



УДК 577.352.5.612.822

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЦЕПЦИЯ ДВУХСПИРАЛЬНОЙ РНК НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ КЛЕТОК КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

ЗАХАРЯН Р. А., БАКУНЦ К. А., СКОБЕЛЕВА Н. А.
Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что двухспиральная РНК (дс-РНК) существенно повышает степень фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток коры головного мозга. Полученный набор величин M_r фосфорилированных белков в целом близок к M_r белков мембранной фракции мозга по сАМР-зависимому фосфорилированию. Фактор связывания дс-РНК на поверхности нервных клеток, по-видимому, имеет белковую природу. Взаимодействие дс-РНК с плазматической мембраной нервной клетки высокоспецифично и по своим характеристикам аналогично взаимодействию лиганд-рецептор.

Известно, что дс-РНК являются индукторами интерферона, стимуляторами первичного и вторичного иммунного ответа [1, 2], модуляторами ряда биохимических реакций [3, 4].

Вместе с тем, возможные мембранные эффекты дс-РНК оставались вне поля зрения исследователей. Ранее на модели пейсмекерного нейрона RPa1 [5], на тромбоцитах кошек и человека [6] показано, что РНК, ДНК и в особенности дс-РНК являются активаторами мембранных функций клетки. В основе их действия лежат процессы, связанные с повышением в клетке уровня сАМР, активацией трансмембранных токов экстрацеллюлярного Ca^{2+} , активацией фосфолипазы A_2 , более выраженных при использовании ДНК, РНК и дс-РНК в форме Ca^{2+} -преципитата [7].

Одновременно нами было показано, что дс-РНК, сорбируясь на плазматической мембране нервной клетки, клеток печени, костного мозга, активно пересекает мембранный барьер и переходит внутрь клетки.

Имеющиеся результаты послужили основанием для изучения специфичности процесса взаимодействия дс-РНК с поверхностной мембраной и изолированной плазматической мембраной нервных клеток.

Материалы и методы

Для изучения взаимодействия дс-РНК с поверхностной мембраной целостной нервной клетки была использована реагированная в течение 4 суток суспензия клеток, полученная при диссоциации коры больших

полушарий мозга крыс трипсином [8]. Число клеток в суспензии подсчитывали гемоцитометром. В качестве дс-РНК использовали дрожжевую киллерную РНК с M_r $1,2-0,8 \times 10^6$ Д, любезно предоставленную проф. Ершовым Ф. И. (Институт вирусологии им. Д. Н. Ивановского АМН СССР). [3 H]дс-РНК с активностью $6,5 \times 10^3$ имп/мкг была получена в тритиевой воде с У. А. 5 Ки/мл. Фракции плазматических мембран из больших полушарий мозга крыс получали по методу Непп [9]. Взаимодействие [3 H]дс-РНК с клетками мозга в суспензии проводили при 4°.

В экспериментах использовали по 10^7 клеток, сорбцию дс-РНК на клетках проводили в сбалансированном солевом растворе Хенкса в присутствии 5 мМ Ca^{2+} . Энзиматическую обработку клеток в суспензии проводили при 37° 60 мин.

Фосфорилирование белков плазматической мембраны мозга и их электрофоретическое разделение в ПААГ проводили следующим образом: инкубационную смесь, содержащую 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ MgCl_2 , 10 мМ [γP^{32}]АМР (0,1 мКи/имоль), 100 мкг белка инкубировали с дс-РНК и без нее в течение 30 и 60 мин соответственно, реакцию фосфорилирования останавливали добавлением (1:1) раствора: 0,05 М трис-НСl, рН 6,8; 10%-ный ДДС-Na; 0,1 М ЭДТА, 15%-ный глицерин, 5%-ный меркаптоэтанол и бромфеноловый синий, образцы (40 мкл) кипятили в течение 1 мин и использовали для электрофореза в 10%-ном ПААГ.

