ}$ ; 3 опт. единицы (при 260 м $\mu$ ) рибосом биполярных тел; 0,5 опт. единицы  $C^{14}$ -рибосом цитоплазмы; фракции по 1 мл обрабатывали по методу (10). Для Б: буфер трис-НСl, рН 7,4, 0,02 мол/л,  $Na - SDS$  0,2%,  $NaCl$  0,5 мол/л; ультрацентрифуга «Spinco» L-2, ротор SW-50;  $V = 5$  мл, 39 000 об/мин, время 240 мин., температура 17 $^{\circ}$ ; 3 опт. единицы рРНК биполярных тел и 0,3 опт. единицы  $C^{14}$ -рРНК цитоплазмы; фракции по 0,2 мл разводили до 1 мл водой и измеряли оптическую плотность при 260 м $\mu$  и радиоактивность в имп/мин (10)

Определение константы седиментации рибосом и рибосомальных РНК биполярных тел проводили центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (5—20%). При этом маркером были меченные по  $C^{14}$ -урацилу цитоплазматические рибосомы *S. oncopelti* с константой седиментации 83 S ( $^{\circ}$ ).

Для рРНК биполярных тел маркером служила меченная по  $C^{14}$ -урацилу рРНК рибосом цитоплазмы *S. oncopelti* с коэффициентом седиментации 26 S и 17 S (10). В этих опытах использовали рРНК биполярных тел и цитоплазмы без их предварительного выделения из рибосом (11). Рибосомы обрабатывали со встряхиванием при комнатной температуре 1—2 мин. с 2% раствором додецилсульфата натрия. При этом рРНК отделялась от белка, который удаляли центрифугированием.

Значения коэффициентов седиментации рибосом и рРНК биполярных тел рассчитывали по формуле (12).

Определение нуклеотидного состава рРНК биполярных тел проводили после щелочного гидролиза рибосом. Рибонуклеотиды разделяли путем их хроматографии на бумаге (12).

Для выделения суммарного рибосомального белка рибосомы обрабатывали 3 M LiCl в 6 M мочеvine. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили согласно описанному методу (10).

Одной из важнейших физико-химических характеристик рибосом является коэффициент седиментации, коррелирующий с их размером и молекулярным весом.

На рис. 1А дан седиментационный профиль (по ультрафиолету) рибосом биполярных тел и для сравнения — радиоактивный профиль рибосом цитоплазмы *S. oncopelti*.

Из представленных данных видно, что рибосомы биполярных тел по своим седиментационным свойствам отличаются от рибосом цитоплазмы, несколько медленнее осаждаюсь в градиенте концентрации сахарозы.

Используя в качестве маркера меченные по  $S^{14}$ -урацилу цитоплазматические рибосомы (83 S) *S. oncopelti*, мы рассчитали, что рибосомы биполярных тел имеют  $s_{20, w}^0 = 67$  S.

Для определения коэффициента седиментации рРНК биполярных тел мы воспользовались методом ее совместного центрифугирования с рРНК цитоплазмы в линейном градиенте концентрации сахарозы (рис. 1Б).

При сравнении седиментационного профиля (по ультрафиолету) рРНК биполярных тел с радиоактивным профилем рРНК цитоплазмы (26 S и 17 S) оказалось, что рРНК биполярных тел отличается от цитоплазматической и имеет коэффициент седиментации, примерно равный для тяжелого компонента 22 S, а для легкого 15 S.

Таким образом, на основании седиментационного изучения рибосом в рРНК можно считать, что рибосомы биполярных тел относятся к 70 S-типу, отличаясь в этом отношении от 80 S-рибосом цитоплазмы *S. oncopelti*.

Известно, что к 70 S-типу принадлежат рибосомы бактерий, митохондрий и хлоропластов, а к 80 S — цитоплазматические рибосомы всех Eukaryota.

Для дальнейшей характеристики рибосом нами был изучен нуклеотидный состав рРНК биполярных тел в сравнении с уже известным составом рРНК цитоплазмы *S. oncopelti* (9).

Из табл. 1 видно, что рРНК биполярных тел существенно отличается по нуклеотидному составу от рРНК цитоплазмы. Особенно резкие различия между ними наблюдаются по содержанию гуаниловой и уридиловой кислот. Характерно, что в составе рРНК биполярных тел больше пуриновых и меньше пиримидиновых нуклеотидов, чем в составе рРНК цитоплазмы.

Так, отношение пуриновых к пиримидиновым нуклеотидам в рРНК биполярных тел составляет 1,53, а в рРНК цитоплазмы 1,18.

Следует отметить также, что рРНК биполярных тел отличается по нуклеотидному составу не только от РНК рибосом цитоплазмы, но и от РНК кинетопласта *S. oncopelti* (10).

Для более полной характеристики рибосом биполярных тел мы провели изучение рибосомальных белков, сравнив их с белками рибосом цитоплазмы *S. oncopelti*.

Препараты белка рибосом биполярных тел нам удалось разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле на 26 фракций (рис. 2).

