

Е. В. ЛЮБИМОВА, Т. В. ЧЕРНОВСКАЯ, Е. В. СИДОРОВА,
В. Л. ЛЕЙТИН, М. И. ЛЕРМАН

ВРЕМЯ ЖИЗНИ мРНК ДЛЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА КРЫС

(Представлено академиком А. А. Баевым 8 VII 1975)

Абсолютная скорость синтеза индивидуального белка определяется числом транскрибуемых молекул мРНК и скоростью трансляции. Количество транскрибуемых молекул мРНК зависит как от скорости распада мРНК, так и от скорости поступления мРНК в полирибосомы. Таким образом, концентрация мРНК определяется равновесием двух одновременно протекающих процессов: распада и биосинтеза мРНК, включающего в себя транскрипцию, созревание и транспорт мРНК в полирибосомы.

Используя высокоспецифичный метод выделения полирибосом, синтезирующих альбумин ⁽¹⁾, мы определили время жизни альбуминовой мРНК и время ее созревания и транспорта в полирибосомы. В предыдущей работе было показано, что суммарная мРНК клеток печени функционирует в виде трех метаболических классов, различающихся по стабильности и по времени поступления в полирибосомы ⁽²⁾. Два класса обнаружены в составе свободных полирибосом и третий класс выявлен в связанных с мембранами полирибосомах. Этот третий, наиболее стабильный класс мРНК, в состав которого, по-видимому, входит и мРНК для сывороточного альбумина, составляет 70% всей мРНК клеток печени, поступает в полирибосомы с задержкой в 40 мин. и функционирует там 3,5 часа. На примере альбуминовой мРНК мы исследовали кинетику поступления и накопления в полирибосомах индивидуальной мРНК, принадлежащей одному из трех выявленных классов мРНК.

Опыты проводили на белых, беспородных самцах крыс весом 200–230 г, полученных из питомника «Столбовая» и содержавшихся на стандартной диете. Животным, голодавшим в течение суток до эксперимента, внутрибрюшинно вводили по 100 мкС 2-¹⁴С-оротовой кислоты (фирмы «Изотоп», СССР) с удельной активностью 50 мС/ммоль и забивали через различное время. В опытах по определению доли альбуминовой полиА(+)мРНК от всего количества мРНК для альбумина, синтез новообразованной рРНК подавляли введением внутрибрюшинно актиномицина D (0,250 мг/кг веса животных) за 1 час до введения 2-¹⁴С-оротовой кислоты. Суммарные полирибосомы, полирибосомы, синтезирующие альбумин, и полиА(+)мРНК для альбумина выделяли, как описано ранее ^(1, 3). В каждой временной точке количество матки, вошедшее в полиА(+)мРНК для альбумина, нормировали на 1 мг наносимых на полиУ-целлюлозу полирибосом. Параллельно измеряли удельную активность пула ¹⁴С-уридинфосфатов УМФ+УДФ+УТФ. Для этого печень гомогенизировали в 1,5 объемах раствора «А» (0,25 М сахара, приготовленная на 0,025 М трис-НСl-буфере рН 7,6 с 0,05 М КСl и 0,005 М MgCl₂) и кислотонеосаждаемую фракцию постмитохондриальной надосадочной жидкости (S₁₅), полученную при добавлении HClO₄ к S₁₅ до конечной концентрации 0,3 N, пропускали через колонку (1×10 см) с ионообменной смолой Dowex 50 в H⁺-форме. Фракцию, содержащую УМФ+УДФ+УТФ, собирали и определяли удельную активность пула УМФ+УДФ+УТФ. Далее просчитывали суммарное количество метки, задержавшейся на колонке, и определяли

процент метки в пуле ЦМФ+ЦДФ+ЦТФ от всей метки в пуле УМФ+УДФ+УТФ. Во всех случаях радиоактивность просчитывали на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Mark-II» фирмы «Nuclear Chicago» в диоксановом сцинтилляторе Брея.

Необходимым условием определения стабильности мРНК является постоянство пула меченых предшественников на протяжении эксперимента. Однако насыщение меткой пула предшественников происходит относительно медленно и удельная активность пула не сохраняется на постоянном уровне. В клетках печени крыс после однократного введения ^{14}C -оротовой кислоты удельная активность пула УМФ+УДФ+УТФ растет, достигая максимального значения к 40 мин., а затем снижается. Анализ экспериментальных данных показал, что наблюдаемое падение радиоактивного пула может быть описано уравнением

