

Е. В. БРЫКИНА, О. В. ПОДОБЕД, В. Л. ЛЕЙТИН, М. И. ЛЕРМАН

ОСВОБОЖДЕНИЕ мРНК В ФОРМЕ мРНИ ПРИ ДИССОЦИАЦИИ ПОЛИРИБОСОМ ПОЛИВИНИЛСУЛЬФАТОМ И ПУРОМИЦИНОМ

(Представлено академиком А. А. Баевым 26 XII 1972)

При диссоциации полирибосом с помощью хелирующих агентов, например, ЭДТА (¹, ²) образуются свободные полирибосомные субчастицы и молекулы мРНК в форме рибонуклеопротеидов (мРНИ).

Было постулировано (², ³), что эти белки связаны с мРНК в нативном полирибосомном комплексе и принимают участие в регуляции трансляции.

Однако нами было показано (⁴), что при диссоциации полирибосом с помощью ЭДТА из полирибосомного комплекса освобождаются белки, способные взаимодействовать с добавляемой извне мРНК с образованием стабильных мРНИ, и что, следовательно, в этих условиях диссоциации, когда происходит депротенинизация рибосомных субчастиц (⁵), нельзя получить точную информацию о количестве и природе белков, связанных с мРНК в нативных полирибосомах. Более того, было показано (⁶), что при получении полирибосомной РНК с помощью обычной фенольной депротенинизации некоторые структурные белки рибосом образуют прочные комплексы с поли А участком мРНК.

Таким образом, в настоящее время остается неясным, действительно ли мРНК в полирибосомном комплексе связана с белками, каковы число и природа этих белков и какую роль в трансляции они выполняют.

Для решения этого вопроса необходимо выяснить в какой форме высвобождаются мРНК при других способах диссоциации полирибосом, с какими участками мРНК связаны эти белки и какова стабильность мРНИ к различным воздействиям, способным диссоциировать белки от рибосомных субчастиц.

В данной работе мы исследовали продукты, возникающие при диссоциации полирибосом с помощью 0,5М КСl (²), при совместном действии пуromицина и 0,5М КСl (⁸) и с помощью поливинилсульфата (ПВС) (⁹). Для первых двух приемов характерно образование биологически активных 40S- и 60S-субчастиц и практически полная диссоциация полирибосом. В работах было показано, что поливинилсульфат диссоциирует рибосомы на субчастицы (⁹) с коэффициентами седиментации, меньшими чем 40S и 60S (последнее указывает на частичную депротенинизацию субчастиц, или на их денатурацию). Мы подробно исследовали эффект ПВС на полирибосомы, имея в виду и чисто прикладную задачу, а именно, найти такие условия диссоциации, при которых происходила бы преимущественная депротенинизация мРНИ, что позволило бы отделить мРНК от рибосомных субчастиц. Несмотря на создание методов выделения мРНК, основанных на наличии поли А участков в ее составе (¹¹⁻¹³), проблему получения мРНК нельзя считать решенной, поскольку существуют классы мРНК, не содержащие поли А (¹⁴).

Все опыты проводили на самцах крыс весом 150—160 г, голодавших 24 часа. Для избирательного мечения мРНК внутрибрюшинно вводили актинномицин Д (из расчета 0,2 мг на 1 кг веса животного) и через 2 часа после введения меченого предшественника РНК животных забивали и из печени выделяли все рибонуклеопротеидные частицы цитоплазмы методом

осаждения их в среде с высоким содержанием ионов Mg^{2+} (15). Из осадка получали полирибосомы как описано в работе (19) при концентрации ионов Mg^{2+} 0,001 M. Осадки полирибосом хранили при -30° . Анализ в градиенте сахарозы и градиенте плотности CsCl проводили как описано ранее (16).

Диссоциацию полирибосом с помощью пуромидина проводили по методике Влобеля (8).

