

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

А. А. ПРЕОБРАЖЕНСКИЙ, Л. П. ОВЧИННИКОВ

РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ФАКТОР ЭКСТРАКТОВ РЕТИКУЛОЦИТОВ КРОЛИКА. ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 X 1973)

В цитоплазматических экстрактах печени крысы (¹) и клеток HeLa (²) был обнаружен фактор, взаимодействующий с экзогенной РНК с образованием комплексов, необратимо сорбирующихся на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах. Этот РНК-связывающий фактор представляет собой вещество белковой природы (²⁻⁴). РНК-связывающий белковый фактор цитоплазматического экстракта печени крысы имеет коэффициент седиментации около 9 единиц Сведберга. Фракционирование на ионообменных целлюлозах (КМ и ДЭАЭ) выявляет его гетерогенность по заряду белковых молекул: этот фактор разделяется на две дискретные фракции — кислую (белок I) и слабо основную (белок II), имеющие одинаковые седиментационные коэффициенты (около 9 единиц Сведберга) (^{3, 4}).

При взаимодействии РНК-связывающего белка цитоплазматического экстракта печени крысы с РНК образуются информосомоподобные частицы — стехиометрические РНК-белковые комплексы с соотношением РНК : белок 1 : 3 (^{1, 5, 6}). Для образования информосомоподобных частиц нужны обе фракции РНК-связывающего белка печени крысы. При смешивании РНК с белком I или белком II по отдельности информосомоподобные частицы не образуются (^{3, 5}).

Образование информосомоподобных частиц с экзогенными РНК наблюдали в цитоплазматических экстрактах ряда других животных объектов: клеток зародышей выюна (⁷), клеток HeLa (^{2, 8}), клеток HeLa, зараженных вирусом осповакцины (⁴), и клеток асцитной карциномы Эрлиха (⁴).

В настоящей работе мы показали, что в экстракте ретикулоцитов кролика присутствует РНК-связывающий фактор предположительно белковой природы. Он гомогенен по данным ионообменной хроматографии на КМ- и ДЭАЭ-целлюлозах. При центрифугировании экстракта в сахарозном градиенте РНК-связывающий фактор седиментирует со скоростью 6–7 S. После гель-хроматографии экстракта РНК-связывающая активность обнаруживается в составе двух компонентов с коэффициентами седиментации около 19 S и 9 S, что, очевидно, связано с агрегацией РНК-связывающего фактора во время фракционирования. При смешивании экзогенной РНК с нерасфракционированным экстрактом или с частично очищенным РНК-связывающим фактором образуются информосомоподобные частицы с плавучей плотностью в CsCl около 1,4 г/см³.

В работе использовали обычную методику получения ретикулоцитов — ежедневной подкожной инъекцией 2,5% раствора солянокислого фенилгидразина. Кровь брали на 8 день. Клетки осаждали центрифугированием на холоду и после двух промывок физиологическим раствором лизировали в равном объеме холодной воды. Лизат центрифугировали на низкой скорости для удаления обломков клеток и затем на высокой — для удаления рибосом. Полученный безрибосомный экстракт использовали во всех последующих экспериментах. В первом опыте такой безрибосомный экстракт фракционировали центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы, приготовленном на буфере с pH 7,8, содержащем 0,01 M триэтанол-

амин, 0,01 M KCl, 0,001 M MgCl₂ и 0,001 M β-меркаптоэтанол (стандартный буфер). После центрифугирования в каждой фракции градиента измеряли поглощение при 410 мμ (максимум поглощения гемоглобина), а также способность материала фракций задерживать экзогенную РНК (рРНК *Escherichia coli*) на нитроцеллюлозном фильтре — РНК-связывающую активность⁽⁴⁾. Как видно из рис. 1А, после центрифугирования большая часть РНК-связывающей активности экстракта распределяется в виде одного компонента, седиментирующего быстрее гемоглобина. Если

