

Р. Э. КИМЕРАЛ, Н. А. ФЕДОРОВ

2'-О-МЕТИЛИРОВАНИЕ 18S и 28S рРНК ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

(Представлено академиком А. С. Спириным 23 X 1972)

В покоящихся, нестимулированных лимфоцитах человека деградация вновь синтезированной 18S рРНК происходит в 2 раза быстрее, чем 28S рРНК (¹, ²). В результате потери 18S рРНК отношение 28S/18S рРНК в покоящихся лимфоцитах составляет около 2, а скорость накопления рРНК в цитоплазме составляет около половины скорости синтеза 45S рРНК в ядре. Стимуляция лимфоцитов фитогемагглютинином (ФГА) приводит к резкому снижению потери вновь синтезированной 18S рРНК и увеличению скорости транскрипции 45S рРНК задолго до наступления S-фазы. На этом основании Купер (¹, ²) предполагает связь между механизмом, регулирующим величину потери 18S рРНК и делением. Лимфоциты больных хроническим лимфолейкозом, по сравнению с нормальными лимфоцитами, имеют запоздалую и меньшую реакцию на воздействие ФГА и других митогенов.

Метилирование рРНК происходит на уровне 45S рРНК — общего предшественника 18S и 28S рРНК. В клетках млекопитающих около 80% метилированных производных нуклеозидов рРНК представлено в виде 2'-О-метилрибозидов (³). Метилирование рибозы значительно увеличивает прочность 3',5'-фосфодиэфирной межнуклеотидной связи к действию щелочей и рибонуклеаз. Разрыв таких межнуклеотидных связей, по-видимому, осуществлялся в клетке специфической 2'-О-метил-РНКазой (⁴).

Не исключена возможность, что 2'-О-метилирование рРНК ответственно за стабилизацию молекул 18S и 28S рРНК и тем самым может обуславливать различие в реакции нормальных и лимфолейкозных лимфоцитов на действие ФГА и других митогенов. В этой статье приведены данные сравнительного распределения метки между нуклеозид-2'-3'-монофосфатами и щелочестабильными олигонуклеотидами 18S и 28S рРНК лимфоцитов, инкубированных с C¹⁴-(метил)-метионином.

Исследовали лимфоциты доноров и больных хроническим лимфолейкозом. Лимфоциты выделяли из только что взятой на гепарине крови в стерильных условиях (⁵). Клетки в количестве $2 \cdot 10^8$ инкубировали в 10 мл среды следующего состава: среда Игла 90%, инактивированная сыворотка группы АВ (IV) 10%, пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 ед/мл и глутамин. Приготовленную суспензию клеток переносили в чашку Корея и добавляли 25 мС C¹⁴-(метил)-метионина («Amersham», удельная активность 50 мС/ммоль). Про-

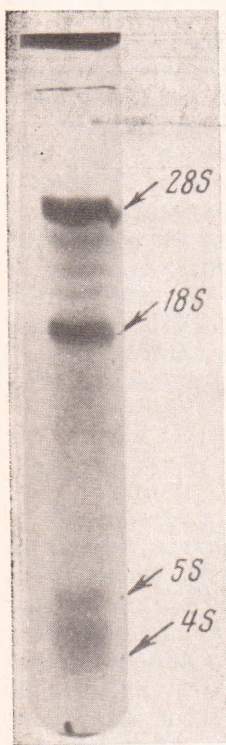


Рис. 1. 2,8% полиакриламидный гель. Разделение рРНК

бы инкубировали при 37° 18 час., затем клетки отмывали физиологическим раствором. Из отмывых клеток выделяли РНК по методу Клайна (6). Выход РНК составлял 50–70%. 28 S рРНК и 18 S рРНК получали электрофоретическим разделением на 2,8% полиакриламидном геле (80 в, 2 часа, 2°). Полосы РНК на фиксированных столбиках геля выявляли окрашиванием 0,2% раствором метиленового синего (рис. 1).

Полосы геля с 28 S и 18 S рРНК вырезали и разрушали в стеклянном гомогенизаторе. Частицы геля заливали 3 мл 1,0 M NH₄OH и оставляли на 2 часа при 37° для гидролиза РНК. Затем взвесь встряхивали 30 мин., и частицы геля отделяли центрифугированием, а гидролиз продолжали еще 24 часа с целью получения щелочестойких олигонуклеотидов. Полученный гидролизат подкисляли HClO₄ до pH 5, прибавляли кислую фосфатазу из пшеничных отрубей фирмы «Реанал» до 0,5% концентрации и инкубировали 18–20 час. при 37°. После фосфатазной обработки раствор, содержащий нуклеозиды и щелочестойкие олигонуклеозидфосфаты, метилированные по рибозе, закисляли до pH 1–2 и встряхивали с равным объемом хлороформа 20 мин. для удаления фосфатазы. После центрифугирования водную фазу отсасывали и нейтрализовали. Нейтрализованный раствор наносили на колонку с анионитом AGI-x8 200–400 меш CI⁻, (1×3). Фракцию нуклеозидов элюировали 100 мл воды, фракцию олигонуклеозидфосфатов элюировали 75 мл 0,1 M HCl (рис. 2). Элюаты высушивали в потоке теплого воздуха. Радиоактивность полученных препаратов измеряли в диоксановом сцинтилляторе на «Nuclear Chicago Mark-1».

