

В. В. АСЕЕВ, И. Л. МЕТТ, Г. Н. ЗАЙЦЕВА

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ИЗ ЯДЕР ЖГУТИКОВОГО ПРОСТЕЙШЕГО CRITHIDIA ONCORBELTI

(Представлено академиком А. С. Спириным 18 IX 1974)

Известно, что у прокариот существует одна ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляющая синтез всех видов РНК. В ядрах эукариот обнаружено несколько форм этого фермента, различающихся по своим свойствам, субъединичному строению и локализации (1-7). Так, у животных, высших растений и грибов находят три основных формы фермента: форму I, локализованную в ядрышке, формы II и III — в нуклеоплазме. Следует отметить, что из трех форм РНК-полимеразы ядра только форма II чувствительна к α -аманитину, что служит обычно средством идентификации данного фермента.

Формы I и II могут быть разделены на подформы (1, 2). Что касается ядерных РНК-полимераз простейших, то такой множественности ферментов в ряде случаев не удается обнаружить (8-11). Возможно, что число форм РНК-полимеразы зависит от уровня организации ядерного аппарата. В связи с этим изучение структуры и свойств РНК-полимеразы жгутиковых простейших представляет особый интерес, так как считается, что эти древнейшие одноклеточные организмы имеют примитивный ядерный аппарат (12).

К настоящему времени РНК-полимераза простейших почти не изучена. В литературе имеются лишь единичные сообщения о выделении РНК-полимеразы из ядер *Tetrahymena pyriformis* (8, 9), *Acanthamoeba castellanii* (10) и *Crithidia fasciculata* (11).

При исследовании включения ^3H -УТФ в изолированные ядра жгутикового простейшего *Crithidia oncorbelti* в различных условиях нами было показано, что в них существуют, по-видимому, по крайней мере две формы ДНК-зависимых РНК-полимераз, различающихся по отношению к двухвалентным катионам, ионной силе раствора и ингибиторам (13). Для проверки этого предположения в настоящей работе проводилось выделение, фракционирование и изучение свойств ДНК-зависимой РНК-полимеразы из ядер *C. oncorbelti*.

Выращивание культуральной формы *C. oncorbelti* и получение ядер описано ранее (14). РНК-полимеразу выделяли по модифицированной методике (15). Для экстракции фермента ядра лизировали в 0,3 M растворе сернокислого аммония и обрабатывали в гомогенизаторе Поттера для снижения вязкости. Лизат центрифугировали 1 час при 150 000 g, и фермент высаливали из надосадочной жидкости сульфатом аммония в интервале 40-65% насыщения. Осадок растворяли в 0,02 M трис-НСI-буфере, содержащем 25% глицерина, 5 ммол. 2-меркаптоэтанола и 0,1 ммоль ЭДТА, и обессоливали путем гель-фильтрации на акрилексе Р-2 („Reanal“). Полученный раствор наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЕ-32, „Whatman“) и белок элюировали линейным градиентом концентрации сульфата аммония от 0 до 0,5 M. Во фракциях измеряли поглощение при 280 нм, определяли содержание белка по Лоури и РНК-полимеразную активность.

Инкубационная смесь для определения РНК-полимеразной активности содержала в ммольях: трис-НСI, рН 7,9 50; ГТФ, АТФ, ЦТФ по 0,5 каж-

