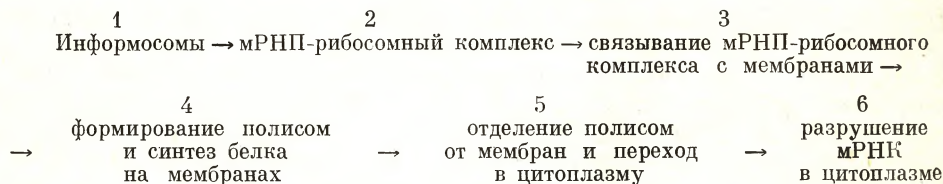


В. А. АРБУЗОВ, Т. Ф. ГРИЦАЕВА

**БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ
И СВОБОДНЫХ ПОЛИРИБОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ
И САРКОМЫ М-1 КРЫС В УСЛОВИЯХ БЕСКЛЕТОЧНОЙ
СИСТЕМЫ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 15 III 1976)

Процессы транскрипции и трансляции у бактерий *in vivo* происходят на цитоплазматических мембранах (^{1, 2}). Синтезирующаяся мРНК бактерий в составе полирибосом первоначально обнаруживается в связи с ДНК-мембранным комплексом (¹). В дальнейшем мРНК отделяется от цитоплазматических мембран, переходит в цитоплазму и разрушается (³). Таким образом, мРНК бактерий, находясь в связи с цитоплазматическими мембранами бактерий, отличается стабильностью, а при переходе в цитоплазму начинает разрушаться. Защита мембраносвязанных полисом от нуклеазной атаки может иметь физиологическое значение, так как основной синтез белка у бактерий происходит именно на этих клеточных структурах (¹). На культуре клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (эукариоты) также показано (^{4, 5}), что первичное формирование полисом происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума с последующим их появлением в цитоплазме. Имеющиеся данные показывают важную роль внутриклеточных мембран в метаболизме мРНК в клетках как про- (²), так и эукариотов (⁶). Сопоставление экспериментальных данных позволило нам предположить следующую схему метаболизма мРНК, ответственной за синтез внутриклеточных белков в клетках эукариотов (⁶):



Эта схема предполагает, что функционирование мРНК на мембранах эндоплазматического ретикулума в клетках эукариотов (стадии 4—6) может быть аналогичным функционированию мРНК на цитоплазматических мембранах бактерий (^{1—3, 7}). Если предложенная схема верна, то можно предположить, что свободные полисомы цитоплазмы должны быть менее активными в синтезе белка, чем мембраносвязанные полисомы, за счет того что мРНК в них уже в той или иной степени разрушена (дефицит мРНК).

Для проверки этой гипотезы мы исследовали синтез белка на мембраносвязанных и свободных полисомах клеток печени крыс в бесклеточной системе. Белоксинтезирующую активность обеих фракций полисом исследовали также при добавлении экзогенной матрицы (полиУ). Кроме того, в настоящей работе определялась белоксинтезирующая активность *in vitro* мембраносвязанных и свободных полисом, полученных из клеток саркомы М-1 крыс.

В работе использовалась перевиваемая саркома М-1 (на 14-й день) и печень белых беспородных крыс (100—150 г). Свободные и мембраносвя-

занные рибосомы из печени и саркомы получали по методу ⁽⁸⁾. Клеточный сок получали методом гель-фильтрации пострибосомальных фракций через колонку с сефадексом G-25 (fine) ⁽⁹⁾. Бесклеточная система синтеза белка (1 мл) содержала (конечная концентрация в ммольях): трис-HCl-буферный раствор (рН 7,5) 50; KCl 25; MgCl₂ 5; АТФ («Reanal») 0,5;

Таблица 1

Содержание РНК в мембраносвязанных и свободных полисомах клеток печени и саркомы М-1 крыс

Источник получения полирибосом	Фракция полирибосом	Содержание РНК, мг	Содержание РНК, %
Печень	Мембраносвязанные	7,09	64,9
	Свободные	3,84	35,1
Саркома М-1	Мембраносвязанные	1,18	13,3
	Свободные	7,68	86,7

