

А. В. ЛИХТЕНШТЕЙН, М. М. ЗАБОЙКИН, В. С. ШАПОВ

АССОЦИАЦИЯ ЯДЕРНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ ЧАСТИЦ С ХРОМАТИНОМ В КЛЕТКАХ КРЫСИНОЙ АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ

(Представлено академиком А. А. Базевым 14 XI 1975)

Известно, что в ядрах клеток высших организмов гетерогенная РНК находится в виде рибонуклеопротеидных комплексов (РНП-комплексов) (1-3). При исследовании ядерных РНП-частиц печени крысы мы обратили внимание на два обстоятельства. Во-первых, хроматографические профили РНП-частиц при их анализе методом нуклеопротеид-целит (НПЦ)-хроматографии (градиентная элюция РНК из РНП-частиц, фиксированных на адсорбенте целите) (4, 5) резко изменялись в том случае, если частицы предварительно обрабатывали ДНКазой, и, во-вторых, значительная часть меченных ^{14}C -оротовой кислотой частиц, экстрагированных из очищенных ядер известными методами (1, 6), осаждалась вместе с хроматином при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Оказалось также, что озвучивание хроматина резко повышает выход РНП-частиц. Вместе с тем, казалась маловероятной возможность механического захвата свободных РНП-частиц глыбками геля хроматина, образующегося при экстракции ядер солевыми растворами, поскольку экзогенные меченые РНП-частицы, внесенные в экстрагирующий раствор, не подвергались такому захвату.

Эти наблюдения заставили предположить, что ядерные РНП-частицы каким-то образом ассоциированы с хроматином. Для выяснения этого вопроса последующие опыты проводили на клетках асцитной гепатомы Зайделя, активная пролиферация которых позволяет получить высокомечеными как РНК, так и ДНК. Преимуществом в работе с ядерными РНП-частицами оказалось и то обстоятельство, что в клетках гепатомы Зайделя, как и во многих других быстропролиферирующих опухолевых клетках, резко подавлена нуклеазная активность.

Клетки гепатомы Зайделя метили ^3H -тимидином, вводя крысам внутривенно на 3-й и 4-й день после перевивки опухоли по 40 мкС изотопа. На 5-й день после перевивки опухоли и через сутки после последней инъекции ^3H -тимидина асцитные клетки извлекали, отмывали холодным физиологическим раствором и инкубировали в среде Игла с 10% бычьей сывороткой в течение 1,5 час. в присутствии ^{14}C -уридина (1 мкС/мл). Затем клетки подвергали осмотическому шоку, гомогенизировали в проточном гомогенизаторе и получали грубый ядерный осадок центрифугированием при 1000 g 10 мин. Ядра суспендировали в растворе сахарозы, плотность которого доводили до 1,263 г/см³ и который содержал 0,005 M MgCl_2 , 0,05 M KCl , 0,025 M трис- HCl , pH 7,6 и центрифугировали при 23 000 об/мин, 4° в течение 60 мин. (центрифуга «Spinco» L2-50, ротор SW25.2). Ядерные РНП-частицы получали из очищенных ядер или экстракцией солевыми растворами (4) («экстрагированные» частицы) или ультразвуковой обработкой ядер с последующим отделением ядрышек и хроматина центрифугированием в градиенте сахарозы (6) («озвученные» частицы). Градиентную элюцию РНК из колонки нуклеопротеид-целита проводили как описано ранее (4, 5). Двойную метку подсчитывали при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика «Nuclear Chicago

Mark 2» в гомогенной системе, используя смесь тритон X100 — толуол (1 : 2), содержащую 0,2 г РОРОР и 4 г РРО на 1 л толуола.