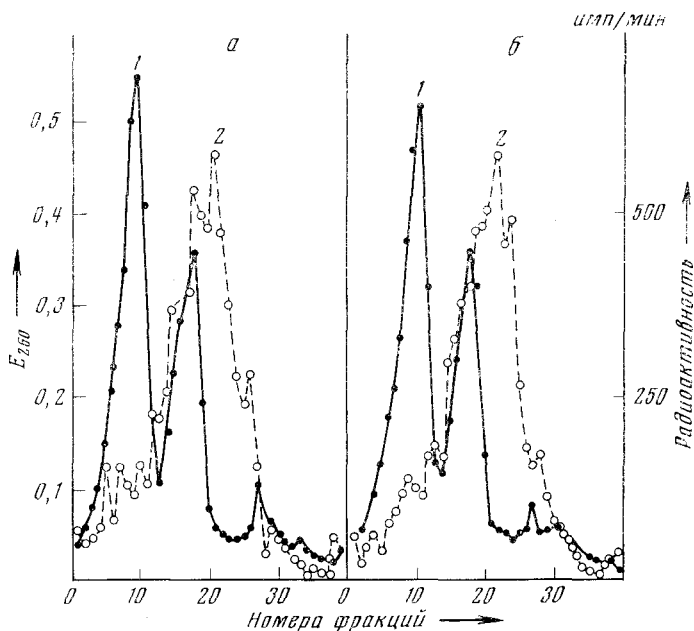


Рис. 1. Седиментационный анализ рНК, выделенных из полирибосом, обработанных и необработанных ПВС. *а* — рНК контрольных полирибосом; *б* — рНК полирибосом, обработанных ПВС (4 мг/мл) в 0,01 M трис-буфере, 0,1 M NaCl, 5 мин. в ледяной бане. 1 — профиль у-ф. поглощения при 260 мμ, 2 — профиль радиоактивности

В первой серии опытов методом аналитического центрифугирования определяли полноту диссоциации полирибосом под действием различных концентраций ПВС. Было установлено, что при концентрации ПВС 4 мг/мл наступает полная диссоциация полирибосом и образуются субчастицы с коэффициентами седиментации, близкими к 40S и 60S. При концентрации ПВС 0,4 мг/мл диссоциации полирибосом не происходило, а при более высоких концентрациях ПВС наблюдалась ступенчатая депротенизация рибосомных субчастиц вплоть до образования свободных рибосомных рНК с коэффициентами седиментации 18S и 28S.

Чтобы исключить наличие деградации рРНК и мРНК под действием ПВС, исследовали их седиментационное распределение в сахарозном градиенте (16). На рис. 1 видно, что ПВС не вызывает деградации полирибосомных рНК.

На рис. 2а представлено седиментационное распределение в сахарозном градиенте продуктов диссоциации полирибосом под действием ПВС в концентрации 4 мг/мл. Видно, что мРНК седиментирует преимущественно в зоне рибосомных субчастиц и, следовательно, не освобождается в свободном состоянии. Анализ плотностного распределения продуктов диссоциации в градиенте CsCl (рис. 2б) подтверждает этот вывод. Сходные относительные распределения получены и для более высоких концентраций ПВС. Итак, ни в одном случае не происходило преимущественной депротенизации мРНК по сравнению с рибосомными субчастицами. Следовательно, оба класса рНП — рибосомные субчастицы и мРНК — в одинаковой степени нестабильны при действии депротенизирующих концентраций ПВС.

Поскольку при диссоциации полирибосом с помощью ЭДТА образуются денатурированные рибосомные субчастицы крайне чувствительные к депротенизирующим агентам (17), мы исследовали действие ПВС на продукты диссоциации, возникающие при действии ЭДТА на полирибосомы. Из представленных данных (рис. 3б) видно, что, во-первых, ЭДТА-субчастицы чувствительны к ПВС и в значительной степени депротенизируются; во-вторых, в этих условиях депротенизируется и мРНК. Последнее об-