ГТФ («Reanal») 0,25; ФЭП 5; β-меркаптоэтанол 5; пируваткиназа 10 мкг; 19 немеченых аминокислот по 0,1; ¹⁴C-фенилаланин («Amersham») 0,1 (4 мкС; 495 С/ммоль); белок клеточного сока 4–5 мг; РНК полисом 100–150 мкг. Пробы инкубировали при 37° в течение 30 мин., после чего к ним прибавляли 1 мл 10-процентного раствора ТХУ, содержащего 0,1% немеченого фенилаланина. После этого пробы инкубировали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Кислотонерастворимый материал собирали центрифугированием и промывали 5-процентным раствором ТХУ и дважды смесью спирт — эфир (1:1; v/v). Конечные осадки суспендировали в 0,2 мл 0,3 N NaOH и 0,1 мл суспензии наносили на мишени. Радиоактивность подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Wallak» (ЛКВ, Швеция) в диоксановом сцинтилляторе Брея. Содержание РНК во фракциях мембраносвязанных и свободных рибосом определяли по методу ⁽¹⁰⁾, принимая, что 1 единица экстинкции при 260 нм соответствует 32 мкг РНК. Содержание белка определяли по методу Лоури и сотрудников ⁽¹¹⁾.

Прежде всего мы определили соотношение мембраносвязанных и свободных рибосом в печени и саркоме М-1. Результаты этих опытов представлены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что основная часть рибосом печени (≈65%) связана с мембранами эндоплазматического ретикулума и лишь 35% определяется во фракции свободных рибосом. В то же время в саркоме М-1 лишь 13% рибосом связано с мембранами, а 87% определяется во фракции свободных рибосом. Эти данные хорошо согласуются с данными других авторов по соотношению мембраносвязанных и свободных рибосом в клетках нормальной печени и гепатомы ⁽¹²⁾.

Полученные данные позволяют предполагать, что в нормальных клетках печени полирибосомы функционируют в основном в связи с мембранами эндоплазматического ретикулума. В то же время в опухолевых клетках (гепатома ⁽¹²⁾ и саркома) полисомы функционируют в свободном от мембран состоянии, т. е. в цитоплазме. Для прямой проверки этого предположения мы исследовали белоксинтезирующую активность мембраносвязанных и свободных рибосом печени и саркомы М-1 в бесклеточной системе синтеза белка. Как видно из табл. 2, мембраносвязанные полисомы печени более активны в синтезе белка in vitro, чем свободные рибосомы. Действительно, мембраносвязанные рибосомы включали ¹⁴C-фенилаланин в полипептиды (в расчете на 1 мг РНК) в 2,5 раза больше, чем свободные рибосомы. Удельная радиоактивность белка была также выше в случае мембраносвязанных рибосом.

При добавлении в инкубационную смесь экзогенной матрицы (полиУ, 0,2 мг) отмечается уменьшение белоксинтезирующей способности мембраносвязанных полисом и увеличение активности свободных полисом. Эти данные могут говорить в пользу того, что в цитоплазме клеток нормальной печени отмечается дефицит матриц.

Таблица 2

Белоксинтезирующая активность мембраносвязанных и свободных полирибосом клеток печени в условиях бесклеточной системы

Условия опыта	Тип полирибосом	РНК, мг	Белок, мг	Радиоактивность		Уд. радиоактивность белка, нС на 1 мг белка
				нС	нС/мг РНК	
Без полиУ	Мембраносвязанные	0,117	5,2	0,59	5,1	0,11
	Свободные	0,151	4,2	0,345	2,0	0,08
С полиУ	Мембраносвязанные	0,117	4,8	0,265	2,2	0,054
	Свободные	0,151	3,68	0,445	3,0	0,12

Примечание. Здесь и в табл. 3 количество белка в пробах определяли после их отмывки ТХУ и смесью спирт — эфир ⁽¹³⁾.