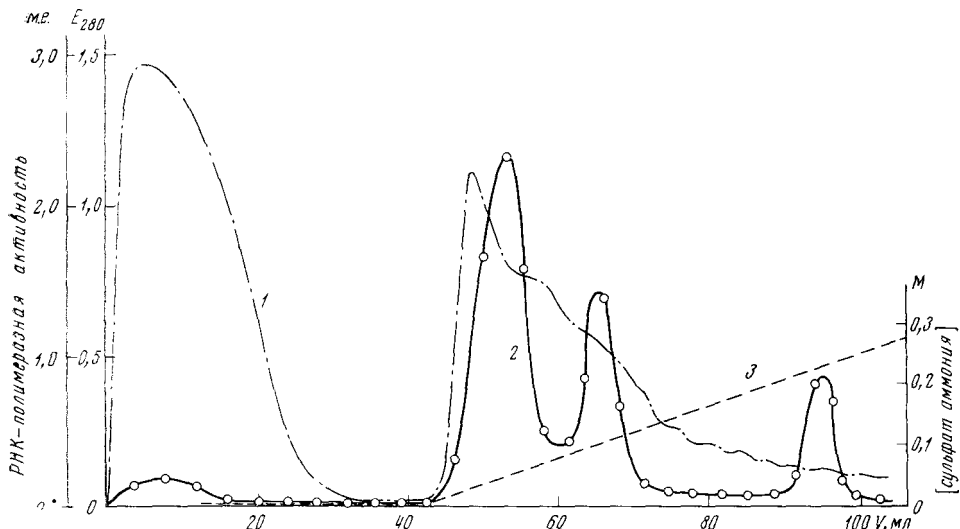


Рис. 1. Профиль элюции РНК-полимеразной активности при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. 1 — поглощение при λ 280 нм; 2 — РНК-полимеразная активность; 3 — концентрация сульфата аммония

дого; ^3H -УТФ (удельная активность 1,37 С/ммоль) 0,174 мкС; MgCl_2 1,5; MnCl_2 2,5; 2-меркаптоэтанол 2,5; ЭДТА 0,1; ДНК тимуса теленка (смесь нативной и денатурированной) 100 мкг/мл; препарат фермента — от 2 мг до 25 мкг на разных стадиях очистки.

Пробы объемом по 0,1 мл инкубировали при 37° в течение 15 мин., охлаждали во льду, добавляли по 0,1 мл 10% HClO_4 . Радиоактивность образцов просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике „Mark-2“ (на фильтрах HUF5 (Synpro)), которые промывали 30 мл 5% HClO_4 и 2 мл абсолютного этанола. Рибонуклеазную активность препаратов РНК-полимеразы определяли в той же системе, используя в качестве субстрата ^{32}P -рРНК из печени крысы. За единицу активности РНК-полимеразы — Е принимали включение в кислотоперастворимый продукт 1 нмоля УМФ за 15 мин.

Удельная активность исходного гомогената клеток *S. oncopelti* составляла 0,56 мЕ на 1 мг белка, а лизата ядер 1,1 мЕ на 1 мг белка. При высаливании белков из лизата ядер 90% РНК-полимеразной активности осаждалось в интервале 40–65% насыщения сульфатом аммония. На этой стадии достигалась очистка фермента в 13 раз (удельная активность 7 мЕ на 1 мг белка) по сравнению с исходным гомогенатом клеток.

При хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой РНК-полимераза *S. oncopelti* разделяется на три фракции, которые элюируются при 0,01–0,04 М (фракция 1), 0,08–0,10 М (фракция 2) и 0,3 М (фракция 3) сульфата аммония (рис. 1).

Следует отметить, что в процессе выделения и хранения фермента происходит его быстрая инактивация. Особенно нестабильным фермент становится после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе: его полная инактивация происходит за двое суток при хранении в сухом льду. Использование для стабилизации фермента таких приемов, как добавление сывороточного альбумина, 2-меркаптоэтанол, повышение концентрации глицерина до 50%, хранение в жидком азоте, оказалось неэффективным.

Показано, что ядерные РНК-полимеразы других изученных представителей простейших (⁹, ¹⁰) и низших грибов (³, ⁵) также характеризуются нестабильностью и быстро инактивируются при очистке и хранении.

Поскольку активность фракции 3 была незначительна, для дальнейшего исследования нами использовался фермент из фракций 1 и 2, которые были очищены по сравнению с исходным гомогенатом в 170 и 130 раз соответственно.

