

ОБНАРУЖЕНИЕ РНК ИНТРАЦИСТЕРНАЛЬНЫХ А-ЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ПОЛИСОМНОЙ ПОЛИ(А)+РНК ПЕЧЕНИ КРЫС

О. А. Куприянова, Н. П. Корохов, В. П. Томсонс, Е. В. Киселева,
С. Н. Вишневский, Н. Б. Христолюбова, Н. П. Мертведов, Р. И. Салганик

Интрацистернальные А-частицы (ИАЧ) представляют собой ретровирусоподобные структуры, которые были обнаружены в цистернах эндоплазматического ретикулаума в клетках опухолей и эмбрионов животных ранних стадий развития [1]. В последние годы ИАЧ выявлены также в тканях взрослых животных [2—4]. В составе таких частиц идентифицирована полиаденилированная РНК и обратная транскриптаза [5, 6]. Эти непатогенные и неинфекционные частицы относят к эндогенным ретровирусам позвоночных [1].

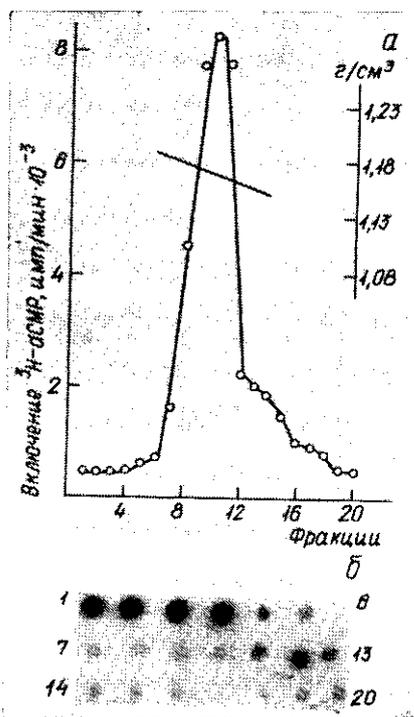
В хромосомах мышей, хомячков, крыс обнаружены нуклеотидные последовательности ДНК, комплементарные РНК ИАЧ, число которых составляет от нескольких сотен до нескольких тысяч копий на гаплоидный геном [7].

Показано, что интеграция генов ИАЧ в разные участки генома млекопитающих изменяет уровень транскрипции находящихся по соседству с ними генов [8—10]. Эти данные указывают на то, что ИАЧ выполняют функции эндогенных инсерционных мутагенов. По-видимому, ИАЧ, как и иные мобильные генетические элементы, могут служить факторами эволюции, обеспечивающими рекомбинационные процессы в геноме, которые ведут к существенным изменениям признаков вида. Представлялось вероятным, что наряду с этим ИАЧ выполняют и какие-то иные физиологические функции, например обеспечение клеток обратной транскриптазой для амплификации генов в условиях интенсивной транскрипции их.

В настоящей работе поли(А)+РНК ИАЧ впервые обнаружена в составе полисом клеток печени крыс. Эти данные указывают на то, что в тканях взрослых животных происходит трансляция поли(А)+РНК ИАЧ, кодируемой генами этих частиц.

Рис. 1. Распределение эндогенной РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности (а) и РНК ИАЧ (б) микросомального осадка печени крыс в градиенте плотности сахарозы. Аликвоты РНК фракций сахарозного градиента гибридизовали с 32 P-ДНК ИАЧ мышей

Fig. 1. Distribution of endogenous RNA-dependent DNA-polymerase activity (a) and IAP RNA (b) of rat liver microsomal pellet in the sucrose density gradient. Aliquots of RNA from the sucrose gradient fractions were probed with 32 P-IAP DNA of mice



В опытах использовали крыс линии Вистар весом 120—150 г. Постмитохондриальный супернатант гомогената печени [11] центрифугировали при 165 000 g (4 °C, 60 мин), и осадок насливали на линейный градиент сахарозы (20—50 %). После центрифугирования при 165 000 g (4 °C, 18 ч, ротор WS 50,1, «Beckman», США) собирали фракции по 150—200 мкл и исследовали РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность на эндогенных матрицах в присутствии актиномина Д [12]. Из тех же фракций градиента выделяли РНК по [13] и гибридизовали их с 32 P-ДНК ИАЧ мышей, как описано в [4]. В качестве зонда использовали провирусную ДНК ИАЧ мышей. Плазмида pBR322 с интегрированным *BamHI-EcoRI*-фрагментом ИАЧ длиной 2200 пар нуклеотидов клона Mm22 [14] была получена от Д. А. Крамерова (Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва). Поли(А)+РНК выделяли с помощью аффинной хроматографии на поли(У)-сефарозе 4В из полисом, которые осаждали из постмитохондри-