Дс-РНК-связывающие белки из плазматической мембраны клеток коры больших полушарий получали методом аффинной хроматографии на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе [10]. Солюбилизацию мембранных белков проводили в присутствии Тритона X-100, сорбцию белков на РНК-целлюлозе проводили в 0,01 М трис-НСl буфере, рН 7, 2, 50 мМ NaCl, сорбированные белки элюировали с колонок при 0,25 М, 0,5 и 1 М NaCl . Полученные образцы изучены в электрофорезе в 10%-ном ПААГ, в блочной модификации.

Взаимодействие [3 H]дс-РНК с плазматическими мембранами клеток мозга анализировали методом зональной седиментации комплекса в 10—45%-ном градиенте сахарозы при 100000 g, 2,5 ч, 4°. Полученные фракции отмывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса, фильтры просчитывали в радиосчетчике «SL-30» (Intertechnique, Франция). Трипсин использовали в концентрации 500 мкг/мл, время инкубации 45 мин, 37°; ДОХ-Na—1%, время инкубации 1 ч, 37°.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена автордиография электрофореграммы фосфорилированных белков плазматической мембраны клеток мозга в условиях *in vitro* в присутствии дс-РНК. Полученный набор величин M_r фосфорилированных белков в целом близок полученному ранее для белков мембранной фракции мозга по сАМР-зависимому фосфорилированию. Это белки с M_r : 86×10^3 , 80×10^3 , 68×10^3 , 48×10^3 , 45×10^3 , $35-40 \times 10^3$, $25-30 \times 10^3$, и 13×10^3 Д. Вместе с тем, дс-РНК существенно по-

вышает степень фосфорилирования указанных белков. При 30-минутной обработке дс-РНК в зоне величин $M_g 280-300 \times 10^3$ появляется новый фосфорилированный белок. Ранее нами было показано, что дс-РНК повышает уровень сАМР в нервных клетках [5].

Это дает основание утверждать, что взаимодействие дс-РНК с поверхностной мембраной клеток мозга индуцирует повышение уровня сАМР, соответственно активируются сАМР-зависимые протеинкиназы, тем самым обеспечивая регуляцию уровня фосфорилирования белков плазматической мембраны нервной клетки.

Чтобы определить, насколько специфично взаимодействие дс-РНК с плазматической мембраной нервных клеток, изучали процесс сорбции [3H]дс-РНК на нервных клетках в суспензии. Максимум специфического связывания дс-РНК наблюдается в течение 6—10 мин. На рис. 2 приведена кривая насыщения поверхности клеток головного мозга дс-РНК. Присутствие 20-кратного избытка рибонуклеотидов разрушенной ультразвуком до $M_g 1-5 \times 10^6$ Д «холодной» ДНК тимуса телят не оказывало влияния на связывание дс-РНК с мембраной нервных клеток.

Энзиматическая обработка клеток в диссоциированной суспензии головного мозга по-разному влияла на сорбцию дс-РНК клетками.

Таблица

Влияние энзиматической обработки на связывание дс-РНК клетками головного мозга

Обработка	Связывание дс-РНК мкг/ 10^7 клеток
Контроль: суспензия клеток, полученная сразу после диссоциации ткани трипсином	0,002
Контроль: реагированная суспензия через 4 суток культивирования	0,62
Реагированная суспензия после обработки трипсином (250 мкг/мл)	0,0015
Реагированная суспензия после обработки ДНКазой (100 мкг/мл)	0,6
Реагированная суспензия после обработки РНКазой (50 мкг/мл)	0,72

Данные таблицы показывают, что поверхность клеток в суспензии, полученной сразу после диссоциации нервной ткани трипсином, не способна акцептировать молекулы дс-РНК. Эта способность восстанавливалась у реагированных клеток через 4 суток культивирования. Повторная обработка трипсином полностью снимала дс-РНК связывающую способность нервных клеток. Обработка клеток ДНКазой, РНКазой не влияла на сорбцию дс-РНК на клетках.