Таблица 3

Белоксинтезирующая активность мембраносвязанных и свободных полирибосом клеток саркомы М-1 в условиях бесклеточной системы

Условия опыта	Тип полирибосом	РНК, мг	Белок, мг	Радиоактивность, нС	Радиоактивность, нС/мг РНК	Уд. радиоактивность белка, нС на 1 мг белка
Без полиУ	Мембраносвязанные	0,118	4,2	0,11	0,9	0,026
	Свободные	0,154	3,8	0,58	3,1	0,153
С полиУ	Мембраносвязанные	0,118	4,64	0,074	0,62	0,016
	Свободные	0,154	4,64	0,56	3,6	0,12

В случае саркомы М-1 (табл. 3) свободные рибосомы более активны ($\approx$ в 3 раза) в синтезе белка *in vitro* по сравнению с мембраносвязанными рибосомами, причем, в отличие от клеток нормальной печени (табл. 2), добавление полиУ практически не изменяло белоксинтезирующую активность свободных полирибосом клеток саркомы М-1 (табл. 3).

Таким образом, в нормальных клетках печени мРНК функционирует скорее всего в связи с мембранами эндоплазматического ретикулама. В то же время в опухолевых клетках (саркома М-1) основной синтез белка происходит, по-видимому, в цитоплазме на свободных полисомах.

Ранее нами было показано, что стабильность мРНК, являясь одним из факторов регуляции синтеза белка, сама подвержена регулирующему контролю со стороны процесса трансляции по типу обратной связи как у бактерий ^(1-3, 7), так и в нормальных клетках эукариотов ⁽⁸⁾, причем «узловой» точкой этой регуляции является взаимодействие мРНК с внутриклеточными мембранами ⁽²⁾. Была высказана гипотеза ^(2, 3, 6), согласно которой сам белок, синтезировавшись в определенном количестве, способствует отделению мРНК от мембран, ее переходу в цитоплазму, где и происходит разрушение матриц. Скорость же разрушения мРНК в цитоплазме не регулируется белковым синтезом ^(1, 2). В то же время, в отличие от нормальных клеток, в опухолевых клетках (саркома М-1 крыс) процесс деградации мРНК не зависит от процесса трансляции ⁽⁶⁾. Отсутствие регу-

ляции метаболизма мРНК белковым синтезом в опухолевых клетках может быть связано с тем, что основная часть полисом в опухолях функционирует в свободном состоянии в цитоплазме (табл. 3), т. е. вне связи с внутриклеточными мембранами.

Лаборатория энзимологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
15 III 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Арбузов, С. Р. Мардашев, Биохимия, т. 40, 1004 (1975). ² В. А. Арбузов, В сб.: Усп. биол. хим., т. 18, 1976. ³ В. А. Арбузов, С. Р. Мардашев, Биохимия, т. 39, 851 (1974). ⁴ K. U. Shiokawa, A. O. Pogo, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 71, 2658 (1974). ⁵ L. Braines, A. O. Pogo, Europ. J. Biochem., v. 54, 317 (1975). ⁶ В. А. Арбузов, Биохимия, т. 41, № 8 (1976). ⁷ В. А. Арбузов, С. Р. Мардашев, III Всесоюзн. биохим. съезд, Реф. научн. сообщ., т. 2, Рига, 1974, стр. 137. ⁸ G. Blobel, V. R. Potter, J. Mol. Biol., v. 26, 279 (1967). ⁹ A. R. Hunter, A. Korner, Biochim. et biophys. acta, v. 179, 115 (1969). ¹⁰ H. N. Munro, A. Fleck, The Analyst, v. 91, 78 (1966). ¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ¹² K. Uenoyama, T. Ono, Biochim. et biophys. acta, v. 281, 124 (1972). ¹³ Е. П. Феодулова, В. А. Арбузов, Микробиология, т. 44, 395 (1975).