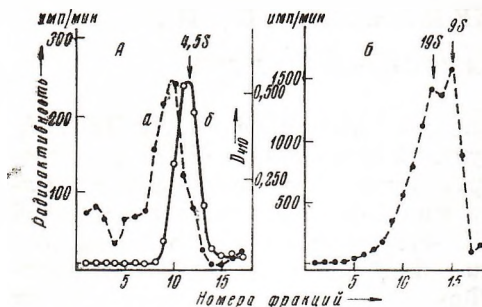


Рис. 1

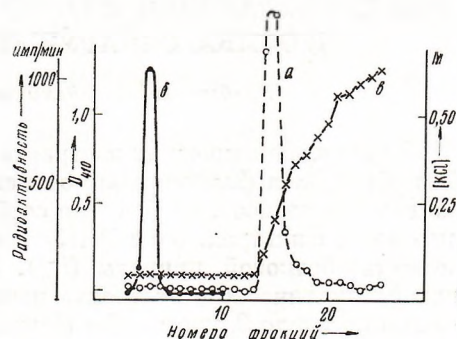


Рис. 2

Рис. 1. Седиментационное распределение РНК-связывающего фактора ретикулоцитов кролика. А — центрифугирование безрибосомного экстракта в градиенте концентрации сахарозы: а — РНК-связывающая активность, б — оптическое поглощение при 410 мμ; Б — центрифугирование РНК-связывающего фактора после фракционирования на колонке с сефадексом G-200. Реперами для определения коэффициентов седиментации служили субчастицы рибосом *E. coli* (30 S и 50 S) и каталаза (11 S), седиментировавшие в параллельной центрифужной пробирке

Рис. 2. Хроматография безрибосомного экстракта ретикулоцитов кролика на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Хроматографию вели в тех же условиях, которые были использованы ранее для хроматографии РНК-связывающего фактора крысы⁽⁴⁾. а — РНК-связывающая активность, б — оптическое поглощение, в — концентрация KCl

принять коэффициент седиментации гемоглобина равным 4,5 S, то коэффициент седиментации РНК-связывающего фактора окажется равным приблизительно 6—7 S. Для глобулярных белков такому коэффициенту седиментации соответствует молекулярный вес около 100 000—120 000 дальтон.

В следующем опыте экстракт хроматографировали на колонке с сефадексом G-200, уравновешенной стандартным буфером. Оказалось, что РНК-связывающий фактор не задерживается в гранулах геля и элюируется с колонки сразу же вслед за свободным объемом. После концентрирования осаждением при pH 5 и центрифугирования в сахарозном градиенте материала с колонки, обладающего РНК-связывающей активностью, эта активность обнаруживается в составе двух компонентов с коэффициентами седиментации около 19 и 9 S (рис. 1Б). Следует отметить, что компонент 19 S наблюдается всегда, в то время как компонент 9 S в ряде наших опытов отсутствовал. По всей вероятности, 19 S и 9 S компоненты образуются вследствие агрегации молекул РНК-связывающего фактора с коэффициентом седиментации 6—7 S во время гель-хроматографии.

Чтобы получить сведения о заряде молекул РНК-связывающего фактора ретикулоцитов, была проведена хроматография экстракта на колонках с ионообменными целлюлозами (КМ и ДЭАЭ). Мы установили, что РНК-связывающий фактор не задерживается на колонке с КМ-целлюлозой, уравновешенной стандартным буфером. На колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (рис. 2) РНК-связывающий фактор полностью сорбируется и элюируется затем при слабом повышении концентрации KCl (до 0,1—0,2 M) в

виде одного гомогенного компонента. Известно, что общим свойством РНК-связывающих белков является их способность образовывать с экзогенными РНК информосомоподобные частицы. Чтобы получить информосомоподобные частицы, к 0,5 μg ^{23}S C^{14} -рРНК *E. coli* добавили такое количество безрибосомного экстракта, которое способно вызвать связывание на фильтре 100 μg этой же РНК. Смесь инкубировали при 0° в течение 30 мин., затем фиксировали, добавив формальдегид до конечной концентрации 8%. Как видно из рис. 3А, в экстракте ретикулоцитов в этом случае

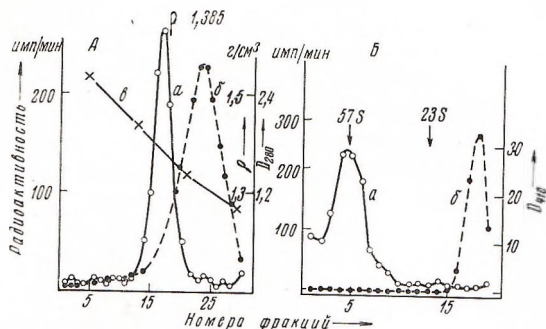
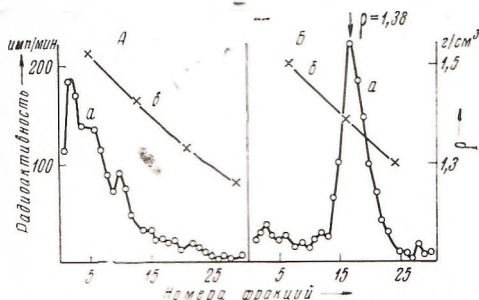