Очевидно, что фактор связывания на поверхности клетки представлен белками, восстанавливаемыми в мембране в период культивирования.

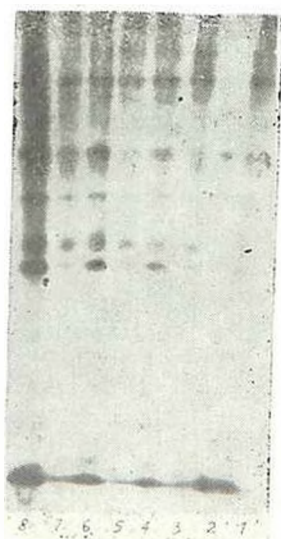


Рис. 1. Авторадиография электрофореграммы мембранных белков, фосфорилированных $[^{32}\text{P}]\text{АТР}$ в присутствии дс-РНК: справа налево 1, 3, 5, 7—фосфорилирование в отсутствие дс-РНК (контроль); 2, 4, 6, 8—фосфорилирование в присутствии дс-РНК за 5, 10, 20, 30 мин соответственно



Рис. 4. Электрофорез в 10%-ном ПААГ дс-РНК-связывающих мембранных белков, выделенных методом аффинной хроматографии на дс-РНК-АЭ-целлюлозе: 1—элюат 0,25 М NaCl, 2—элюат 0,5 М NaCl

ния, по-видимому, за счет синтеза *de novo*. Рибонуклеотиды, ДНК практически не влияли на сорбцию дс-РНК на нервных клетках, что указывает на специфический характер взаимодействия дс-РНК с белками плазматической мембраны. Некоторое повышение уровня сорбции дс-РНК на нервных клетках было получено после предварительной обработки клеток РНКазой. Можно допустить, что РНКаза, удаляя из поверхностной мембраны связанную РНК, освобождает участки для связывания $[^3\text{H}]$ дс-РНК: в частности, наличие в поверхностной мембране нервной клетки молекул РНК, влияющих на функцию рецепторов АХ, было продемонстрировано Турпаевым и соавт. [11].

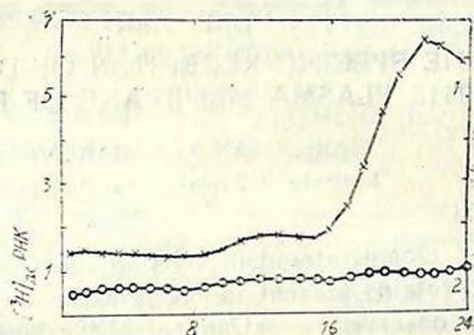
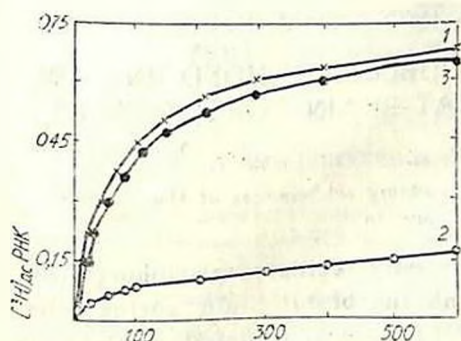


Рис. 2. Связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК клетками головного мозга (в мкг/10⁷ клеток). 1—специфическое связывание (с вычетом неспецифического связывания дс-РНК); 2—неспецифическое связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК в присутствии избытка холодной дс-РНК; 3—связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК в присутствии ДНК или АМР, ГМР, МР, СМР.

Рис. 3. Седimentация комплекса дс-РНК с очищенной мембранной фракцией нервных клеток. Зональное центрифугирование в 10—45%-ной сахарозе, 100 000 г, 2,5 ч, 4°. 1—профиль седиментации комплекса дс-РНК с мембраной; 2—профиль седиментации комплекса дс-РНК с обработанной трипсином или дезоксиголатом

На рис. 3 приведен профиль седиментации комплекса дс-РНК с очищенной мембранной фракцией нервных клеток при зональной седиментации в 10—45%-ной сахарозе. Полученный результат подтверждает белковую природу фактора в интактной мембране, обеспечивающего связывание дс-РНК на поверхности нервных клеток.