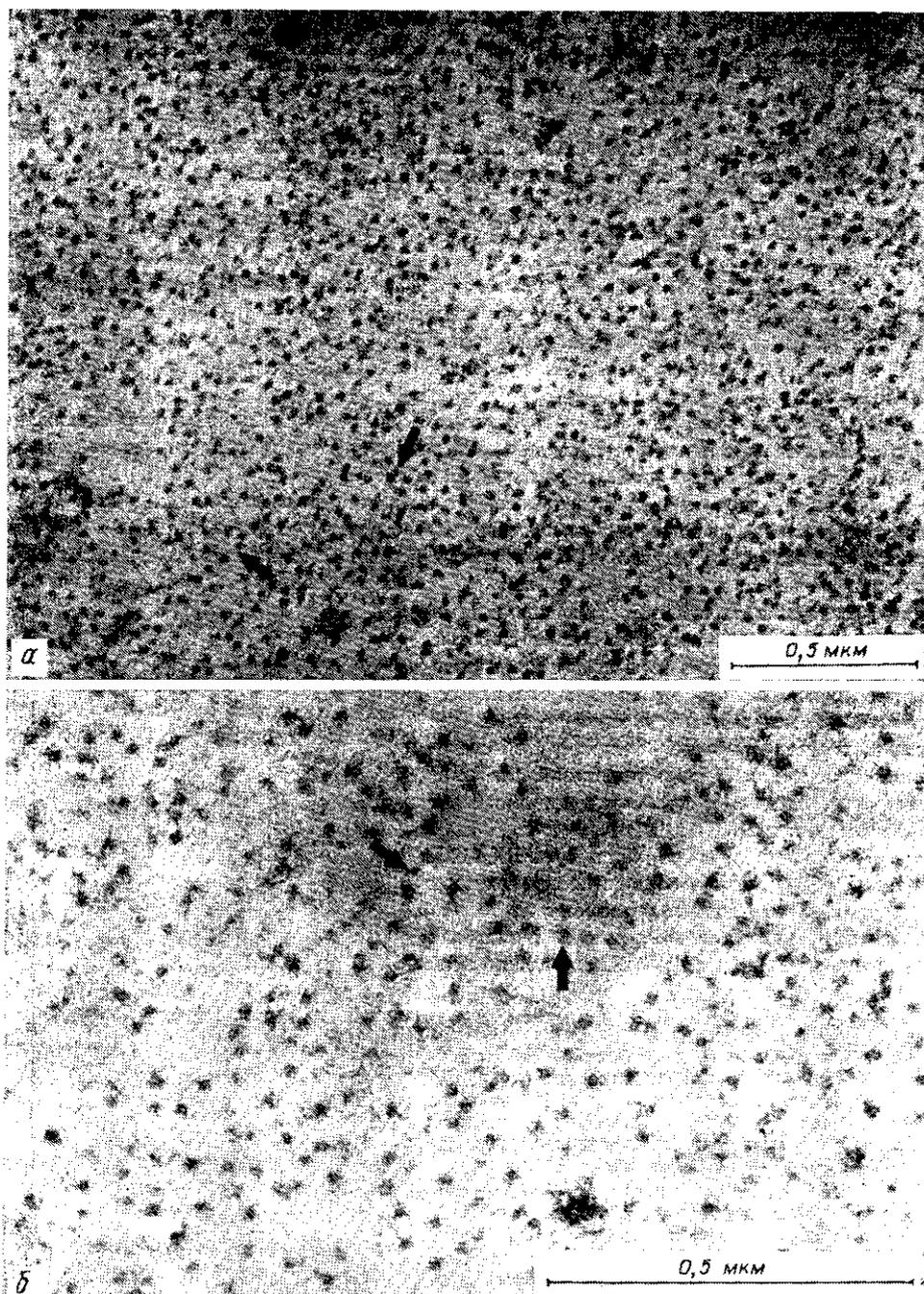


Рис. 2. Электронная микроскопия донных фракций сахарозного градиента: а — $\times 50\ 000$; б — $\times 100\ 000$

Fig. 2. Electron microscopy of the bottom sucrose gradient fractions: а — $\times 50\ 000$, б — $\times 100\ 000$

альной фракции $0,1\ M\ MgCl_2$, либо ультрацентрифугированием постмитохондриальной фракции в градиенте $0,5\text{--}1,8\ M$ сахарозы [15]. Чистоту препаратов поли(А)⁺мРНК контролировали спектрофотометрически и электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле [16]. Была продемонстрирована матричная активность выделенной суммарной поли(А)⁺мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе [17].