$$A = A_0 e^{-Kt},$$

где A — удельная активность пула УМФ+УДФ+УТФ во время t , A_0 — значение удельной активности пула УМФ+УДФ+УТФ при экстраполяции кривой к нулевому времени и K — константа скорости, равная в наших экспериментах 0,064 часа $^{-1}$. При построении кривой синтеза новообразованной альбуминовой мРНК мы вносили в экспериментальные данные необходимую поправку на изменяющуюся удельную активность пула предшественников по ранее предложенному методу (4). Для этого в каждое время t вычисляли среднюю удельную активность пула, которая равна количеству метки в УМФ+УДФ+УТФ от нуля до времени t , деленному на время t . Затем количество метки, вошедшее в мРНК за это время, относили на среднюю удельную активность пула УМФ+УДФ+УТФ, получая количество меченой полиА(+)мРНК для альбумина. При внесении поправки не учитывали поведение пула ^{14}C -ЦМФ+ЦДФ+ЦТФ, поскольку оказалось, что в пуле ЦМФ+ЦДФ+ЦТФ находится не более 0,8% метки, обнаруживаемой в пуле УМФ+УДФ+УТФ.

Для описания процесса накопления новообразованной мРНК в делящихся клетках было предложено уравнение (5), которое в применении к покоящимся, неделящимся клеткам печени приобретает вид

$$R = R_\infty [1 - e^{-Kt}], \quad (1)$$

где R — количество метки в мРНК во время t ; R_∞ — количество метки в мРНК по достижении равновесного состояния и K — константа скорости распада меченой мРНК. Известно, что мРНК появляется в полирибосомах с некоторой задержкой (6, 7). Эта задержка обусловлена временем созревания и, возможно, транспорта мРНК в полирибосомы. Мы детализировали уравнение (1), введя значение t_0 , равное лаг-периоду появления мРНК в полирибосомах, и уравнение приняло вид

$$R = R_\infty [1 - e^{-K(t-t_0)}]. \quad (2)$$

Это уравнение, справедливое, если распад мРНК является реакцией первого порядка, а синтез — реакцией нулевого порядка, позволяет определить K , и, следовательно, время полужизни исследуемой мРНК, и t_0 — время ее созревания и транспорта в полирибосомы.

Животным внутрибрюшинно вводили по 100 мкС 2- ^{14}C -оротовой кислоты (в каждой группе 6–9 животных) и забивали через различное время. Печень немедленно гомогенизировали и выделяли суммарные полирибосомы, полирибосомы, синтезирующие альбумин, и полиА(+)мРНК для альбумина. На рис. 1 представлены экспериментально полученные значения радиоактивности в полиА(+)мРНК для альбумина, рассчитанные на 1 мг альбуминовых полирибосом и поправленные на изменяющийся пул радиоактивных предшественников. Компьютерный анализ этих данных показал, что через полученные точки может быть проведена кривая, опи-

сываемая уравнением (2), которая отражает кинетику молярного накопления новообразованной меченой полиА(+)мРНК для альбумина в полирибосомах. Было определено, что $t_0=40$ мин. и $K=0,34$ часа⁻¹, откуда время полужизни полиА(+)мРНК для альбумина равно 2–2,5 час.

Время полужизни овальбуминовой мРНК в отсутствие стимуляции эстрогеном равно 2–3 час. (8), время полужизни мРНК для миоцина также равно 3 час. (9). Для легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов мышинной миеломы МОПС 21 выделены более стабильные мРНК с временем полужизни 12–14 час. (10). Близкое значение времени полужизни получено и для гемоглобиновой мРНК (11).

Функция полиА-сегментов, находящихся на 3'-конце молекул мРНК, до настоящего времени не ясна. В суммарной мРНК клеток печени фракция полиА(+)мРНК составляет 30–40% (3, 12). ПолиА-содержащая фракция альбуминовой мРНК в условиях, когда синтез рРНК подавлен малыми дозами актиномицина D, также составляет 30% от всей мРНК для альбумина. Таким образом, альбуминовая мРНК не отличается от суммарной мРНК по соотношению полиА(+)- и полиА(-)-фракций. Ранее мы показали, что не существует каких-либо значительных различий между стабильностью полиА(+)- и полиА(-)-фракций суммарной мРНК клеток печени: кривые кинетики синтеза этих фракций полностью идентичны (3). Показано также, что ни исходная длина, ни скорость укорачивания полиА-сегментов не определяют время жизни мРНК (13). Поэтому полученные нами данные по стабильности альбуминовой полиА(+)мРНК можно отнести ко всей популяции мРНК для альбумина.

Рядом авторов в опытах по гибридизации полиА(+)- и полиА(-)-фракций суммарной мРНК с комплементарной ДНК (кДНК), синтезированной с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы на полиА(+)-молекулах, были получены данные, указывающие на различия в нуклеотидных последовательностях полиА(+) и полиА(-) молекул мРНК (14). В случае альбуминовой мРНК молекулы полиА(+) и полиА(-) генетически равнозначны, поскольку метод выделения альбуминовых полирибосом и, следовательно, альбуминовой мРНК основан на взаимодействии антител к альбумину с растущими на полирибосомах полипептидными цепями альбумина.

