

УДК 578.083

БИОХИМИЯ

Е. Г. РОЗЕТ, Н. И. ТЕТЕРЕВ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, Н. Г. ШУППЕ

ОСВОБОЖДЕНИЕ НОВООБРАЗОВАННОЙ РНК ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР НОРМАЛЬНОЙ И РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком А. А. Баевым 14 III 1974)

В литературе описано большое количество фактов, свидетельствующих об избирательности транспорта РНК из ядра в цитоплазму (¹, ²). Механизмы отбора РНК внутри ядра неизвестны, предполагается, что в этом могут участвовать ядерная мембрана и цитоплазматические факторы (³, ⁴). Показано, что избирательность транспорта РНК нарушается в малигнизированных тканях и в клетках печени крыс после частичной гепатэктомии; при этом в цитоплазме таких клеток обнаруживаются почти все типы РНК, синтезирующиеся в ядре, в то время как в нормальных клетках значительная часть ядерной РНК никогда не попадает в цитоплазму (⁴, ⁵). В настоящей работе для сравнительного изучения транспорта новообразованной РНК в клетках нормальной и регенерирующей печени мы использовали бесклеточную систему, в которой выход РНК из изолированных ядер зависит от присутствия АТФ и АТФ-регенерирующей системы и регулируется ионным составом инкубационной среды (⁶, ⁷).

Объектом исследования служили изолированные ядра печени нормальных крыс и крыс, взятых через 19 час. после частичной гепатэктомии (удаления ²/₃ печени). За 40 мин. до опыта животным вводили внутривенно ¹⁴С-оротовую кислоту в дозе 6 мкС на 100 г веса. Выделение ядер проводили по методу Пого (⁸). Выход новообразованной РНК из ядер изучали в инкубационной среде, содержащей следующие компоненты: ядерную суспензию 200–300 мкг ДНК, АТФ 2 мМ, креатинфосфат 5 мМ, креатинфосфокиназу 0,03 мг, дитиотреитол 2,5 мМ, сахарозу 0,5 М, KCl 0,025 М, MgCl₂ 0,005 М, трис-HCl-буфер pH 7,6 0,05 М и 0,5 объема

Таблица 1

Характеристика выхода новообразованной РНК из изолированных ядер нормальной и регенерирующей печени в бесклеточной системе (% от исходной радиоактивности ядер) *

Условия реакции	Нормальная печень		Регенерирующая печень	
	кислотонерастворимая фракция	кислоторастворимая фракция	кислотонерастворимая фракция	кислоторастворимая фракция
Полная система, 30°, 15 мин.	8,7	3,6	5,8	2,6
Без АТФ и АТФ-регенерирующей системы	2,2	1,1	1,6	2,0
Полная система, 0°, 15 мин.	1,1	0,9	1,3	1,5
+ спермидин 5мМ	1,7	1,6	1,6	—
+ MgCl ₂ 10мМ	3,5	—	2,0	—

* Исходная радиоактивность ядер в инкубационной пробе составляла для ядер из нормальной печени 29 800 имп/мин, для ядер из регенерирующей печени 81 300 имп/мин.

Таблица 2

Нуклеотидный состав новообразованной РНК в ядрах и освобождающейся фракции из нормальной и регенерирующей печени

Источник РНК	Молярное отношение (% от суммы)				$\frac{\Gamma + \Pi}{\Lambda + \Upsilon}$
	Ц	А	Г	У	
Нативные ядра из нормальной печени	25,56	23,27	27,10	24,02	1,11
Нативные ядра из регенерирующей печени	26,82	20,61	32,30	20,63	1,42
РНК, освобождающаяся из ядер нормальной печени					
инкубация 15 мин.	23,60	27,04	22,60	27,09	0,85
» 30 мин.	23,35	26,43	21,30	28,25	0,82
» 60 мин.	24,89	23,08	26,49	25,52	1,06
РНК, освобождающаяся из ядер регенерирующей печени					
инкубация 15 мин.	23,34	26,26	22,23	28,15	0,84
» 30 мин.	24,40	26,89	22,75	25,90	0,89
» 60 мин.	24,87	25,51	23,54	25,88	0,94
РНК, освобождающаяся					
после 15 мин. инкубации	26,61	24,42	25,18	23,89	1,08
после 30 мин. инкубации	26,80	22,17	27,78	23,01	1,216

постмикросомальной диализованной фракции, полученной после центрифугирования гомогената (1:3) нормальной или регенерирующей печени 2 часа при 105 000 g и диализа в течение 18 час. Пробы инкубировали 15 мин. при 30°; реакцию останавливали охлаждением проб до 0° и ядра отделяли двукратным центрифугированием 10 мин. при 800 g. Освобождающуюся из ядер фракцию разделяли на кислоторастворимую и кислотонерастворимую части и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике «Intertechnique» (Франция). Анализ освобождающегося материала проводили с помощью ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы. Нуклеотидный состав РНК определяли методом электрофореза на бумаге нуклеотидов после гидролиза РНК, меченной ^{32}P -ортофосфатом, в 0,5 N КОН 16 час.

