

УДК 577.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Р. А. Захарян, К. А. Вахунц, Н. А. Скобелева

### Специфическая рецепция дс-РНК на плазматической мембране клетки

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 14/1 1988)

Двуспиральные РНК (дс-РНК) известны как индукторы интерферона, стимуляторы первичного и вторичного иммунного ответа (<sup>1-2</sup>), модуляторы ряда биохимических реакций (<sup>3-4</sup>).

Вместе с тем возможные мембранные эффекты дс-РНК оставались вне поля зрения исследователей. Ранее на модели пейсмекерного нейрона РРА1 (<sup>5</sup>), на тромбоцитах кошек и человека (<sup>6</sup>) было 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 цАМФ, активацией трансмембранных токов экстрацеллюлярного  $Ca^{2+}$ , активацией фосфолипазы  $A_2$ , более выраженных при использовании ДНК, РНК и дс-РНК в форме Са-преципитата.

Одновременно было установлено, 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.

Для изучения взаимодействия дс-РНК с поверхностной мембраной целостной нервной клетки была использована реаггированная в течение 4 суток суспензия клеток, полученная при диссоциации нервной ткани—коры больших полушарий мозга крыс трипсином (<sup>7</sup>). Число клеток в суспензии подсчитывали гемоцитометром. В качестве дс-РНК использовали дрожжевую киллерную РНК с молекулярной массой  $1,2-1,8 \times 10^6$  д., любезно предоставленную Ф. И. Ершовым (Институт вирусологии им. Д. Н. Ивановского АМН СССР).

[<sup>3</sup>H]дс-РНК с активностью  $6,5 \times 10^3$  имп/мкг была получена в тритиевой воде с удельной активностью 5 Кю/мл. Фракции плазматических мембран из больших полушарий мозга крыс получали по методу, описанному в работе (<sup>8</sup>). Взаимодействие [<sup>3</sup>H]дс-РНК с клетками мозга в суспензии проводили при 4°C.

В экспериментах использовано 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°C 60 мин.

Дс-РНК—связывающие белки из плазматической мембраны клеток коры больших полушарий получали методом аффинной хроматографии на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе (9); сорбированные белки элюировали с колонок при 0,25, 0,5 и 1 М NaCl. Полученные образцы изучены в электрофорезе в 10%-ном ПААГ, в блочной модификации.

Чтобы выяснить, насколько специфично взаимодействие дс-РНК с плазматической мембраной нервных клеток, нами был изучен процесс сорбции [<sup>3</sup>H] дс-РНК на нервных клетках в суспензии. Максимум специфического связывания дс-РНК достигался в течение 6—10 мин. На рис. 1 изображена кривая насыщения поверхности клеток головного мозга дс-РНК. Присутствие 20-кратного избытка рибонуклеотидов, «холодной» ДНК тимуса теленка, разрушенной ультразву-

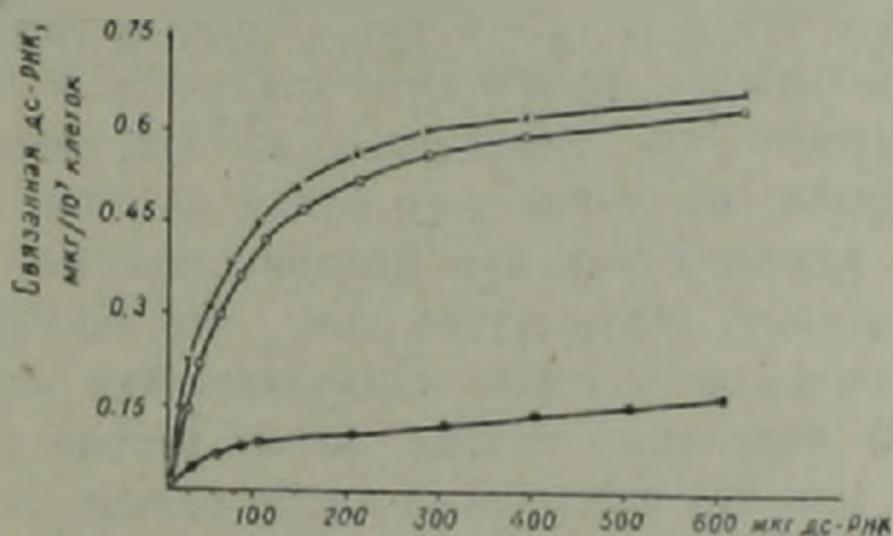
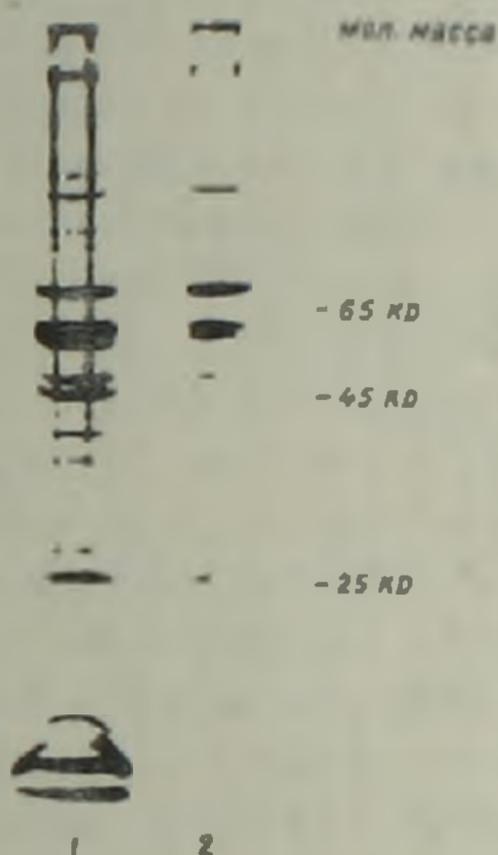