Таким образом, в клетках печени крыс в связанных с мембранами полирибосомах обнаруживается альбуминовая мРНК, представленная полиА(+)- и полиА(-)-молекулами. Как полиА(+)-, так и полиА(-)-фракции альбуминовой мРНК функционально активны и составляют 30 и 70% соответственно. Время полужизни альбуминовой мРНК равно 2–2,5 час., и она поступает в полирибосомы с задержкой в 30–40 мин. В связанных с мембранами полирибосомах нами обнаружен один из трех метаболических классов суммарной мРНК с временем жизни 3,5 часа. Лаг-период поступления этого класса мРНК в полирибосомы равен 40 мин. Можно, по-видимому, сделать вывод, что индивидуальные мРНК, входящие в выявленные метаболические классы мРНК, имеют одно и то же время созревания и транспорта из ядра в полирибосомы и довольно близкие значения времени жизни.

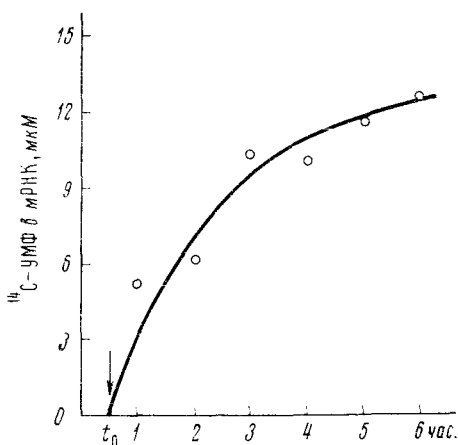


Рис. 1. Кинетика молярного накопления полиА(+)мРНК для альбумина

Используя некоторые литературные данные и величину времени жизни альбуминовой мРНК, полученную в данной работе, можно рассчитать количество функционирующих генов, достаточное для поддержания в клетках печени необходимой концентрации мРНК для альбумина. Подобный расчет был сделан для определения количества генов гемоглобиновой мРНК (¹¹). Известно, что 20–25% всей мРНК клеток печени представлено молекулами мРНК для альбумина или 40 000 молекулами (¹). Время жизни альбуминовой мРНК равно 3 час. Это значит, что каждые 3 часа в ядре должно синтезироваться по крайней мере 40 000 молекул про-мРНК. Если принять, что молекула предшественника имеет 12 000 нуклеотидов (45S), и молекулы РНК-полимеразы расположены на цистроне через каждые 55 нуклеотидов и работают со скоростью 90–100 нуклеотидов в 1 сек. (¹⁵), то три-четыре активных гена могут обеспечить клетку необходимым количеством матриц для синтеза альбумина.

Авторы выражают благодарность С. Е. Сно за математическую обработку экспериментальных данных и Е. С. Бреслер за квалифицированную техническую помощь.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
30 VI 1975

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. V. Sidorova, M. G. Trudolyubova, M. I. Lerman, Mol. Biol. Rep., v. 1, 401 (1974).
- ² E. V. Lubimova, T. V. Chernovskaya, M. I. Lerman, Mol. Biol. Rep., in press.
- ³ О. В. Подобед, Е. В. Брыкина и др., Мол. биол., т. 8, 936 (1974).
- ⁴ B. P. Brandhorst, T. Humphreys, Biochemistry, v. 10, 877 (1971).
- ⁵ J. R. Greenberg, Nature, v. 240, 102 (1972).
- ⁶ M. Penman, G. Vesco, S. Penman, J. Mol. Biol., v. 34, 49 (1968).
- ⁷ В. Л. Лейтин, О. В. Подобед, М. И. Лерман, Биохимия, т. 37, 65 (1972).
- ⁸ R. D. Palmiter, N. H. Carey, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 2357 (1974).
- ⁹ A. Przybyla, R. C. Strohman, ibid., v. 71, 662 (1974).
- ¹⁰ N. J. Cowan, C. Milstein, J. Mol. Biol., v. 82, 469 (1974).
- ¹¹ J. A. Hunt, Biochem. J., v. 138, 487 (1974).
- ¹² О. В. Подобед, В. Л. Лейтин и др., Мол. биол., т. 7, 343 (1973).
- ¹³ E. V. Brykina (Lubimova), O. V. Podobed et al., Mol. Biol. Rep., v. 1, 417 (1974).
- ¹⁴ C. Milcarek, R. P. Price, S. Penman, Cell., v. 3, 1 (1974).
- ¹⁵ J. R. Greenberg, S. Penman, Mol. Biol., v. 21, 527 (1966).