«Экстрагированные» частицы подвергали НПЦ-хроматографии. Поскольку белок РНП-частиц остается необратимо связанным с целитом, а нуклеиновые кислоты сами по себе не сорбируются на нем, то связь частицы осуществляется только через белковый компонент. Подаваемый на колонку линейный градиент LiCl-мочевины, вызывая диссоциацию комплекса РНК — белок, приводит к высвобождению молекул РНК и их фракционированию соответственно прочности (устойчивости к диссоциации)

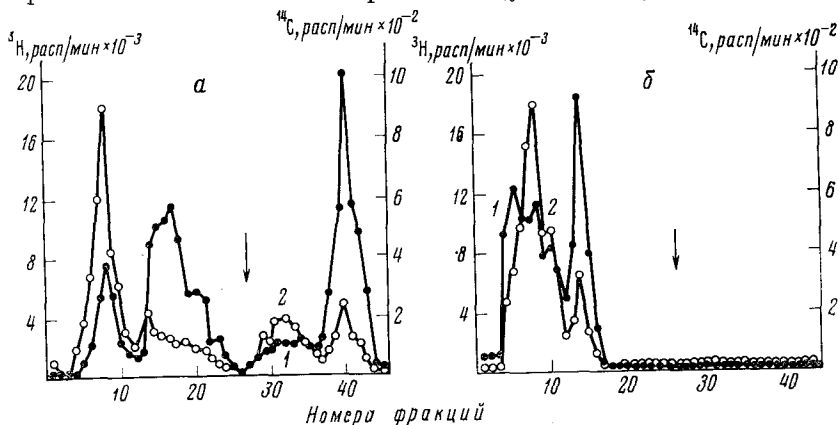


Рис. 1. НПЦ-хроматография ядерных «экстрагированных» РНП-частиц. а — непосредственно после экстракции, б — после обработки панкреатической ДНКазой. 1 — радиоактивность ^3H -тимидина; 2 — радиоактивность ^{14}C -уридина. Стрелка указывает начало градиента температуры

их связей с белком в нативной частице. Для диссоциации комплексов РНК — белок и элюции РНК использовали линейный градиент от буфера ТМ (0,005 M MgCl_2 , 0,02 M трис- HCl , pH 7,6) до буфера ТМ с 2 M LiCl и 4 M мочевиной при 37°. По завершении градиента соль — мочевина повышали температуру от 37 до 98° при использовании 2 M LiCl, 4 M мочевины как элюента. На рис. 1а показан хроматографический профиль РНК «экстрагированных» частиц, не очищенных предварительно в градиенте плотности сахарозы, поскольку большая часть метки РНК осаждалась при этом вместе с хроматином на дно центрифужной пробирки. Судя по радиоактивной метке, РНК разделяется НПЦ-хроматографией на несколько фракций, что интерпретировалось в наших предыдущих работах как свидетельство гетерогенности самих ядерных РНП-частиц в отношении прочности связи РНК — белок ($^5, ^7$). Обращает на себя внимание, однако, тот факт, что во всех фракциях РНК обнаруживается метка ДНК. Присутствие ДНК выявляется также аналитически реакцией по Бартону, и ее количество по отношению к РНК колеблется от крайне незначительного (2—4%) во фракциях (1—10), содержащих основную массу РНК, до 30% во фракциях, особенно прочно связанных с целитом (35—45) и включающих, по-видимому, более длинные фрагменты ДНК. Последнее предположение подкрепляется тем, что после удаления в градиенте сахарозы из препарата «экстрагированных» частиц быстроседimentирующих структур прочно связанные с колонкой фракции ДНК и РНК исчезают. Таким образом, НПЦ-хроматография разделяет молекулы как РНК, так и ДНК, которые, судя по совпадению их меток, могут входить в состав одних и тех же комплексов.

Свидетельством того, что в данном случае имеет место именно ассоциация РНК и ДНК, а не простое совпадение их хроматографического положения, являются результаты опыта, представленного на рис. 1б. Видно, что предварительная обработка препарата РНП-частиц ДНКазой, свободной от примеси РНКаз («Worthington», 30 мин., 37°, 50 мкг/мл), приводит

к резкому изменению хроматографического профиля не только ДНК, но и РНК, причем так же, как и в предыдущем случае, обнаруживается совпадение меток ^3H -тимидина и ^{14}C -уридина.