Рис. 1. Связывание [<sup>3</sup>H] дс-РНК клетками головного мозга: x—специфическое связывание (с вычетом неспецифического связывания дс-РНК), •—неспецифическое связывание [<sup>3</sup>H] дс-РНК в присутствии избытка холодной дс-РНК; o—связывание [<sup>3</sup>H] дс-РНК в присутствии ДНК (или АМФ, ГМФ, УМФ, ЦМФ)

Рис. 2. Электрофорез в 10% 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



Влияние энзиматической обработки на связывание дс-РНК клетками головного мозга

Обработка	Связывание дс-РНК, мкг/10 <sup>7</sup> 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

ком до молекулярной массы  $1-5 \times 10^5$  д., 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.

Выяснилось, 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 протеинами, восстанавливаемыми в мембране в период культивирования, 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.

Солюбилизованная в присутствии тритона X-100 очищенная фракция плазматических мембран клеток мозга была сорбирована на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе. Хроматография сорбированных белков, элюированных в ступенчатом градиенте NaCl: 0, 25, 0,5 М (рис. 2) свидетельствует, что, во-первых, с дс-РНК связывается определенный набор белков; во-вторых, эти белки по молекулярным массам повторяются в элюате с разными молярностями NaCl. Первое обстоятельство, по-видимому, обусловлено тем, что дс-РНК связывающиеся белки имеют своим источником плазматические мембраны достаточно разнородной популяции клеток мозга; второе обстоятельство можно объяснить тем, что идентичный набор белков, связывающихся 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 рецептору—белку. Белок с молекулярной массой  $67-70 \cdot 10^3$  д. элюируется с колонки дс-РНК целлюлозы и при ионной силе 1,0 М 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 М NaCl.

Полученные данные позволяют заключить, что взаимодействие дс-РНК с белками плазматической мембраны клеток мозга высокоспецифично и по своим характеристикам аналогично лиганд-рецептор взаимодействию. В присутствии дс-РНК имеет место ингибирование сорбции вируса мышинного энцефаломиокардита на плазматической мембране клетки на 75—80% путем блокады рецептора, химической его модификации и изменения липидного окружения рецептора.

Институт экспериментальной  
биологии Академии наук  
Армянской ССР

Ն<sub>2</sub>-ՌՆԹ-ի առանձնահատուկ ոեցեպցիան բջի պլազմատիկ թաղանթի վրա

Ն<sub>2</sub>-ՌՆԹ-ի փոխազդեցությունը ուղեղի բջիջների պլազմատիկ թաղանթի սպիտակուցների հետ ունի բարձր առանձնահատկություն և իրեն բնութագրուլ նման է լիզանդ-ոեցեպտորային փոխազդեցությանը:

Ն<sub>2</sub>-ՌՆԹ-ի ներկայությունը կանխում է մկան էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի սորբցիան բջիջների պլազմատիկ թաղանթի վրա:

#### ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> G. Mathe, I. Florentin, L. Olsson e. a., Cancer Treat Rep, v. 62, p. 1613—1621 (1978). <sup>2</sup> J. H. Han, A. G. Ionson, J. Immunol., v. 117, p. 423—427 (1976). <sup>3</sup> L. Ratner, R. C. Wiegand, P. G. Farrel e. a., Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 81, p. 947—952 (1978). <sup>4</sup> P. G. Farrel, C. G. Sen, M. F. Dubois e. a. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v. 75, p. 893—897 (1978). <sup>5</sup> P. A. Захарян, Г. Е. Рычков, С. С. Дадалян и др., Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 239—247 (1986). <sup>6</sup> М. Г. Канемян, Э. А. Амроян, P. A. Захарян и др., ДАН АрмССР, т. 79, № 3, с. 140—144 (1984). <sup>7</sup> И. В. Викторов, в кн.: Руководство по культивированию нервной ткани, М., 1978. <sup>8</sup> F. A. Nepp, Adv. in cell Neurobiol., v. 1, p. 379—403 (1981). <sup>9</sup> В. В. Романов, В. И. Старостина, Авторское свидетельство СССР, № 665635, 1985.