

В. С. ШАПОВ, С. Я. ДАВЫДОВА

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЛИПОРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

(Представлено академиком А. А. Баевым 3 II 1975)

В результате многолетних работ мы пришли к заключению, что в состав всех исследованных нами мембран животной клетки: гранулированного эндоплазматического ретикулума (э.р.), митохондрий, ядерной, плазматических мембран (п.м.) входит рибосомоподобная, но не тождественная ей РНК, отличающаяся по ряду свойств от других известных РНК животной клетки (¹⁻⁹). Некоторые свойства РНК э.р. печеночных клеток свидетельствуют о том, что РНК, вероятнее всего, входит в состав липопротеидных комплексов (⁷). Дополнительные данные о реальном существовании липорибонуклеопротеидных комплексов (ЛРНП) были нами получены при изучении п.м.

В составе ЛРНП свойства РНК определенным образом изменяются. В частности, РНК э.р. становится относительно резистентной к действию РНКазы (¹), подобные же результаты были получены для РНК в составе п.м. и мембран ядерной оболочки (⁸). Находясь в структуре мембран РНК, п.м. в значительной мере защищена от ферментативной деградации связью

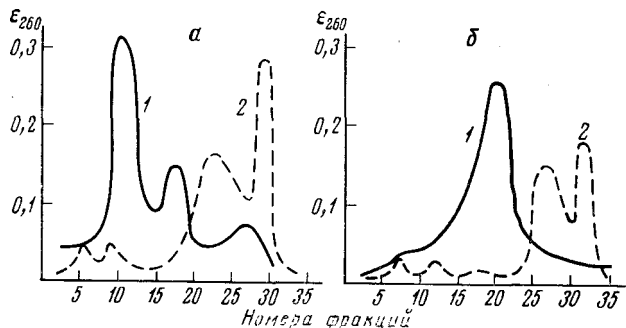


Рис. 1. Ультрацентрифугирование РНК-п.м., рРНК+тРНК, выделенных в различных условиях, в градиенте (5–20%) сахарозы (300 мкг РНК в Na-ацетатном буфере, 0,01 M ЭДТА pH 5,1), «Спинко» L-2-50, ротор SW-50, 200 мин., 37000 об/мин. а — соблюдены условия, препятствующие ферментативному расщеплению РНК (п.м., РНК-п.м., рРНК+тРНК выделяли при 4° в присутствии бентонита, 1 мг/мл, и Na-додецилсульфата 0,5% в конечном содержании); б — не соблюдены условия, препятствующие ферментативному расщеплению РНК (препараты п.м. и РНК выделяли при комнатной температуре, бентонит и Na-додецилсульфат не добавляли к среде выделения). 1 — рРНК+тРНК, 2 — РНК-п.м.

с липопротеидами. По мере ступенчатого высвобождения из этой связи атакуемость РНК РНКазой возрастает, т. е. она выше у РНК в составе РНП и еще выше у препаративно выделенной РНК уступая, однако, расщепляемости рибосомной РНК (рРНК). При инкубации интактных п.м., рибонуклеопротеида или РНК п.м. в течение нескольких часов при 37° (среда инкубации: 0,05 M трис-HCl-буфер, pH 7,6;

0,1 М NaCl; 6 о.е. РНК на 1 мл; 0,033 мкг на 1 мл панкреатической РНКазы) в кислоторастворимую фракцию переходит соответственно 10–15%, 62–67%, 75–78% и около 90% РНК рибосом.

Вероятно, на внешней поверхности п.м. печеночных клеток находится некоторая часть РНК, чувствительная к действию РНКазы, поскольку после обработки РНКазой нативных препаратов РНК п.м. количественное содержание препаративно выделенной РНК снижается на 20%. Вместе с тем после обработки РНКазой тотальных препаратов п.м. профиль РНК, выделенной из таких препаратов при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы, не отличался от такового РНК, полученного из нативных препаратов п.м.

Учитывая особую опасность деградации РНК в процессе ее выделения, опыты проводили при 4° в условиях, предотвращающих действие РНКазы. Как на ранних этапах выделения п.м., так и при дальнейших операциях, связанных с препаративным выделением РНК, в среду добавляли бентонит (1 мг на 1 мл среды) и додецилсульфат Na в конечной концентрации 0,5%. Для градиентного центрифугирования использовали сахарозу, не содержащую РНКазы.

