



УДК 547.963.3

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ГЛОБИН-КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ЯДЕРНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ФРАКЦИЯХ РНК ПРИ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ГОЛУБЯ

В. З. Гарантул

Проблеме регуляции экспрессии глобиновых генов посвящено много различных исследований [1—5]. Основной вывод, вытекающий из проведенных работ, заключается в том, что главным уровнем регуляции этих генов является транскрипционный. Однако до сих пор остается еще много неясных вопросов. В частности, практически не исследованы закономерности изменения регуляции экспрессии глобиновых генов в клетках эритроидного ряда по мере их созревания. Для их выяснения нами предпринята попытка проанализировать содержание глобин-кодирующих последовательностей в различных фракциях РНК при терминальной дифференцировке эритроидных клеток голубя. Проведенные расчеты основаны на результатах наших ранних исследований и некоторых новых данных [6—8].

Совокупность сведений, имеющихся в литературе [3, 9—11], позволяет считать, что основные этапы посттранскрипционных изменений глобиновых пре-мРНК протекают по схеме: $\geq 45S$ яРНК (~ 12000 н.) \rightarrow $28S$ яРНК (~ 5000 н.) \rightarrow $15S$ яРНК (1800 н.) \rightarrow $9S$ мРНК (600 н.).

Для определения эффективности транскрипции α - и β -глобиновых генов при терминальной дифференцировке анализировали фракции новообразованных гигантских ($\geq 45S$) ядерных РНК (яРНК), выделенных из клеток костного мозга (эритробластов) и периферической крови (ретикулоцитов) анемизированных голубей, как описано ранее [12]. Препараты меченой РНК, очищенные предварительно в градиенте концентрации сахарозы, содержащем 85 %-ный формамид, фракционировали на колонке с глобиновыми кДНК, пришитыми к целлюлозе [13]. Гибридизацию проводили в течение 12 ч в присутствии 10 %-ного декстрансульфата при постоянном перемешивании суспензии кДНК-целлюлозы в растворе РНК. В результате этих экспериментов определили, что глобин-кодирующие молекулы составляют $0,032 \pm 0,003$ и $0,212 \pm 0,015$ % в эритробластах и ретикулоцитах соответственно. Эти значения получены после вычитания фона (в аналогичных условиях с колонкой связывалось 0,008 % [3H]рРНК). На основании известной сложности яРНК ($3,6 \cdot 10^8$ н. в эритробластах и $1,6 \cdot 10^8$ н. в ретикулоцитах [8]), а также учитывая представленность различных молекул РНК в ядрах этих клеток, определенную на основании кинетики гибридизации уникальных последовательностей ДНК с избытками яРНК (в среднем 0,12 и 0,04 копии на ядро в эритробластах и ретикулоцитах соответственно), можно рассчитать, что наиболее сложный класс молекул составляет по массе 2,0 % в эритробластах и 1,1 % в ретикулоцитах. Принимая, что $\geq 45S$ яРНК составляет 1/2 часть сложной фракции и основываясь на данных по содержанию РНК в ядрах и цитоплазме эритробластов (1,35 и 1,55 пг соответственно) и ретикулоцитов (0,33 и 0,95 пг соответственно) [5], можно рассчитать по доле $\geq 45S$ яРНК, связывающейся с кДНК-целлюлозой, число глобин-кодирующих молекул. Необходимо только учесть, что при фракционировании размер молекул РНК уменьшался примерно в 2,5 раза. Число глобин-кодирующих молекул, согласно этим расчетам, в обоих случаях равно примерно двум на ядро. Эта оценка близка к имеющимся в литературе для эритроидных клеток птиц [1, 14]. При этом,

однако, следует иметь в виду, что сделанные допущения не позволяют считать полученное значение числа копий абсолютным. Оно верно только в том, что два типа эритроидных клеток содержат одинаковое число глобин-кодирующих молекул $\geq 45S$ яРНК. Поскольку представленность таких молекул в 30—80 раз выше, чем в среднем представлены в ядрах неглобиновые молекулы яРНК (см. выше), на основании полученных данных можно заключить, что эффективность транскрипции глобиновых генов сходна в обоих исследованных типах эритроидных клеток и существенно выше, чем таковая других (неглобиновых) генов.

Ранее нами было продемонстрировано наличие глобин-кодирующих последовательностей во фракции 28S яРНК эритробластов и ретикулоцитов голубя [6]. Согласно кинетическим кривым гибридизации 28S нерибосомной яРНК этих клеток глобин-кодирующие последовательности составляют 0,008 и 0,07 % соответственно. Из этих значений, зная абсолютные количества РНК в ядре (фракция 28S РНК составляет 2/3 яРНК) и принимая размер молекул 28S РНК равным 5000 н., легко рассчитать содержание молекул яРНК с коэффициентом седиментации 28S, несущих глобиновые последовательности. Исходя из этого, число таких молекул в эритроблестах равно 40, а в ретикулоцитах — 200. Следовательно, в результате процессинга происходит накопление глобин-содержащих молекул 28S яРНК в обоих типах эритроидных клеток, но в ретикулоцитах это накопление более значительное. За счет разной эффективности посттранскрипционных процессов во фракции 28S яРНК ретикулоцитов содержится в пять раз больше молекул, кодирующих глобин, чем в эритроблестах.