Солюбилизированная в присутствии Тритона X-100 очищенная фракция плазматических мембран клеток мозга была сорбирована на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе. Гель-электрофорез сорбированных белков, элюированных в ступенчатом градиенте NaCl (рис. 4), свидетельствует о том, что, во-первых, с дс-РНК связывается определенный набор белков; во-вторых, эти белки по величине Мг повторяются в элюате с разными молярностями NaCl. Первое обстоятельство, по-видимому, связано с тем, что источником дс-РНК-связывающихся белков являются плазматические мембраны достаточно разнородной популяции клеток мозга, второе можно объяснить тем, что идентичный набор белков, свя-

зывающихся с дс-РНК, занимает на молекуле дс-РНК близкие по своей первичной структуре последовательности, однако достаточно различающиеся (на одно, два основания), чтобы проявить различное сродство лиганда (дс-РНК) к белку-рецептору. Белок с величиной M_r элюируется с колонки дс-РНК целлюлозы и при ионной силе 1,0 M NaCl; по-видимому, в молекуле дс-РНК имеются блоки последовательностей, к которым данный белок проявляет особенно высокое сродство, и элюция данного белка с указанных последовательностей наступает при повышении ионной силы элюата до 1 M NaCl.

Таким образом, взаимодействие дс-РНК с белками плазматической мембраны клеток мозга высокоспецифично и по своим характеристикам аналогично взаимодействию лиганд-рецептор.

THE SPECIFIC RECEPTION OF DOUBLE-STRANDED RNA ON THE PLASMA MEMBRANE OF RAT BRAIN CORTEX CELLS

ZAKHARIAN R. A., BAKUNTZ K. A., SKOBELEVA N. A.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the
Armenian SSR, Yerevan

Double-stranded RNA *in vitro* markedly increases phosphorylation of proteins present in the plasma membrane of rat brain cortex cells. The observed spectrum of M_r values for phosphorylated proteins is generally close to the M_r of those proteins from brain membrane fraction which undergo cAMP-dependent phosphorylation. The factor responsible for the binding of the double-stranded RNA to the nerve cell surface appears to be a protein. The interaction of double stranded RNA with plasma membrane of the nerve cell is similar in its properties to ligand-receptor interaction.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mathe G., Florentin I., Olsson L., Brully M., Schultz J. Cancer Treat Rep., v. 62, p. 1613—1621, 1978.
2. Han I. H., Johnson A. G. J. Immunol., v. 117, p. 423—427, 1976.
3. Ratner L., Wiegand R. C., Farrel P. G., Sen G. C., Cabrer B., Lenguel P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 81, p. 947—952, 1978.
4. Farrel P. G., Sen G. C., Dubots M. F., Ratner L., Lenguel P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 75, p. 893—897, 1978.
5. Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц К. А., Агабальян А. С., Айрапетян С. Н. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 239—247, 1986.
6. Канцян М. Г., Амроян Э. А., Захарян Р. А., Агабальян А. С., Акопян Ж. И., Габриелян Э. С. Докл. АН АрмССР, LXXIX, № 3, с. 140—144, 1984.
7. Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овакимян С. С. Биол. журн. Армении, т. 40, № 12, с. 979—985, 1987.
8. Викторов И. В.—В кн.: Руководство по культивированию нервной ткани, с. 30—38, М., Наука, 1987.
9. Henn F. A. Adv. in Cell Neurobiol., v. 1, p. 379—403, 1981.
10. Романов В. В., Старостина В. К. Биотехнология, т. 3, № 5, с. 618—623, 1987.
11. Турпаяев Т. М., Соломонова Б. Г. Докл. АН СССР, т. 279, № 1, с. 250—252, 1984.

Поступила 23. III 1988