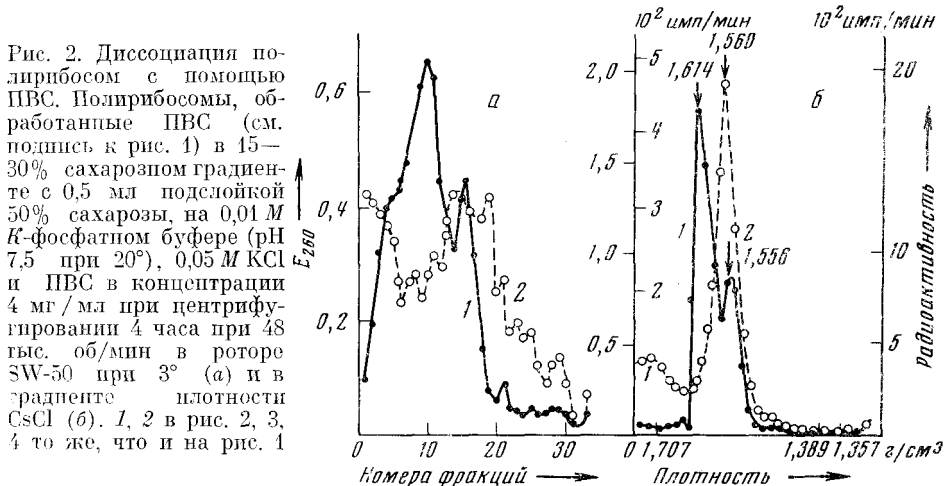
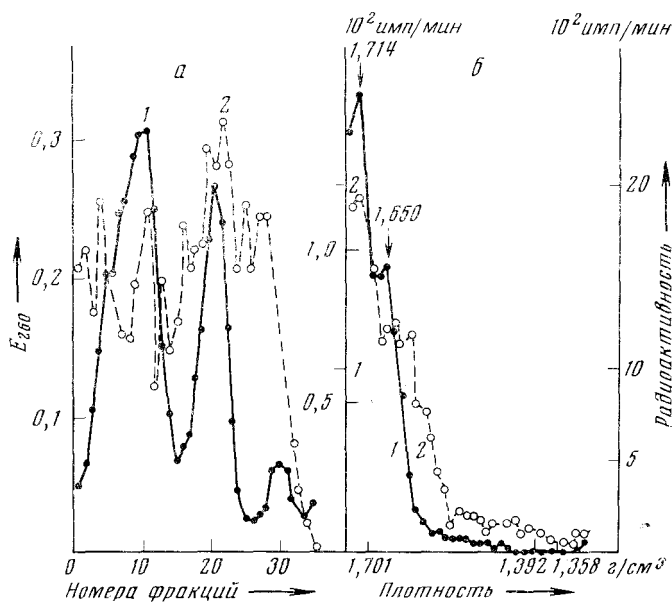


Рис. 3. Совместное действие ЭДТА и ПВС на полирибосомы. Полирибосомы инкубировали в ледяной бане с 2 мМ ЭДТА на 1 мг полирибосом и затем 5 мин. с ПВС (в конечной концентрации 4 мг/мл). а — сахарозный градиент см. подпись к рис. 2, б — градиент плотности CsCl



стоятельство представляется очень интересным, оно показывает, что мРНК, возникающий при диссоциации полирибосом с помощью ЭДТА, разрушается при действии небольших концентраций ПВС, т. е. в условиях, когда при действии ПВС на полирибосомы, из последних освобождается мРНК. Можно предположить, что состав и структура мРНК, возникающих при действии ЭДТА и при действии ПВС, различаются. Следует также подчеркнуть, что и в этих условиях воздействие ПВС на полирибосомы не привело к преимущественной депротенизации рибосом.

Во второй части работы исследовали диссоциацию полирибосом с помощью пуромидина в высокой ионной силе. Вопрос о том, в какой форме освобождается в этих условиях мРНК, оставался спорным. Первоначальные данные об освобождении свободной 9S-мРНК⁽¹⁰⁾ при диссоциации полирибосом ретикулоцитов оказались ошибочными⁽¹⁸⁾.

В нашей работе, которая была закончена до публикации этих данных, представлены следующие результаты: при действии только высокой ионной силы (рис. 4а) диссоциирует примерно 60% полирибосом. При добавочном

