

И. Ф. ПАСКЕВИЧ, Л. Н. САВЕНКО, В. С. ЛИХОДЕД

ДНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА ИЗ ЯДЕР ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ БЕЛЫХ КРЫС

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 III 1974)

Клетки животных содержат по крайней мере две основные формы ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которые отличаются между собой по локализации, физико-химическим и функциональным свойствам и активности в течение суточного цикла (¹⁻⁴). Несмотря на определенные успехи, достигнутые в области изучения свойств РНК-полимеров, в литературе полностью отсутствуют сведения о синтезе фермента в клетках высших животных. В то же время совершенно очевидно, что изучение этого вопроса позволит вскрыть один из механизмов регуляции синтеза РНК за счет количественного содержания РНК-полимеразы.

РНК-полимеразу выделяли по (²) из ядер печени и селезенки белых крыс весом 300—350 г. В качестве меченого предшественника использовали С¹⁴-белковый гидролизат хлореллы (удельная радиоактивность 1,2 мС/мл), который вводили внутривентриально в количестве 30 мкС за 90 мин. до забоя животных. Суммарный фермент фракционировали на колонках из ДЭАЭ-целлюлозы (2×18 см) градиентом концентрации 0,1—0,4 М и дальнейшую очистку проводили на колонках из фосфоцеллюлозы (Р-целлюлоза, Р-11; 2×16 см) градиентом концентрации КСl 0,2—0,8 М. Из каждой пробы отбирали по 0,5 мл для определения радиоактивности и по 0,02 мл — для определения ферментативной активности в синтезе РНК. Инкубационная проба для определения РНК-полимеразной активности содержала (конечный объем 0,2 мл): по 0,2 мкмоль АТФ, ГТФ, ЦТФ и Н³-УТФ (удельная радиоактивность 6,5 С/ммоль), 5 мкмоль (NH₄)₂SO₄, 0,2 мкмоль MgCl₂, 0,05 мкмоль MnCl₂, 50 мкг ДНК, которую выделяли как описано ранее (⁵). Инкубацию проводили 20 мин. при 37°, после инкубации к пробам добавляли по 1 мг альбумина, 3 мл холодной 10% ТХУ, пробы отмывали последовательно 5% ТХУ, этанолом, растворяли в концентрированной муравьиной кислоте и радиоактивность определяли на счетчике «Nuclear Chicago» Iso-scar-300 в жидком сцинтиллаторе на основе диоксана.

На рис. 1 представлены результаты хроматографического разделения суммарного ядерного экстракта печени и селезенки на колонках из ДЭАЭ-целлюлозы. Видно, что РНК-полимеразная активность сосредоточена в основном в двух пиках, элюирующихся соответственно при 0,15 и 0,25 М (NH₄)₂SO₄. Определение активности РНК-полимераз в зависимости от концентраций Mg²⁺, Mn²⁺ и (NH₄)₂SO₄ (⁶) указывает на то, что в первом пике содержится суммарная РНК-полимераза А, а во втором — РНК-полимераза В. Удельная активность ферментов в синтезе РНК после фракционирования на ДЭАЭ-целлюлозе незначительна, что свидетельствует о загрязнении сопутствующими белками. Дальнейшая очистка ферментов на колонке из Р-целлюлозы (рис. 2) позволяет не только в значительной степени очистить ферменты, что приводит к увеличению их удельной активности, но также и разделить РНК-полимеразу А на два подкласса — АI и АII.

При изучении включения С¹⁴-гидролизата видно (рис. 1), что белковые фракции, в которых локализована РНК-полимеразная активность, обладают значительной радиоактивностью, преимущественно выраженной в

обоих органах для РНК-полимеразы А. Очистка ферментов на Р-целлюлозе (рис. 2) указывает на то, что основная масса радиоактивности связана не с собственно ферментом, а с сопутствующими белками, так как удельная радиоактивность ферментов незначительна (по сравнению с данными при фракционировании на ДЭАЭ-целлюлозе). Следует подчеркнуть, что в обоих органах более интенсивно мечеными является РНК-полимераза А1 по

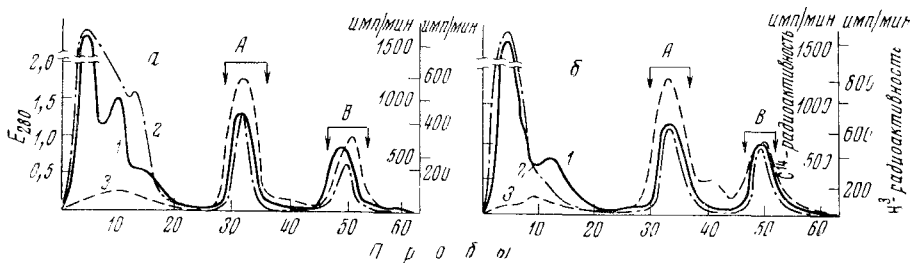


Рис. 1. Хроматографическое разделение суммарного ядерного экстракта печени (а) и селезенки (б) на колонках из ДЭАЭ-целлюлозы. 1 — E_{280} , 2 — C^{14} -радиоактивность, 3 — H^3 -радиоактивность. А, В — РНК-полимеразы А и В

