

Н. Г. ШУШЕ, Т. В. СИРОТА

ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОСОМ И РИБОСОМАЛЬНЫХ РНК ДРОЗОФИЛЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 29 IV 1974)

В настоящее время специфическая диссоциация молекулы 28S-рибосомальной РНК на два приблизительно равных фрагмента при нагревании, обработке диметилсульфоксидом, формамидом и некоторых других воздействиях, нарушающих вторичную структуру нуклеиновых кислот, обнаружена у многих представителей высших растений, простейших и низших животных (¹⁻⁵). Считается, что этот процесс не есть разрыв ковалентной цепи, а отражает реальную диссоциацию нековалентной связи при наличии предсуществующего разрыва, локализованного в специфической точке полинуклеотидной цепи 28S-рибосомальной РНК (^{4, 5}). В то же время показано, что 28S-рибосомальная РНК этих клеток синтезируется в виде единой непрерывной полинуклеотидной цепи, входящей в состав высокомолекулярного предшественника рибосомальной РНК, и приобретает способность диссоциировать на два компонента скорее всего на уровне зрелой рибосомы (⁶). Поэтому вполне возможно, что разрыв цепи 28S-рибосомальной РНК обусловлен действием специфических нуклеаз, входящих в состав рибосом. В связи с этим было интересно исследовать рибосомы и РНК, выделенную из очищенных рибосом клеток дрозофилы, 28S-рибосомальная РНК которых обладает вышеуказанными свойствами.

В работе использовались личинки *Drosophila melanogaster* на стадии белой предкуколки. Рибосомы выделяли по методу Кирби (⁷), использованному для получения рибосом из мух дрозофилы, РНК — из рибосом и гомогенатов либо по методу Шеррера и Дарнелла (⁸), либо по методу Хайатта (⁹). Анализ очищенных рибосом проводили в 10–30% градиенте сахарозы, приготовленном на 0,025 M трис-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 0,025 M KCl и 0,0025 M MgCl₂. РНК фракционировали в 5–20% градиенте сахарозы, который приготавливали на 0,01 M калий-ацетатном буфере, pH 5,0, содержащем 0,1 M NaCl, 0,1% додецилсульфата натрия и 0,01% поливинилсульфата. Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге «Spinco» L2 65B в роторе SW27 в течение 14 час. при 23 000 об/мин. Кроме того РНК фракционировали в смешанном агарозно-полиакриламидном геле по Дингману и Пикокку (¹⁰). Ультрафиолетовые профили градиентов записывали на приборе «Увикорд» 2, ЛКБ, Швеция. Гели сканировали при 265 нм на спектрофотометре «Гилфорд» 240, Франция.

При анализе рибосом и рибосомальных субъединиц после диссоциации в 0,5 M KCl было обнаружено, что частицы имеют типичные для эукариотов константы седиментации: 80S, 60S и 40S для рибосом и большой и малой субъединиц соответственно (рис. 1а). Маркером в этих экспериментах служили рибосомы клеток асцитного рака Эрлиха. Использование в процессе выделения детергентов тритона X-100 и дезоксихолата натрия не сказывалось на выходе рибосом из клеток, что говорит о том, что основная масса рибосом в клетках дрозофилы состоит из свободных рибосом, не связанных с мембранами.

Известно, что депротеинизация рибосом высших животных приводит к освобождению 28S и 18S молекул рибосомальной РНК. На седиментограммах РНК, выделенной из клеток дрозофилы на холоду, также обнаруживались пики 28S и 18S рибосомальной РНК (6). Поэтому для нас был неожиданным тот факт, что РНК, получаемая из рибосом дрозофилы, седиментировала в градиенте сахарозы в области 8–13S (рис. 1б). Подобная картина седиментации наблюдалась независимо от температурного режима экспериментов и от включения детергентов в процесс выделения рибосом. Этот результат позволил нам предположить, что молекулы рибосомальной РНК в процессе выделения рибосом могут подвергаться мно-