Как было уже показано ранее (⁷⁻⁹), РНК п.м. гетерогенна, ее основные пики не совпадают с пиками 28S и 18S рРНК. Основная фракция соответствует РНК п.м. 10–12S, минорный компонент 28S, иногда выявляется компонент 3–4S (рис. 1а). рРНК, выделенная в условиях, не препятствующих действию РНКазы, имела только одну фракцию, соответствующую 16S (рис. 1б). Вместе с тем, если РНК п.м. выделяли в тех же условиях, то это особенно не сказывалось на положение ее основного компонента; происходил лишь некоторый его сдвиг в область, соответствующую 8–10S, вместо обычного 10–12S (рис. 1б). Такие различия между поведением рРНК и РНК п.м. в условиях не подавленной активности РНКазы мы рассматривали как дополнительное указание на относительную резистентность к действию РНКазы РНК п.м., даже в изолированном состоянии.

Повышенная чувствительность РНК п.м. к действию РНКазы, по-видимому, обусловлена несколько более выраженной вторичной структурой по сравнению с рРНК, так как было обнаружено, что температура плавления РНК п.м. выше, чем у рРНК (соответственно 59,5 и 58°).

Убедившись, что РНК п.м. не является продуктом ферментативной деградации рРНК, в противовес тому, что предполагают Джулиано и др. (¹⁰), мы перешли к более детальному изучению ЛРНП. Процедура выделения этих комплексов описана ранее (⁷). Полученный при фракционировании липорибонуклеопротеид предварительно подвергали очистке путем гель-фильтрации на колонке сефадекса G-100 (1,5·90 см), при этом он вел себя как однокомпонентное соединение. Частично очищенный ЛРНП подвергали затем ультрацентрифугированию через слой сахарозы (плотность 1,25) на ультрацентрифуге «Спинко», модель L-2-50, ротор SW-50, при 38000 об/мин, в течение 4 час. В таком ЛРНП отношение оптических плотностей при $E_{260/280}$ и $E_{260/230}$ равнялось 1,8.

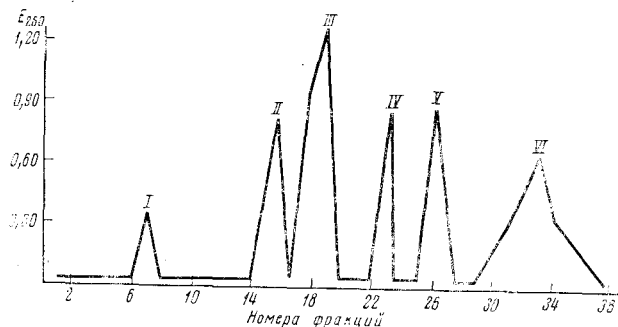


Рис. 2. Ультрацентрифугирование очищенного ЛРНП в градиенте CsCl (1600–1330 р). До центрифугирования пробы выдерживали 6 час. в 4% формальдегиде, рН 7,6. «Спинко» L-2-50, ротор SW-50, 49000 об/мин, 20 час. В отобранных фракциях определяли плавающую плотность на рефрактометре ИРФ-22. I–VI — фракции

После очистки ЛРНП мы обнаружили в нем при помощи чувствительного метода ⁽¹¹⁾ до 14% липидов. Соотношение компонентов в этом комплексе оказалось следующим: 14% липидов, 22,5% белка и 63,5% РНК. Таким образом, были получены прямые данные о действительном существовании в п.м. тройного комплекса — липорибонуклеопротеида. Мы попытались разделить очищенный ЛРНП по плавающей плотности в градиенте CsCl₂ между плотностями 1,600 и 1,330р. Из полученных результатов следует, что ЛРНП гетерогенен и состоит, по крайней мере, из 6 отдельных фрак-

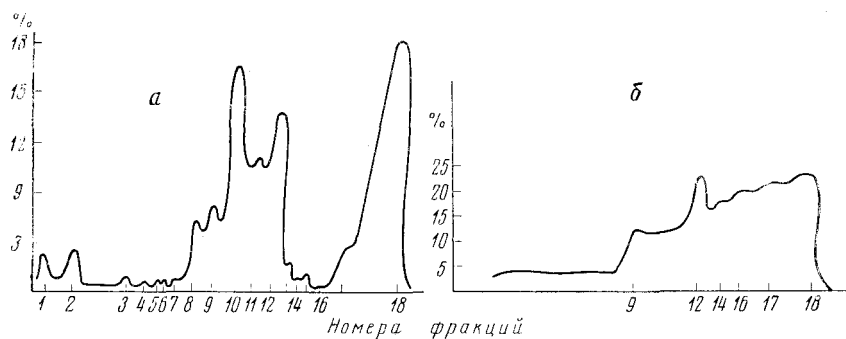


Рис. 3. Электрофорез белков п.м. (а) и ЛРНП (б) на полиакриламидном геле по Лемли ⁽¹³⁾ (денситометрическая кривая, денситометр фирмы «Gilman», США). По оси ординат: относительное содержание белка каждой фракции в процентах от общего белка п.м. или ЛРНП (соответственно), принятого за 100% (с учетом площади каждого пика)

ций. Каждая из этих 6 фракций характеризуется отличной от других величиной $E_{260/280}$ (рис. 2, табл. 1).