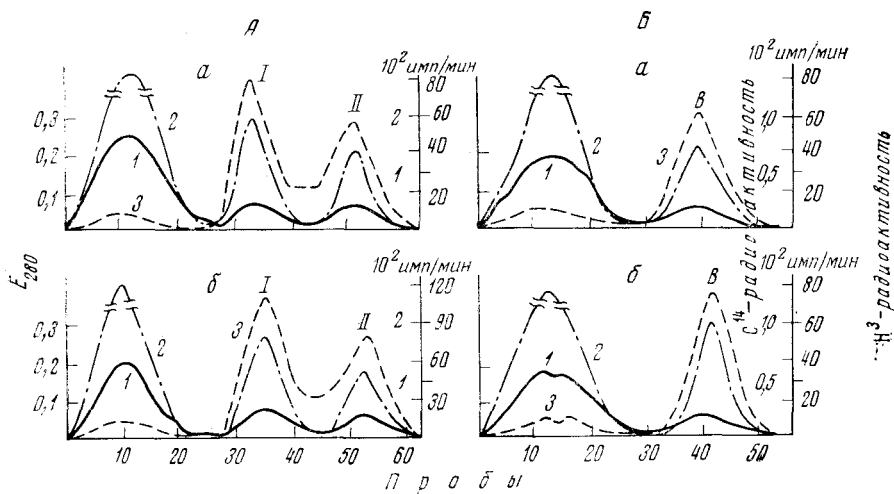


Рис. 2. Хроматографическая очистка РНК-полимераз А (А) и В (Б) печени (а) и селезенки (б) на колонках из Р-целлюлозы. I, II — РНК-полимеразы А1, А2; В — РНК-полимераза В; 1—3 — то же, что на рис. 1. Фракции с наибольшей удельной активностью после фракционирования на ДЭАЭ-целлюлозе (на рис. 1 обозначено стрелками) объединяли и наносили на Р-целлюлозу

сравнению с другими классами ферментов: в печени удельная радиоактивность РНК-полимераз А1, А2 и В составляет соответственно 2940 ± 186 , 1860 ± 164 и 1478 ± 116 имп/мин·мг, в селезенке — 2660 ± 209 , 1580 ± 132 и 2085 ± 243 имп/мин·мг соответственно. Тот факт, что в печени радиоактивность РНК-полимеразы В меньше по сравнению с этим показателем для РНК-полимераз А, может быть связан с различиями в их активности в течение суточного цикла: максимум активности РНК-полимеразы А наблюдается в утренние часы, а максимум активности РНК-полимеразы В — во второй половине дня (4). Поскольку в наших опытах животных забивали только в утренние часы (9 час.), то, очевидно, мы фиксировали только определенную точку активности ферментов.

Касаясь органной специфики синтеза различных классов РНК-полимераз, можно отметить, что удельная радиоактивность фермента В из селезенки выше по сравнению с этим показателем для фермента печени (2085 ± 243 и 1478 ± 116 имп/мин·мг соответственно), в то время как этот пока-

затель для РНК-полимераз А I и А II практически одинаков. Кроме того, можно отметить относительно большую активность ферментов из селезенки по сравнению с печенью в системе синтеза РНК (рис. 2): как видно, относительная большая активность в синтезе РНК отмечается для РНК-полимераз А I и А II.

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют (по крайней мере — частично) о различиях в активности и синтезе РНК-полимераз печени и селезенки белых крыс, что, по всей вероятности, имеет непосредственное отношение к регуляции синтеза РНК на уровне функционирования фермент-матричного комплекса.

Харьковский научно-исследовательский
институт медицинской радиологии

Поступило
19 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Chambon, F. Gissinger *et al.*, *Acta endocrinol.*, v. 71, 222 (1972). ² J. Chesterton, P. Butterworth, *Europ. J. Biochem.*, v. 19, 232 (1971). ³ B. Sugden, W. Keller, *J. Biol. Chem.*, v. 218, 3777 (1973). ⁴ S. Glasser, T. Spelsberg, *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*, v. 47, 951 (1972). ⁵ И. Ф. Паскевич, И. М. Тодоров, Докл. АН УССР, т. 10, сер. Б, 923 (1969). ⁶ И. Ф. Паскевич, В. С. Лиходед и др., Укр. биохим. журн., т. 45 (1974).