Для этих фракций были изучены: а) кинетика включения ^3H -УМФ в кислотонерастворимый продукт; б) отношение к ионам Mn^{2+} и Mg^{2+} ; в) действие на фермент ряда антибиотиков.

Кинетика РНК-полимеразной реакции оказалась сходной для фракций 1 и 2 (рис. 2). Величина включения ^3H -УМФ достигает максимального уровня за 10 мин. и остается постоянной в течение 60 мин., что указывает на отсутствие рибонуклеаз в полученных фракциях. Действительно, определение рибонуклеазной активности в обеих фракциях показало, что в течение 30 мин. инкубации при 37° не происходит уменьшения радиоактивности, добавленной в систему ^{32}P -РНК.

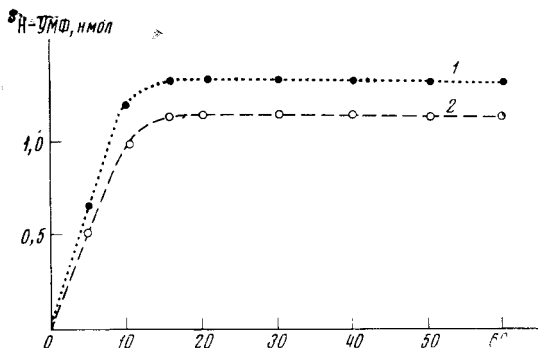


Рис. 2. Зависимость включения ^3H -УМФ в кислотонерастворимый продукт от времени инкубации. 1 — фракция 1; 2 — фракция 2

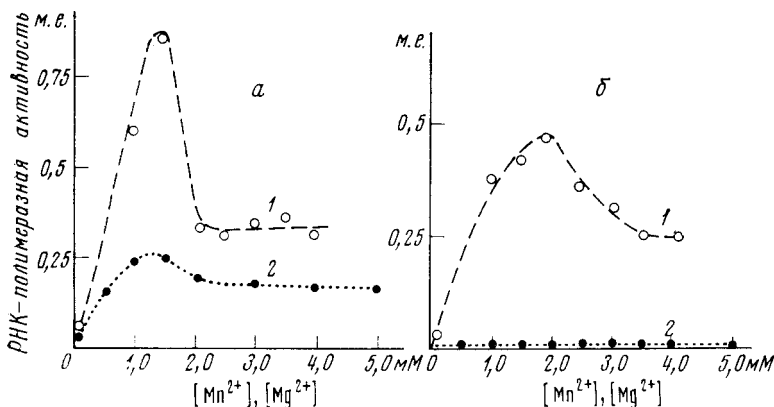


Рис. 3. Зависимость РНК-полимеразной активности от концентрации ионов Mg^{2+} (2) и Mn^{2+} (1). а — активность фракции 1; б — активность фракции 2

При изучении зависимости РНК-полимеразной активности от концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} было показано, что без добавления двухвалентных катионов обе формы фермента почти не работают. Активность фракции 1 проявляется в присутствии как Mg^{2+} , так и Mn^{2+} : при этом оптимальной концентрацией Mg^{2+} является 1,0–1,5 мМ, а Mn^{2+} 1,5 мМ (рис. 3а). При оптимальных концентрациях этих ионов фермент 1 в 3,2 раза более эффективен в присутствии Mn^{2+} , чем Mg^{2+} . Активность фракции 2 проявляется только в присутствии Mn^{2+} с оптимумом действия при концентрации 2 мМ (рис. 3б).

Ферментативные фракции 1 и 2 ингибируются актиномицином D (20 мкг/мл), что может указывать на матричный характер реакции. На это указывает также подавление реакции ДНКазой (50 мкг/мл). Продукт реакции полностью разрушается РНКазой (25 мкг/мл, 37° , 10 мин.) и щелочью (0,75 N KOH, 37° , 16 час.).