Как видно из табл. 1, выход РНК из ядер как нормальной, так и регенерирующей печени зависит от присутствия АТФ и АТФ-регенерирующей системы, происходит только при повышении температуры и подавляется высокими концентрациями ионов Mg^{2+} , а также в присутствии спермидина. Выход радиоактивного материала из ядер не связан с их разрушением в процессе инкубации, так как количество ядер в инкубационной пробе до и после инкубации при 30° не менялось. Кроме того, при увеличении времени инкубации ядер без АТФ и АТФ-регенерирующей системы до 60 мин. выход РНК увеличивался незначительно по сравнению с полной системой.

Несмотря на то, что удельная активность РНК в ядрах регенерирующей печени почти втрое превышает активность ядерной РНК нормальной печени, величина выхода РНК из ядер регенерирующей печени, выраженная в процентах от исходной радиоактивности ядер в инкубационной пробе, значительно ниже, чем та же величина для ядер из нормальной печени (табл. 1). Это различие можно объяснить следующим образом. Известно, что в регенерирующей печени скорость синтеза предшественников рибосомальных РНК намного выше, чем в нормальной печени⁽⁹⁾, и повышение удельной активности ядерной РНК регенерирующей печени происходит в основном за счет большего включения метки в предшественники рРНК. Об этом свидетельствуют также данные по определению нуклеотидного состава новообразованной РНК ядер, который значительно отличается в нормальной и регенерирующей печени (табл. 2). В то же время в исполь-

зованной нами бесклеточной системе в первые 15 мин. инкубации ядер обнаруживается выход РНК, имеющих ДНК-подобный нуклеотидный состав, сходный для ядер из нормальной и регенерирующей печени

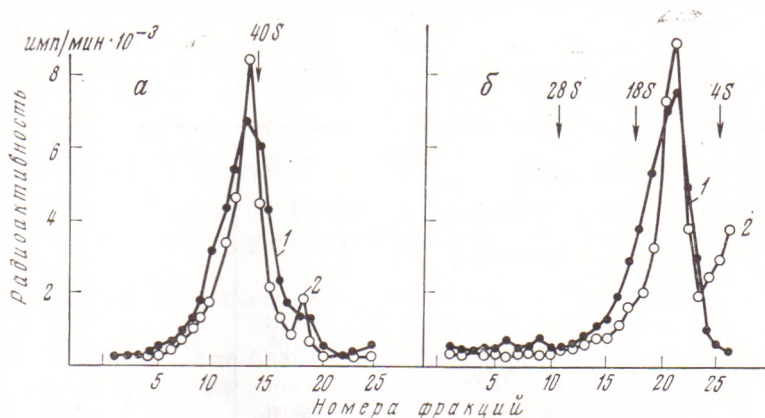


Рис. 1. Седиментационная характеристика радиоактивного материала (а), выходящего из ядер нормальной (1) и регенерирующей (2) печени, и РНК, выделенной из этих фракций (б)

(табл. 2). В связи с этим меньшее процентное значение выхода РНК из ядер регенерирующей печени обусловлено более высоким уровнем метки в нетранспортирующихся предшественниках рРНК в ядрах регенерирующей печени по сравнению с нормальной. Как уже отмечалось, в первые 15 мин.

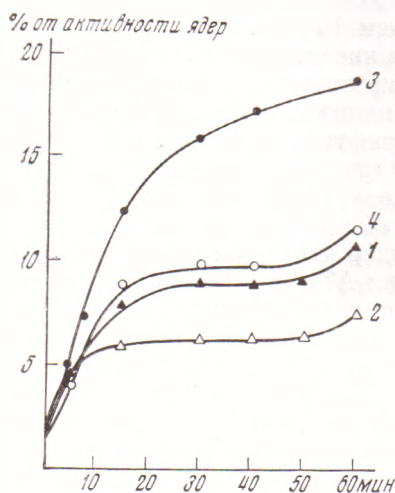


Рис. 2. Кинетика выхода новообразованной РНК из ядер нормальной (1, 3) и регенерирующей (2, 4) печени в присутствии различных постмикросомальных фракций. 1, 2 — добавлена фракция из нормальной печени, 3, 4 — добавлена фракция из регенерирующей печени