Табл. 1 показывает, что содержание метки в щелочестойкой олигонуклеотидной фракции щелочного гидролизата 18 S и 28 S рРНК из лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом в среднем составляет около 10% от активности суммы нуклеотиды + олигонуклеотиды. При этом уровень метилирования щелочестойких олигонуклеотидов 28 S рРНК у 3 больных из 4 был выше, чем уровень метилирования олигонуклеотидов 18 S рРНК. В лимфоцитах доноров включение в щелочестойкие олигонуклеотиды 18 S рРНК в среднем составляет 25% активности суммы нуклеотиды + олигонуклеотиды и, напротив, во всех 3 случаях меньше в 28 S рРНК, чем включение в эту же фракцию в 18 S рРНК. Абсолютные цифры включения метки в щелочестойкую олигонуклеотидную фракцию также показывают, что уровень 2'-О-метилирования 18 S и 28 S рРНК в лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом в несколько раз меньше, чем в лимфоцитах доноров.

Не исключена возможность, что это абсолютное и относительное снижение 2'-О-метилирования рРНК лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом обуславливает большую атакуемость РНКазой или определенную конформационную дефектность, нарушающую нормальный синтез белка. Приводятся данные, которые показывают, что появление резистентного штамма у золотистого стафилококка определяется исчезновением N⁶-диметиладенина в 23 S рРНК и потерей способности 50 S субъединицы связывать антибиотик (7). Изучению метилирования

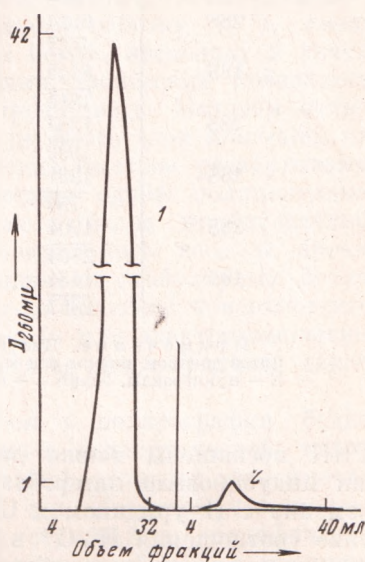


Рис. 2. Разделение на фракции щелочного гидролизата РНК после обработки его фосфатазой. 1 — мононуклеотиды (95,5%), 2 — динуклеотиды (4,5%)

Таблица 1

Включение C^{14} -(метил)-метионина в нуклеотиды и олигонуклеотиды 28S и 18S рРНК лимфоцитов доноров и больных хроническим лимфолейкозом (х.л.л)

Компоненты рРНК	N + NmpN...	Нуклеотиды		Олигонуклеотиды	
	имп/мин	имп/мин	%	имп/мин	%
28S	—	—	—	—	—
	1190	1022	87,0	158	13,0
18S	—	—	—	—	—
	957	871	91,0	86	9,0
28S	6924	5040	73,0	1884	27,0
	2647	2353	89,0	294	11,0
18S	8145	3934	48,0	4211	52,0
	1815	1604	97,0	112	6,0
28S	1237	967	78,0	270	22,0
	599	543	90,5	56	9,0
18S	1231	799	65,0	432	35,0
	754	704	93,5	50	6,5
28S	1904	1502	79,0	402	21,0
	2194	1990	90,5	204	9,5
18S	1434	2080	75,0	354	25,0
	2357	2037	88,5	270	11,5

Примечание. Цифры над чертой — данные для нуклеотидов лимфоцитов доноров, цифры под чертой — для нуклеотидов лимфоцитов больных. N — нуклеозиды, NmpN... — олигонуклеозидфосфаты.

рРНК посвящены также два сообщения Торелли и соавторов (⁸, ⁹). Они инкубировали лимфоблаты больных острым лимфолейкозом одновременно с H^3 -уридином и C^{14} -(метил)-метионином и наблюдали увеличение соотношения H^3/C^{14} в 45S рРНК, видимо, по той причине, что метилирование и дальнейшее превращение 45S рРНК (процессинг) происходили с очень низкой скоростью. Возможно, недометилирование 45S рРНК-предшественника ведет к замедлению его превращения в зрелые молекулы 28S и 18S рРНК.

Поскольку результаты наших исследований также позволили выявить различия в метилировании рРНК в лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом, а работы Купера свидетельствуют о связи процессов биосинтеза 28S и 18S рРНК с регуляцией деления и дифференцировки лимфоцитов, то дальнейшее изучение особенностей метилирования рРНК, на наш взгляд, весьма перспективно.

Центральный институт гематологии
и переливания крови
Москва

Поступило
10 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. L. Cooper, J. Biol. Chem., 244, № 7, 1946 (1969). ² H. L. Cooper, J. Biol. Chem., 244, № 20, 5590 (1969). ³ J. L. Staar, B. H. Sells, Physiol. Rev., 49, № 3, 623 (1969). ⁴ J. Norton, J. S. Roth, J. Biol. Chem., 242, № 9, 2029 (1967). ⁵ Г. И. Козинец, В. В. Альперович, Н. Н. Талеленова, Лаб. дело, № 7, 389 (1971). ⁶ M. J. Cline, J. Lab. Clin. Med., 68, № 1 (1966). ⁷ C. J. Lai, B. Weissblum, Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68, № 4, 856 (1971). ⁸ U. L. Torelli, G. M. Torelli et al., Nature, 226, № 5251, 1163 (1970). ⁹ U. L. Torelli, G. M. Torelli et al., Acta haematol., 45, № 3, 201 (1971). ¹⁰ H. L. Cooper, Nature, № 5263, 1105 (1970). ¹¹ H. L. Cooper, E. M. Gibson, J. Biol. Chem., 246, № 16, 5059 (1971).