В следующем опыте исследовали плотностное распределение в преформированном градиенте CsCl «экстрагированных» и фиксированных 5% формальдегидом частиц, меченных, как и прежде, двойной меткой. И в этом случае видно совпадение меток РНК и ДНК, молекулы которых, по-видимому, входят в одни и те же комплексы с плавающей плотностью

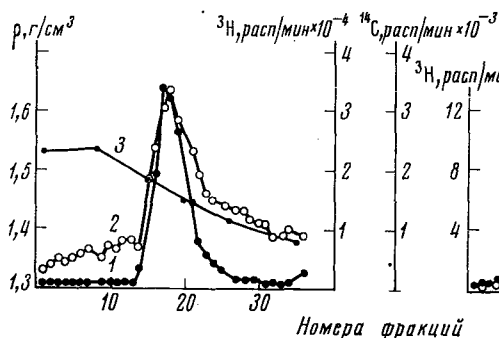


Рис. 2

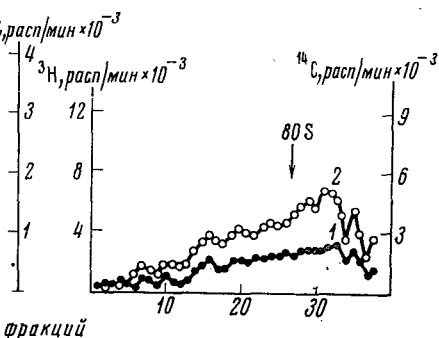


Рис. 3

Рис. 2. Плотностное распределение ядерных «экстрагированных» РНК-частиц. 1 — радиоактивность ^3H -тимидина; 2 — радиоактивность ^{14}C -уридина; 3 — плавающая плотность

Рис. 3. Седиментационное распределение ядерных «озвученных» РНК-частиц в градиенте (10—35%) сахарозы. 1 — радиоактивность ^3H -тимидина; 2 — радиоактивность ^{14}C -уридина

около $1,45 \text{ г/см}^3$ (рис. 2). Согласно предварительным данным, плавающая плотность комплексов снижается вплоть до $1,40 \text{ г/см}^3$ по мере снижения относительного содержания в них ДНК в результате обработки препарата ДНКазой или ультразвуком.

В предыдущих опытах использовали препараты РНК-частиц, экстрагированных из ядер солевыми растворами и не подвергавшихся в последующем очистке центрифугированием в градиенте сахарозы. Для выяснения того, позволяет ли этот этап (центрифугирование в градиенте сахарозы) отделить РНК-частицы от структур хроматина, выделение РНК-частиц проводили методом (6), включающим озвучивание ядер, отделение ядрышек и седиментацию постядрышковой надосадочной жидкости в градиенте (10—35%) сахарозы (центрифуга «Spinco» L2-50, ротор SW25.2, 23 000 об/мин, 3,5 часа, 4°). На рис. 3 видно, что ядерные РНК-частицы имеют гетерогенное распределение (коэффициенты седиментации от 20 до 240S), причем присутствие очень больших частиц, по-видимому, обусловлено резко сниженной в гепатоме Зайделя нуклеазной активностью. Видно также, что хотя содержание ДНК (по отношению $^3\text{H}/^{14}\text{C}$), благодаря использованию такой процедуры, резко снижается, она тем не менее присутствует во всех фракциях градиента сахарозы.

Таким образом, использование радиоизотопного метода позволяет обнаружить в ядерных РНК-частицах фрагмент ДНК, количественное содержание которого в большинстве случаев, видимо, слишком мало для того, чтобы можно было легко обнаружить аналитическими методами (8, 9). Применение трех независимых методов анализа показывает, что ДНК не является случайной примесью, а скорее всего ассоциирована с РНК-частицей. Судя по предварительным данным, связь РНК с ДНК в «экстрагированных» частицах осуществляется через белок, поскольку хроматография на колонке оксианатита «экстрагированных» частиц, предварительно депротеинизированных смесью фенол — хлороформ (1 : 1) с 0,5% додецил-

сульфата натрия при 20°, приводит к разделению меток РНК и ДНК (первая элюируется в зоне однонитевых, а вторая — двунитевых молекул).