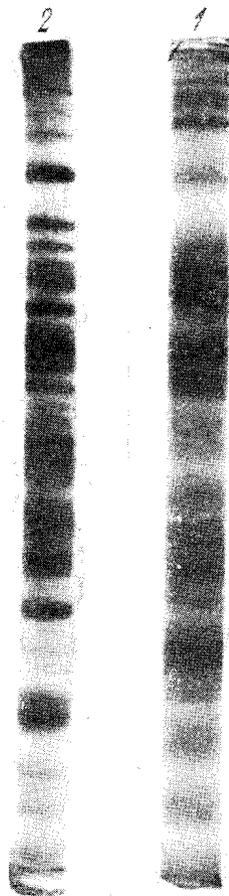


Рис. 2. Распределение белков рибосом при электрофорезе в 15% полиакриламидном геле. 1 — биполярное тело; 2 — цитоплазма

Нуклеотидный состав рибосомальных рРНК биполярных тел и цитоплазмы *S. oncopelti* в мол. %

рРНК	Г	У	Ц	А	$\frac{\Gamma + \Upsilon}{\Gamma + \text{А}}$	$\frac{\Gamma + \text{А}}{\Gamma + \Upsilon}$	$\frac{\Gamma + \text{Ц}}{\text{А} + \Upsilon}$
Биполярное тело	32,14 ± 0,42	17,86 ± 0,28	21,74 ± 0,50	28,26 ± 0,22	1,00	1,53	1,17
Цитоплазма	28,48 ± 0,36	21,97 ± 0,20	23,98 ± 0,32	25,57 ± 0,29	1,02	1,18	1,13

Как видно из рис. 2, характер электрофоретического разделения рибосомальных белков биполярных тел и цитоплазмы различен. В ряде случаев в препаратах рибосомальных белков биполярных тел и цитоплазмы интенсивность окраски электрофоретически однотипных белковых зон неодинакова. На основании полученных данных можно считать, что некоторые белковые фракции рибосом биполярных тел и цитоплазмы заметно отличаются по своей электрофоретической подвижности, а следовательно, по молекулярному весу и аминокислотному составу.

Таким образом, о специфичности рибосом биполярных тел и цитоплазмы свидетельствуют данные по нуклеотидному составу рРНК и по электрофоретическому поведению в ПААГ белков. Подобный факт качественного различия рРНК и белков обнаруживают у рибосом митохондрий и цитоплазмы грибов (<sup>14</sup>, <sup>15</sup>) и простейших (<sup>16</sup>).

Интересно, что сравнение рРНК и рибосомальных белков биполярных тел и кинетопластов (<sup>10</sup>) приводит к заключению о разнокачественности рибосом этих двух структур в клетке.

Не исключено также, что по ряду своих свойств рибосомы биполярных тел могут оказаться сходными с рибосомами бактерий. Этот вопрос в дальнейшем будет нами выясняться путем изучения функциональных свойств рибосом биполярных тел *S. oncopelti*.

Выражаем искреннюю благодарность Н. А. Шаниной за помощь в проведении опытов по электрофоретическому разделению белков в ПААГ.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
6 IX 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. А. Newton, R. W. Horne, *Exp. Cell Res.*, **13**, 563 (1957). <sup>2</sup> Н. Н. Сухарева-Немакова, Е. Н. Хачатуров *Цитология*, **11**, № 9, 1105 (1969). <sup>3</sup> I. W. Gill, H. Y. Vogel, *Biochim. et biophys. acta*, **56**, 200 (1962); *J. Protozool.*, **9**, Suppl. 18 (1962); **10**, № 2, 148 (1963). <sup>4</sup> H. N. Guttman, R. N. Eisenman, *Nature*, **206**, № 4979, 113 (1965). <sup>5</sup> В. А. Newton, *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 109 (1968). <sup>6</sup> Т. А. Салихов, Г. Н. Зайцева, *Научн. докл. высш. школы, Биологические науки*, № 4 (1972). <sup>7</sup> Н. Н. Сухарева-Немакова, Р. Н. Зеленева и др., *Вестн. Московск. унив. (биол., почвов.)* № 3, 3 (1969). <sup>8</sup> J. Marmur, M. E. Cahoron et al., *Nature*, **197**, № 4873, 1228 (1963). <sup>9</sup> Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., *Биохимия*, **35**, в. 3, 565 (1970). <sup>10</sup> В. А. Чугунов, А. Т. Ширшов, Г. Н. Зайцева, *Биохимия*, **36**, в. 3, 630 (1971). <sup>11</sup> D. L. Weller, A. Raina, D. V. Johnstone, *Biochim. et biophys. acta*, **157**, 558 (1968). <sup>12</sup> R. G. Martin, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1372 (1961). <sup>13</sup> Б. Ф. Ванюшин, *В сборн. Совр. методы в биохимии*, М., 1964. <sup>14</sup> H. Kuntzel, *Nature*, **222**, 142 (1969). <sup>15</sup> H. Morimoto, H. O. Halvorson, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 324 (1971). <sup>16</sup> J. C. H. Chi, Y. Suyama, *J. Molec. Biol.*, **53**, 531 (1970).