Рис. 3. Плотностное (А) и седиментационное (Б) распределение информосомоподобных частиц, образующихся в безрибосомном экстракте ретикулоцитов кролика. А — препарат центрифугировали в градиенте плотности CsCl до равновесия, как подробно описано ранее (⁹); Б — тот же препарат центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы. Репером для определения коэффициента седиментации частиц служили 50 S субчастицы рибосом *E. coli*, седиментировавшие в параллельной центрифужной пробирке. а — радиоактивность, б — оптическое поглощение, в — плотность раствора CsCl

образуются типичные стехиометрические комплексы с плавучей плотностью в CsCl около 1,4 г/см³ (рис. 3А). Такая величина плотности рибонуклеопротеидных частиц соответствует отношению РНК: белок в составе частиц, равному 1:3 (¹⁰). Параллельно мы провели центрифугирование такого препарата в градиенте концентрации сахарозы. На рис. 3Б видно, что вся радиоактивная РНК обнаруживается в комплексах с коэффициентом седиментации около 57 S, т.е. в комплексе с коэффициентом седи-

Рис. 4. Плотностное распределение частиц, полученных при смешивании ^{23}S C^{14} -рРНК *E. coli* с частично очищенным РНК-связывающим фактором ретикулоцитов кролика. А — инкубация при 0° в течение 30 мин.; Б — инкубация 13 мин. при 0° , 15 мин. при 37° и охлаждение в течение 2 мин. а — радиоактивность, б — плотность раствора CsCl



ментации, в 2,5 раза превышающем коэффициент седиментации использованной РНК. Если смешать с тем же количеством РНК меньшее количество экстракта, образуются недоукомплектованные белком частицы с большей величиной плавучей плотности.

В следующих опытах мы установили, что при очистке РНК-связывающего фактора ретикулоцитов теряется его способность образовывать с РНК информосомоподобные частицы при отношении РНК-связывающей активности к добавленной РНК, оптимальном для нерасфракционированного безрибосомного экстракта. На рис. 4А дано плотностное распределение недоукомплектованных белком частиц, которые образуются при 0° после очистки

РНК-связывающего фактора на сефадексе G-200 и затем на ДЭАЭ-целлюлозе. В этом опыте отношение РНК-связывающей активности к РНК в смеси было в 2,2 раза больше отношения, оптимального для экстракта. Если эту смесь прогреть при 37° в течение 15 мин., образуются нормальные информосомоподобные частицы (рис. 4Б). Неактивное состояние РНК-связывающего фактора в реакции образования информосомоподобных частиц коррелирует с его переходом в форму 19 S или 19 S и 9 S. Однако происходит ли во время инкубации при 37° восстановление исходной структуры с коэффициентом седиментации 6,5 S, пока неясно. Судя по хроматографическому поведению на ионообменных целлюлозах, а также по плавучей плотности комплексов с РНК, РНК-связывающий фактор, обнаруженный в экстракте ретикулоцитов кролика, имеет, скорее всего, белковую природу. Возможно, этот РНК-связывающий фактор аналогичен кислой фракции РНК-связывающего белка печени крысы (белок I) (³, ⁴). В ретикулоцитах млекопитающих, в отличие от большинства других животных клеток, нет ядра и нет синтеза новых РНК. Обнаружение РНК-связывающего белка в безъядерных клетках свидетельствует о том, что если РНК-связывающие белки и принимают участие в транспорте РНК из ядра в цитоплазму, то вряд ли это их единственная функция.

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

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
16 X 1973

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. П. Овчинников, А. С. Воронина и др., Молек. биол., 2, 752 (1968).
- ² D. Baltimore, A. S. Huang, J. Mol. Biol., 47, 263 (1970). ³ A. S. Степанов, A. S. Voronina et al., FEBS Letters, 18, 13 (1971). ⁴ А. С. Степанов, А. С. Воронина и др., Биохимия, 37, 3 (1972). ⁵ А. С. Воронина, А. С. Степанов, Л. П. Овчинников, Биохимия, 37, 10 (1972). ⁶ А. С. Воронина, А. С. Степанов и др., Биохимия, 37, 430 (1972). ⁷ Л. П. Овчинников, А. Ц. Аванесов, Молек. биол., 3, 893 (1969). ⁸ M. Girard, D. Baltimore, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 999 (1966). ⁹ Н. В. Белицина, Л. П. Овчинников и др., Молек. биол., 2, 727 (1968). ¹⁰ Л. П. Овчинников, М. А. Айтхожин и др., Молек. биол., 3, 449 (1969).