Полученные данные свидетельствуют, на наш взгляд, о том, что ядерные РНП-частицы ассоциированы со структурами хроматина, лишь после фрагментации которого под действием эндогенных ДНКаз или ультразвука они солибилизируются и образуют медленно седиментирующие в градиенте сахарозы структуры, несущие, однако, в виде фрагмента тот участок ДНК, с которым они первоначально связаны. Величина этого фрагмента, по-видимому, может варьировать в широких пределах в зависимости от степени фрагментации хроматина. Именно о такой возможности свидетельствуют резкие различия в отношении меток $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ в препаратах, полученных из одних и тех же ядер, но различными методами (ср. рис. 2 и 3, обратив внимание на различные масштабы). Можно ожидать, что в тканях с низкой нуклеазной активностью величина этого фрагмента в «экстрагированных» частицах будет относительно больше. Если допустить, что экстракция РНП-частиц из ядер возможна лишь в результате фрагментации хроматина, то становится понятным, почему она затруднена из ядер клеток с низкой нуклеазной активностью и облегчается в этих случаях инкубацией ядер при 37°, т. е. в условиях, благоприятствующих действию эндогенных нуклеолитических ферментов (², ⁶).

Кажется вероятным, что обнаруженные недавно нуклеопротеидные частицы, содержащие «информационную» ДНК (¹⁰), являются не чем иным как ядерными РНП, несущими фрагмент меченой ДНК и попавшими в цитоплазму в результате повреждения ядерной оболочки.

В многочисленных работах ранее было показано существование ассоциированных со структурами хроматина высокомолекулярных, быстро-мещающихся РНК, которые рассматривались как насцирующие молекулы (см., например, (¹¹)). В настоящей работе, однако, показана ассоциация с хроматином быстро-мещающихся РНК, большую часть которых должны, видимо, составлять уже завершенные, а не насцирующие молекулы, если учесть, что в наших опытах РНК метили 90 мин., а время синтеза молекулы гигантской ядерной РНК составляет 5—10 мин. (¹²). Таким образом, представленные данные подтверждают присутствие фрагмента ДНК в ядерных РНП-частицах (¹⁴) и заставляют предположить ассоциацию по крайней мере некоторых РНП-частиц с хроматином в посттранскрипционном периоде, что соответствует имеющимся в литературе наблюдениям (¹³). В связи с этим возникает вопрос, не проходят ли новосинтезированные РНК через последовательные этапы внутриядерного процессинга и транспорта к аппарату ядерных пор, сохраняя в то же время связь со структурами хроматина.

Вместе с тем, нельзя исключить и той возможности, что в ядерном соке присутствует значительное количество свободных частиц, которые, однако, не будучи связаны со структурами хроматина, легко экстрагируются из ядер гипертоническим раствором сахарозы при выделении очищенных ядер.

Институт экспериментальной и
клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
10 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. П. Самарина, И. С. Асриян, Г. П. Георгиев, ДАН, т. 163, 1510 (1965).
- ² E. M. Lukanidin, E. S. Zalmanson et al., Nature New Biol., v. 238, 193 (1972).
- ³ J. T. Parsons, K. S. McCarty, J. Biol. Chem., v. 243, 5377 (1968). ⁴ A. V. Lichtenstein, R. P. Alechina, V. S. Shapot, FEBS Letters, v. 23, 254 (1972). ⁵ A. V. Lichtenstein, R. P. Alechina, V. S. Shapot, Biochem. J., v. 147, 447 (1975). ⁶ T. Pederson, J. Mol. Biol., v. 83, 163 (1974). ⁷ V. S. Shapot, A. V. Lichtenstein, Neoplasma, v. 20, 555 (1973). ⁸ I. Faiferman, M. G. Hamilton, A. O. Pogo, Biochim. et biophys. acta, v. 204, 550 (1970). ⁹ T. Pederson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 3, 617 (1974). ¹⁰ E. Bell, Nature, v. 224, 326 (1969). ¹¹ J. Monahan, R. H. Hall, Biochim. et biophys. acta, v. 383, 40 (1975). ¹² B. P. Brandhorst, E. H. McConkey, J. Mol. Biol., v. 85, 451 (1974). ¹³ К. Г. Газарян, В. А. Лунасова и др., Мол. биол., т. 5, 5, 680 (1971). ¹⁴ H. Naora, Biochim. et biophys. acta, v. 174, 137 (1969).