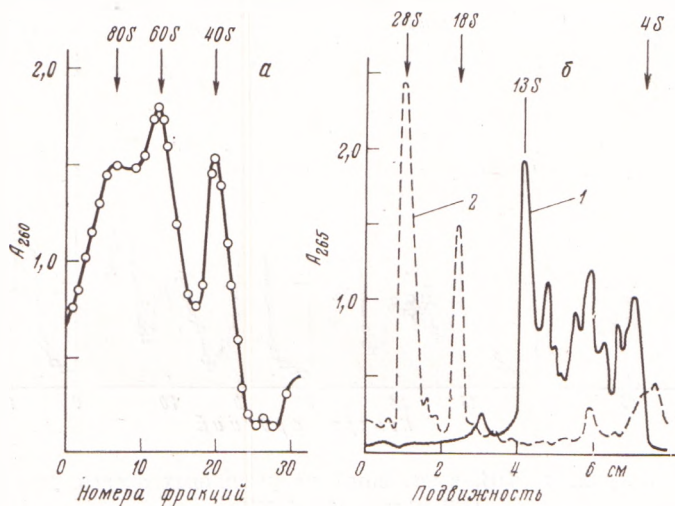


Рис. 1. Седиментограмма диссоциированных рибосом дрозофилы (а) и ультрафиолетовые профили РНК, выделенной из очищенных рибосом в полиакриламидном геле (б). 1 — дрозофила, 2 — асцитный рак Эрлиха

жественным ферментативным разрывам. Поскольку получение рибосом состоит из ряда последовательных этапов, было интересно выяснить, на каком из них начинается деградация рибосомальной РНК. Для этого РНК экстрагировали строго на холоду на каждом из этапов. Было обнаружено, что уже при гомогенизации личинок наблюдалась специфическая деградация 18S-рибосомальной РНК. При этом оказалось, что в первую очередь повреждается не 28S-, а 18S-рибосомальная РНК. На седиментограмме пик 18S-РНК уменьшался и появлялись два новых пика в области 10S и 13S, в то время как структурная целостность 28S-рибосомальной РНК сохранялась (рис. 2а). Если к гомогенату добавляли тритон X-100 в конечной концентрации 0,5% и инкубировали суспензию на холоду в течение 10 мин., то после этого 18S-РНК характеризовалась тремя пиками с константами седиментации 10S, 13S и 18S, приблизительно равными по величине (рис. 2б). После центрифугирования гомогената при 12 000 об/мин в течение 10 мин. для осаждения ядер и митохондрий и обработки постмитохондриальной надосадочной жидкости дезоксихолатом натрия (конечная концентрация 0,5%) наблюдалось дальнейшее изменение 18S-РНК: на седиментограмме обнаруживались два пика с константами седиментации 10S и 13S с небольшим плечом в области 18S (рис. 2в). В обоих последних случаях 28S-рибосомальная РНК и 4–5S-РНК на седиментограммах оставались неизменными. В случае прогрева полученных препаратов РНК молекулы 28S-рибосомальной РНК распадались на два фрагмента с константами седиментации около 18S. Интересно, что продукты превращений 18S-рибосомальной РНК не подвергались дальнейшим изменениям при температурной обработке. Если постмитохон-

дриальную надосадочную жидкость выдержать при 0° в течение 1 часа и затем, обработав дезоксирилатом натрия, выделить из нее РНК, то одновременно с деградацией 18S начинается постепенное изменение 28S-РНК: основной пик уменьшается, и на седиментограмме появляется почти равный ему по площади пик в области 22S (рис. 2г). Дальнейшее увеличение выдержки приводит к переходу всей РНК из рибосом в 8-13S-РНК так, как это показано на рис. 1б.

Представленные результаты показывают, что рибосомы клеток дрозофилы обладают значительной нуклеазной активностью, которую не удается заблокировать современными методами и которая проявляется при выде-