Нами изучалось действие ряда специфических ингибиторов на активность полученных ферментативных фракций. Ингибиторы бактериальной РНК-полимеразы: рифампицин (50 мкг/мл) и стептолидигин (100 мкг/мл) не подавляют активности обеих фракций. Этот факт согласуется с данными для других эукариот (¹, ²), но отличает ядерные ферменты *S. oncoselti* от РНК-полимеразы II *Acanthamoeba castellanii*, которая ингибируется рифампицином (¹⁰).

Поскольку на ядрах *S. oncoselti* нами было показано (¹³), что циклогексимид ингибировал синтез РНК в присутствии Mg^{2+} при низкой ионной силе (0,12) на 50% при концентрации 150 мкг/мл, в настоящей работе изучалось действие этого антибиотика на очищенные фракции фермента. Было установлено, что в концентрации 200 мкг/мл циклогексимид не ингибировал ни одну из полученных ферментативных фракций. Очевидно, циклогексимид оказывает опосредованный эффект на синтез РНК в ядрах. Большинство авторов (², ⁴, ⁵) также не обнаружено действие циклогексимид *in vitro* на ядрышковую РНК-полимеразу. Однако в некоторых случаях описывается подавление циклогексимидом активности РНК-полимеразы I, например, из *Blastocladiella* (⁶) и *Acanthamoeba* (¹⁰).

Для идентификации РНК-полимеразной активности полученных фракций 1 и 2 из ядер *S. oncoselti* представлялось важным определить их отношение к α -аманитину. Было показано преимущественное ингибирование этим антибиотиком (в концентрации 50 мкг/мл) активности фракции 2, что может свидетельствовать о ее принадлежности к РНК-полимеразе II.

Таким образом, на основании данных о характере элюции ферментов с ДЭАЭ-целлюлозы, о зависимости их оптимальных активностей от ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} , о действии на них антибиотиков и, прежде всего, α -аманитина, можно считать, что РНК-полимеразные фракции 1 и 2 из ядер *S. oncoselti* соответствуют формам I и II высших эукариот. Однако при дальнейшем подробном изучении свойств ДНК-зависимых РНК-полимераз, выделенных из ядер простейших, а именно при исследовании множественности форм и субъединичной структуры, эффективности транскрибирования разных матриц и участия в этом процессе факторов транскрипции, могут выявиться особенности, отличающие их от ферментов высших эукариот.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 IX 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Chambon, F. Gissinger et al., In: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, V Symp., May 29–31, 1973, p. 272, Suppl. 168. ² S. T. Jacob, In: Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol., v. 13, N. Y.—London, 1973, p. 93. ³ J. Sebastian, M. M. Bhargava, H. O. Halvorson, J. Bacteriol., v. 114, 1 (1973). ⁴ Th. M. Brogt, R. J. Planta, FEBS Letters, v. 20, 47 (1972). ⁵ A. K. Cain, E. W. Nester, J. Bacteriol., v. 115, 769 (1973). ⁶ P. A. Horgen, D. H. Griffin, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 338 (1971). ⁷ Sh.-Sh. Pong, W. F. Loomis, J. Biol. Chem., v. 248, 3933 (1973). ⁸ S. Kurtz, R. E. Pearlman, Canad. J. Biochem., v. 50, 154 (1972). ⁹ T. Higashinakagawa, T. Mita, FEBS Letters, v. 25, 73 (1973). ¹⁰ V. L. Rudick, R. A. Weisman, Biochim. et biophys. acta, v. 299, 91 (1973). ¹¹ G. C. Hill, C. Bonilla, In: Progress in Protozoology — IV Congress Intern. Protozoology, Clermont-Ferrand, 2–10 September, 1973, Abstr., p. 183. ¹² И. Б. Райков, Карпология простейших, «Наука», 1967. ¹³ Г. Н. Зайцева, В. В. Асеев, Д. Г. Мальдов, Антибиотики, т. 19, 405 (1974). ¹⁴ Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., Биохимия, т. 35, 565 (1970). ¹⁵ R. G. Roeder, W. G. Rutter, Nature, v. 224, 234 (1969); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 65, 675 (1970).