Как видно из рис. 1, пик РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности приходится на область с плотностью $1,16\text{--}1,18\ g/cm^3$. Дот-гибридизация РНК фракций этого градиента с ^{32}P -ДНК ИАЧ мышей позволила обнаружить РНК, гомологичную ДНК

ИАЧ, в этой области, но в значительно большем количестве в донных фракциях градиента, где полимеразная активность отсутствовала (рис. 1).

Электронная микроскопия позитивно контрастированного материала донной фракции сахарозного градиента выявила в них отсутствие ИАЧ, однако в этой фракции были обнаружены полисомы (рис. 2). Поли(А)+мРНК, выделенная из полученных препаративно полисомом печени крыс, гибридизовалась с ³²P-ДНК ИАЧ мышей и практически не гибридизовалась с рРНК из печени крыс, взятой в качестве контроля (рис. 3).

Полученные результаты однозначно указывают на наличие РНК ретровирусоподобных ИАЧ в полисомах нормальной печени крыс, что предполагает трансляцию РНК

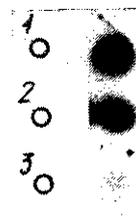


Рис. 3. Дот-гибридизация поли(А)+мРНК из полисом печени крыс с ³²P-ДНК ИАЧ мышей: полисомы осаждали 0,1 М MgCl₂ (1); полисомы из градиента 0,5—1,8 М сахарозы (2); контроль — рРНК (3)

Fig. 3. Dot-hybridization of poly(A)+mRNA from the rat liver polysomes with ³²P-IAP DNA of mice: polysomes obtained by 0.1 M MgCl₂ precipitation (1); polysomes obtained by 0.5-1.8 M sucrose gradient centrifugation (2); control — rRNA (3)

этих частиц. Если данная РНК действительно транслируется, то обнаруженная нами ранее в печени крыс свободная, не связанная с вирионами, обратная транскриптаза [12] может быть продуктом трансляции полисомной РНК эндогенных ретровирусов, таких, например, как ИАЧ.

DETECTION OF INTRACISTERAL A-PARTICLES RNA IN THE POLYSOMAL POLY(A)+RNA OF THE RAT LIVER

O. A. Kupriyanova, N. P. Korokhov, V. P. Tomsons, E. V. Kiscleva, S. N. Vishnivetsky, A. B. Khristolubova, N. P. Mervetsov, R. I. Salganik

Institute of Cytology and Genetics;
Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

The transcription of the proviral genes of intracisternal A-particles (IAP) has been previously revealed in the rat liver. Poly(A)+RNA-particles are shown to be a part of the polysomal mRNA in the rat liver, that permits supposing on translation of RNA of these particles in the adult animal liver.

1. Joklik W. K., Phil D. Virology.— London: Appleton-Centry-Crofts, 1985.—325 p.
2. Повышенный уровень транскрипции генов интрацистернальных А-частиц и В-2 элементов в опухолях мышей / М. С. Григорян, Д. А. Крамеров, Е. М. Тульчинский и др. // Молекуляр. биология.— 1985.—19, № 2.— С. 340—348.
3. Kuff E., Fewell J. W. Intracisternal A-particle gene expression in normal mouse thymus tissue: gene product and strain-related variability // Mol. and Cell. Biol.— 1985.—5, N 3.— P. 474—483.
4. Корохов Н. П., Томсон В. П., Салганик Р. И. Идентификация эндогенных ретровирусов в печени крыс при помощи молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот // Докл. АН СССР.— 1985.—283, № 6.— С. 1504—1506.
5. Studies on the relationship between deoxyribonucleic acid polymerase activity and intracisternal A-type particles in mouse myeloma / S. H. Wilson, E. W. Bohn, A. Matsukage et al. // Biochemistry.— 1974.—13, N 5.— P. 1087—1094.
6. Lueders K. K., Segal S., Kuff E. L. RNA sequences specifically associated with mouse intracisternal A-particles // Cell.— 1977.—11, N 1.— P. 83—94.
7. Lueders K. K., Kuff E. L. Comparison of the sequence organization of related retrovirus-like multigene families in three evolutionarily distant rodent genomes // Nucl. Acids Res.— 1983.—11, N 13.— P. 4391—4408.
8. Activation of the c-mos oncogene in a mouse plasmacytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome / E. Canaani, O. Dreazen, A. Klar et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.—80, N 24.— P. 7118—7122.
9. Hawley R. G., Schulman M. J., Hozumi N. Transposition of two different intracisternal A-particle elements into an immunoglobulin kappa-chain gene // Mol. and Cell. Biol.— 1984.—4, N 12.— P. 2565—2572.
10. Burt D. W., Reith A., Brammer W. J. A retroviral provirus closely associated with the Ren-2 gene of DBA/2 mice // Nucl. Acids Res.— 1984.—12, N 22.— P. 8579—8593.