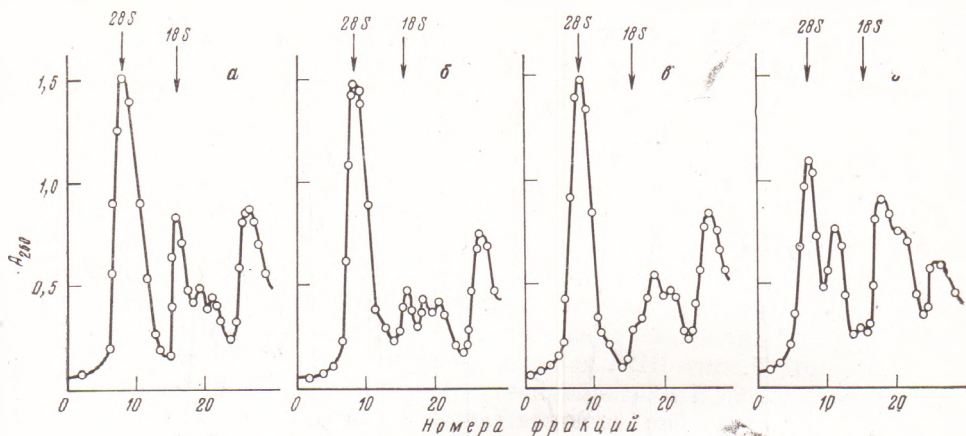


Рис. 2. Седиментограммы РНК, выделенной на различных этапах получения рибосом (а — г) (см. текст)

лении рибосом из этих клеток и приводит к полной деградации 28S- и 18S-рибосомальных РНК. Введение в среды выделения специфических ингибиторов рибонуклеаз не дает желаемого результата. Как и следовало ожидать⁽¹¹⁾, нарушение целостности полинуклеотидной цепи РНК еще в составе рибосом не изменяет физико-химических характеристик рибосомальных субъединиц. Активность нуклеаз рибосом дрозофилы сказывается в первую очередь на структурной целостности 18S-РНК. В бактериальных клетках РНКаза локализована в 30S-субъединицах⁽¹²⁾. Возможно, что в клетках дрозофилы фермент также находится в 40S-субъединице или связывается с ней при гомогенизации⁽¹³⁾. Поэтому деградация 28S-РНК начинается лишь через некоторое время. Кроме того, наши результаты позволяют сделать предположение о том, что фермент может локализоваться на поверхности малой субъединицы, контактирующей с большой субъединицей. Тогда эта нуклеаза может быть ответственна за введение специфического разрыва в структурно доступной области 28S-рибосомальной РНК. В то же время наши данные не исключают возможности существования двух различных ферментативных систем, отвечающих за введение специфического разрыва в цепь 28S-рибосомальной РНК дрозофилы и деградацию молекул рибосомальной РНК, описанную в настоящей работе. Большой интерес может представить изучение активности рибосом дрозофилы в бесклеточной системе, так как это позволит подойти к решению вопроса о значении целостности рибосомальной РНК для выполнения рибосомами белоксинтезирующих функций.

Авторы считают приятным долгом выразить благодарность Л. М. Константиновой, В. К. Викуловой, Е. М. Бизуновой и Н. Г. Носовой за практическую помощь при выполнении настоящей работы.

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

Поступило
1 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. J. Leaver, *Biochem. J.*, v. 135, 237 (1973). ² J. R. Rawson, E. J. Crouse, E. Stutz, *Biochim. et biophys. acta*, v. 246, 507 (1971). ³ J. F. Giorgini, F. L. De Lucca, *Biochem. J.*, v. 135, 73 (1973). ⁴ S. W. Applebaum, R. P. Ebstein, G. R. Wyatt, *J. Mol. Biol.*, v. 21, 29 (1966). ⁵ L. Rubinstein, U. Clever, *Biochim. et biophys. acta*, v. 246, 517 (1971). ⁶ Т. В. Сурога, В. Т. Какпаков и др., *ДАН*, т. 211, 491 (1973). ⁷ J. R. B. Hastings, K. S. Kirby, *Biochem. J.*, v. 100, 532 (1966). ⁸ K. Scherrer, J. E. Darnell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 7, 486 (1962). ⁹ H. Hiatt, *J. Mol. Biol.*, v. 5, 217 (1962). ¹⁰ L. Dingman, A. Peacock, *Biochemistry*, v. 7, 659 (1968). ¹¹ Р. С. Шакулов, М. А. Айгужин, А. С. Спирип, *Биохимия*, т. 27, 744 (1962). ¹² А. С. Спирип, Л. П. Газрилова, *Рибосома*, «Наука», 1971, стр. 98. ¹³ H. C. Neu, L. A. Heppel, *J. Biol. Chem.*, v. 239, 2927 (1964).