инкубации из ядер нормальной и регенерирующей печени освобождается РНК, имеющая ДНК-подобный нуклеотидный состав, значительно отличающийся от состава новообразованной РНК ядер. При увеличении времени инкубации ядер до 60 мин. в освобождающейся РНК увеличивается содержание (Г+Ц)-нуклеотидов (табл. 2). Если через 15 или 30 мин. после начала инкубации ядра регенерирующей печени осаждали центрифугированием, суспендировали в новой порции среды, содержащей все компоненты реакции, и инкубацию продолжали еще 30 мин, нуклеотидный состав РНК, освобождающейся в последние 30 мин, был еще более сходным с составом рРНК (табл. 2). Обнаруженная временная последовательность выхода разных РНК из ядер одинакова для ядер из нормальной и регенерирующей печени и согласуется с данными по конкурентной гибридизации РНК, освобождающихся из ядер регенерирующей печени в разные сроки инкубации (10). Такая последовательность выхода, возможно, объясняется более продолжительным периодом созревания рибосомальных РНК в ядре по сравнению с ДНК-подобной РНК (11).

Анализ новообразованной РНК, выходящей из ядер за 15 мин. инкубации в полной системе, в сахарозном градиенте показывает, что она входит

в состав частиц, имеющих константу седиментации 45 S. РНК, выделенная из комплекса с белком, седиментирует в области 10–14 S и не различается для ядер из нормальной и регенерирующей печени (рис. 1).

Выход РНК из ядра может регулироваться, наряду с внутренними процессами, и цитоплазматическими факторами (¹², ¹³). Для изучения этого влияния в нашей системе мы инкубировали ядра из нормальной и регенерирующей печени в среде, содержащей постмикросомальную фракцию, выделенную также из нормальной или регенерирующей печени. Результаты этих опытов приведены на рис. 2. Можно видеть, что в присутствии постмикросомальной фракции из регенерирующей печени выход РНК значительно увеличивается в обоих типах ядер, а в случае ядер из нормальной печени кинетическая кривая выхода РНК изменяет свой характер и не обнаруживает выхода на плато до 60 мин. инкубации, в то время как с нормальной постмикросомальной фракцией кривая выходит на плато после 15 мин. инкубации ядер и новый выход РНК наблюдается только после 50 мин. (рис. 2). Различие в действии постмикросомальных фракций из нормальной и регенерирующей печени на выход новообразованной РНК из ядер нельзя объяснить разным количеством белка в этих фракциях, так как в пробы добавляли одинаковое количество белка той или другой фракции; это различие не связано и с разной активностью рибонуклеаз в цитоплазме нормальной и регенерирующей печени, так как активность кислоторастворимой части освобождающегося из ядер материала в присутствии постмикросомальной фракции из регенерирующей или нормальной печени различалась незначительно. Таким образом, можно предположить, что выход РНК из ядер специфически регулируется недифференцируемыми компонентами цитоплазмы клеток. Как показывают наши исследования, бесклеточная система может с успехом использоваться для изучения процесса транспорта РНК из ядра и механизмов его регуляции в различных клетках животных.

Второй московский государственный
медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поступило
6 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. W. Shearer, B. J. McCarthy, *Biochemistry*, v. 6, 283 (1967). ² G. P. Georgiev, A. P. Ryskov et al., *Biochim. et biophys. acta*, v. 259, 259 (1972). ³ И. Б. Збарский, Усп. совр. биол., т. 73, 3 (1972). ⁴ R. W. Shearer, E. A. Smuckler, *Cancer Res.*, v. 31, 2104 (1971). ⁵ R. Church, B. J. McCarthy, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 58, 1548 (1967). ⁶ K. Ishikawa, C. Kuroda, K. Ogata, *Biochim. et biophys. acta*, v. 179, 316 (1969). ⁷ L. C. Yu, J. Racevskis, T. E. Webb, *Cancer Res.*, v. 32, 2314 (1972). ⁸ A. O. Pogo, V. C. Littau et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 57, 743 (1967). ⁹ A. J. Rizzo, T. E. Webb, *Europ. J. Biochem.*, v. 27, 136 (1972). ¹⁰ D. E. Schumm, T. E. Webb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 48, 1259 (1972). ¹¹ J. E. Darnell, *Bacteriol. Rev.*, v. 32, 262 (1968). ¹² Г. А. Дворкин, В. Ф. Ефимова, Л. И. Коганицкая, Мол. биол., т. 8, 78 (1974). ¹³ D. E. Schumm, H. P. Morris, T. E. Webb, *Cancer Res.*, v. 33, 1821 (1973).