11. Обратная транскриптаза из печени крыс: происхождение и вероятные функции / В. П. Томсонс, Г. Б. Пыринова, Н. П. Корохов и др. // Докл. АН СССР.— 1983.— 272, № 6.— С. 1498—1501.
12. РНК-зависимая ДНК-полимераза из печени крыс / Г. Б. Пыринова, В. П. Томсонс, Н. Н. Блинова, Р. И. Салганик // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 3.— С. 743—750.
13. Шеррер К. Выделение РНК и изучение ее свойств с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы // Методы вирусологии и молекуляр. биологии.— М.: Мир, 1972.— С. 337—354.
14. Букринский М. И., Крамеров Д. А. Особенности транскрипции генов интрацистер-нальных А-частиц // Вопросы вирусологии.— 1984.— 29, № 3.— С. 345—350.
15. Clemens M. J. Purification of eukaryotic messenger RNA // Transcription and translation, a practical approach / Eds B. D. Hames, S. J. Higgins.— Oxford; Washington: IRL press, 1984.— P. 211—230.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
17. Исследование трансляции полисомной поли-А-содержащей РНК печени крыс в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы / С. Я. Головин, В. Н. Чесноков, Н. Н. Блинова и др. // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР.— 1981.— № 2.— С. 115—121.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск
Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 03.06.86

УДК 577.323

ДИМЕРИЗАЦИЯ Ecodam-метиلاзы, ИНДУЦИРОВАННАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ СУБСТРАТОМ

Н. И. Речкунова, В. В. Зиновьев, Э. Г. Малыгин, Ю. А. Горбунов,
С. Г. Попов, В. Ф. Нестеренко, Я. И. Бурьянов

Введение. При исследовании взаимодействия Ecodam-метилазы (К.Ф.2.1.1) с синтетическими олигонуклеотидными субстратами, содержащими различные дефекты в структуре участка узнавания, было показано, что взаимодействие фермента с субстратом происходило эффективно только в тех случаях, когда в обеих цепях участка узнавания сохранились GA-последовательности [1]. Эти данные позволили предположить, что фермент-субстратный комплекс обладает симметрией второго порядка. Поскольку известно, что Ecodam-метилаза является мономерным белком [2], и ее первичная последовательность не содержит сколько-либо значимых гомологий [3], возникло предположение, что фермент способен образовывать симметричные олигомерные структуры в присутствии субстрата. При изучении комплексообразования Ecodam-метилазы с синтетическими олигонуклеотидами в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния наилучшее соответствие между экспериментальными и расчетными данными было получено для модели, учитывающей взаимодействие двух молекул фермента с молекулой субстрата [4].

В настоящей работе методами гель-фильтрации и ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы показано увеличение молекулярной массы фермента в присутствии субстрата на величину, большую молекулярной массы субстрата.

Материалы и методы. Ecodam-метилазу выделяли, как описано в [5]. Олигонуклеотиды синтезировали по триэфирному методу [6]. Ультрацентрифугирование проводили в линейном градиенте плотности сахарозы 10—30 % [2]. Раствор сахарозы готовили в буфере А (20 мМ К-фосфат, pH 7,5, 10 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ) с добавлением NaCl и олигонуклеотидов до определенной концентрации. На градиент наставляли 0,5 нмоль Ecodam-метилазы в объеме 100 мкл. После центрифугирования градиент раскапывали на фракции по 100 мкл и определяли активность фермента в каждой фракции. Для этого отбирали аликвоты (20 мкл) и добавляли в каждую по 6 мкг ДНК спермы лосося и 60 нмоль ³H-AdoMet. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С, дальнейшие процедуры проводили, как описано ранее [1]. Молекулярную массу фермента определяли по методу [7]. Положение маркерных белков в градиенте после центрифугирования определяли по оптической плотности при 280 нм, измерения выполняли на микроспектрофотометре «Обь». Гель-фильтрацию проводили на колонке ($l=10$ см, $d=0,3$ см) с сефакрилом S-200 [8].