Как видно из табл. 1, лишь первая, самая тяжелая, фракция сохраняет такое же соотношение оптических плотностей при $E_{260/280}$, как и в исходном образце. В остальных же фракциях, без какой-либо закономерности, это соотношение снижается от 1,67р до 1,60р. Применяв формулу расчета содержания белка по плавающей плотности для соединений, не содержащих никаких других компонентов, кроме РНК и белка ⁽¹²⁾, получили, что процентное содержание белка в 6 фракциях неправдоподобно

Таблица 1

Гетерогенность липорибонуклеопротеидных комплексов плазматических мембран (ультрацентрифугированные в градиенте хлористого цезия)

№ фракции	Плавающая плотность, г/см ³	$E_{260/280}$	% белка, вычисленный по плавающей плотности	№ фракции	Плавающая плотность, г/см ³	$E_{260/280}$	% белка, вычисленный по плавающей плотности
I	1,600	1,80	41,6	IV	1,500	1,70	58,3
II	1,569	1,67	46,6	V	1,485	1,62	61,6
III	1,533	1,61	53,3	VI	1,433	1,60	70,0

высоко, так как в исходном препарате оно составляет лишь 22,5%. Таким образом, можно полагать, что низкая величина плавающей плотности должна быть обусловлена вкладом липидного компонента, а не увеличением относительного содержания белка.

При анализе белков п.м., предварительно обработанных 0,9% раствором NaCl (при этом экстрагируются растворимые белки, не относящиеся к ЛРНП), методом электрофореза на полиакриламидном геле, при pH 8,3, в присутствии 0,1% Na-додецилсульфата ⁽¹³⁾ было обнаружено 18 белковых фракций, обладающих различной подвижностью и интенсивностью окраши-

Распределение белковых фракций п.м. и ЛРНП, полученных электрофорезом на полиакриламидном геле

Препараты	Фракции *																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
П.м.**	1,8	3,3	3,3	2,2	1,5	1,5	3,0	4,8	8,4	23,5	6,8	12,4	1,5	1,5	3,3	1,5	3,3	16,3
ЛРНП **	—	—	—	—	—	—	—	—	22,6	—	—	24,2	—	8,8	—	8,2	12,0	24,2

* Порядковые номера фракций соответствуют таковым на рис. 3а и б.

** Числа — процентное содержание каждой фракции от общего белка п.м. или ЛРНП. Площадь каждого пика измерена планиметрически, и на этом основании рассчитаны относительные количества каждого пика.

вания кумаси. В аналогичных условиях в ЛРНП можно обнаружить только 6 фракций. Денситометрия и распределение белковых фракций представлены в табл. 2 и на рис. 3.

Поскольку электрофорез проводился в щелочной среде, то гидролитического отщепления липидов от белков, по-видимому, не происходило. Можно думать, что эти фракции ЛРНП соответствуют 6 фракциям, полученным при ультрацентрифугировании его в градиенте CsCl.

Мы полагаем, что приведенные выше экспериментальные данные могут рассматриваться как серьезные основания в пользу реального существования в п.м. ЛРНП как интегрального структурного компонента. Не исключено, что в действительности комплекс может быть более сложным, в его состав могут входить также гликопротеиды или гликолипиды.

Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
21 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. S. Shapot, H. Pitot, Biochim. et biophys. acta, v. 119, 1, 37 (1969). ² N. P. Rodionova, V. S. Shapot, Biochim. et biophys. acta, v. 129, 1, 206 (1966). ³ L. S. Tulegenova, N. P. Rodionova, V. S. Shapot, Biochim. et biophys. acta, v. 166, 1, 265 (1968). ⁴ Л. З. Тулегенова, В. С. Шанор, Биохимия, т. 34, 4, 712 (1969). ⁵ В. С. Шанор, Н. П. Родионова, Мол. биол., т. 3, 5, 785 (1969). ⁶ С. Я. Давыдова, Биохимия, т. 33, 4, 685 (1968). ⁷ S. Ya. Davidova, V. S. Shapot, FEBS Letters, v. 6, 4, 349 (1970). ⁸ V. S. Shapot, S. Ya. Davidova, Progress in Nucleic Acid. Res., v. 11, 81 (1971). ⁹ С. Я. Давыдова, В. С. Шанор и др., ДАН, т. 208, № 5, 1235 (1973). ¹⁰ R. Juliano, J. Ciszowski et al., FEBS Letters, v. 22, 1, 27 (1972). ¹¹ K. Saito, K. Sato, J. Biochem., v. 59, 6, 619 (1966). ¹² A. S. Spirin, N. V. Belitzina, M. N. Lerman, J. Mol. Biol., v. 14, 1, 611 (1965). ¹³ O. K. Laemmli, Nature, v. 227, 5259, 680 (1970).