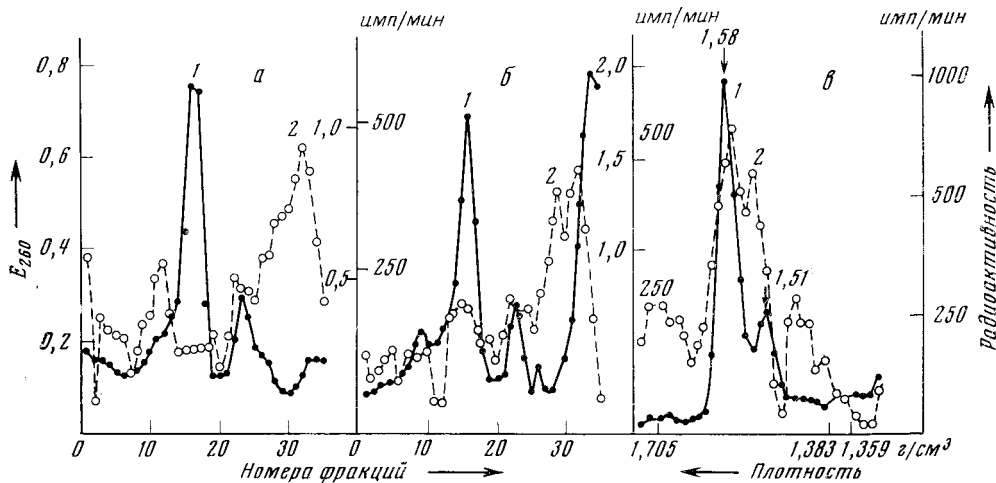


Рис. 4. Диссоциация полирибосом пуромидином в высокой ионной силе. На 15–30% сахарозный градиент, притовленный на 0,05 М ТЭА (триэтанолламин-буфер) pH 7,5 0,5 М KCl, 0,001% ПВС, насаивали: а — полирибосомы в 0,05 М ТЭА, pH 7,5, 0,5 М KCl и 0,001 М MgCl₂; б — те же полирибосомы, обработанные пуромидином; в — полирибосомы, обработанные пуромидином, в градиенте плотности CsCl. а, б — центрифугирование см. подпись к рис. 2

действию пуромидина (рис. 4б) диссоциирует 90% полирибосом. В этих условиях лишь 20–25% мРНК седиментирует в сахарозном градиенте медленнее, чем рибосомные субчастицы и может быть отделена от них. Результаты анализа продуктов диссоциации полирибосом под действием пуромидина в градиенте плотности CsCl (рис. 4в) также указывают, что мРНК и здесь высвобождаются в форме рибонуклеопротеидов.

Поскольку при различных способах диссоциации полирибосом, приводящих к образованию нативных 40S- и 60S-субчастиц, мРНК освобождается в форме мРНК, мы склонны допустить, что по крайней мере часть белков связано с мРНК в полирибосомном комплексе до диссоциации и, возможно, участвует в регуляции трансляции. Вероятно, что эти белки связаны со служебными последовательностями мРНК.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступила
20 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- R. P. Perry, D. E. Kelley, J. Mol. Biol., 35, 37 (1968).
- E. C. Henshaw, J. Mol. Biol., 36, 401 (1968).
- A. S. Spirin, Europ. J. Biochem., 13, 1 (1970).
- V. L. Leytin, O. V. Podobed, M. J. Lerman, J. Mol. Biol., 51, 727 (1970).
- A. Lamfrom, E. Gewacki, J. Mol. Biol., 11, 149 (1965).
- R. P. Perry, J. La Torre et al., Biochim. et Biophys. acta, 262, 220 (1972).
- R. Miller, R. S. Schweet, Arch. Biochem. and Biophys., 125, 531 (1968).
- G. Blobel, D. Sabatini, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 390 (1971).
- B. F. Vanyuchin, D. B. Dunn, Biochim. et Biophys. acta, 134, 91 (1967).
- G. Blobel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 832 (1971).
- J. Mendelick, Se Long Lee, G. Brawerman, Biochemistry, 11, 792 (1972).
- R. Sheldon, C. Jurale, J. Kates, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 417 (1972).
- H. Nakazato, M. Edmonds, J. Biol. Chem., 247, 3365 (1972).
- M. Adesnik, J. Darnell, J. Mol. Biol., 67, 397 (1972).
- B. Л. Лейтин, М. И. Лерман, Биохимия, 34, 839 (1969).
- B. Л. Лейтин, О. В. Подобед, М. И. Лерман, Биохимия, 37, 65 (1972).
- S. Olsnes, FEBS Letters, 7, 211 (1970).
- G. Blobel, Biochem. and Biophys. Res. Commun., 47, 87 (1972).
- F. O. Wettstein, T. Stachelin, H. Noll, Nature, 197, 430 (1963).