В этой связи представлялось интересным оценить разницу в содержании глобиновых мРНК в цитоплазме различных типов эритроидных клеток. Основываясь на ранее полученных данных [6, 7], согласно которым глобиновые поли(А)⁺ мРНК составляют 0,08 и 0,6 % цитоплазматической РНК эритробластов и ретикулоцитов соответственно, и зная абсолютное содержание РНК в цитоплазме этих клеток (см. выше), можно рассчитать число молекул глобиновых мРНК на клетку. Оно равно в ретикулоцитах 18000, а в эритроблестах 3800. Таким образом, в цитоплазме обоих типов эритроидных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, как и в 28S яРНК, имеет место 5-кратное различие в содержании молекул глобин-кодирующих РНК. Следовательно, наблюдаемое различие в содержании цитоплазматических поли(А)⁺ глобиновых мРНК в ретикулоцитах по сравнению с эритроблестами достигается уже на первых этапах процессинга первичного продукта транскрипции глобиновых генов.

Полученные данные указывают на то, что накопление такой специализированной мРНК, как глобиновая, происходит за счет усиления транскрипции уже на ранних стадиях дифференцировки и повышения эффективности процессинга пре-мРНК по мере созревания эритроидных клеток. Эти результаты находятся в соответствии с расчетами [1], согласно которым большие количества специализированных мРНК достигаются за счет регуляции как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях.

Автор выражает признательность проф. К. Г. Газаряну за обсуждение работы и полезные указания.

ANALYSIS OF THE CONTENT OF GLOBIN-CODING SEQUENCES IN NUCLEAR AND CYTOPLASMIC FRACTIONS AND RNA DURING THE PIGEON ERYTHROID CELLS THERMINAL DIFFERENTIATION

V. Z. Tarantul

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

S u m m a r y

The number of RNA molecules coding the sequences of α - and β -globin in different nuclear and cytoplasmic RNA fractions is calculated for erythroblasts and reticulocytes. The main changes in globin genes regulation of expression during thermanal differentiation of erythroid cells of pigeon are shown to occur at the level of pre-mRNA processing.

1. *Tobin A. J.* Evaluating the contribution of posttranscriptional processing to differential gene expression // *Develop. Biol.*—1979.—68, N 1.— P. 47—58.
2. *Groudine M., Weintraub H.* Activation of globin genes during chicken development // *Cell.*—1981.—24, N 2.— P. 393—401.
3. *On pre-messenger RNA and transcriptions. A review / K. Scherrer, M.-T. Imaizumi-Scherrer, C.-A. Reynaud, A. Therwath // Mol. Biol. Repts.*—1979.—5, N 1.— P. 5—28.
4. *Harrison P. R.* Molecular analysis of erythropoiesis. A current appraisal // *Exp. Cell Res.*—1984.—155, N 2.— P. 321—344.
5. *Gazaryan K. G.* Genome activity and gene expression in avian erythroid cells // *Int. Rev. Cytol.*—1982.—74.— P. 95—126.
6. *Последовательности, кодирующие глобин, в 28S пре-мРНК и в цитоплазматической РНК эритроидных клеток голубя / К. Г. Газарян, В. И. Дубовая, Н. С. Незнанов и др. // Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 4.— С. 766—772.
7. *Tarantul V. Z., Dubovaya V. I., Neznanov N. S.* Globin-coding sequences in nuclear and cytoplasmic RNA of pigeon erythroid cells // IX Int. symp. of structure and function of erythroid cell.—Berlin, 1980.— P. 82.
8. *Moderately repetitive sequences of the pigeon genome transcribed in erythroid cells: transcription assessment and cloning / V. Z. Tarantul, V. A. Goltsov, V. I. Dubovaya et al. // Biomed. et biochim. acta.*—1984.—43, N 1.— P. 48—50.
9. *Тарантул В. З., Газарян К. Г.* Гетерогенная ядерная РНК: структура и функция // *Успехи биол. химии.*—1982.—22.— С. 26—62.
10. *Кавсан В. М.* Неоднозначность границ транскрипции эукариотических генов // *Биополимеры и клетка.*—1987.—3, № 3.— С. 115—127.
11. *Broders F., Scherrer K.* Transcription of the alpha globin gene domain in normal and AEV-transformed chicken erythroblasts: mapping of giant globin-specific RNA including embryonic and adult genes // *Mol. and Gen. Genet.*—1987.—209, N 2.— P. 210—220.
12. *Метаболически стабильные классы ядерной РНК информационного типа / К. Г. Газарян, Е. Д. Кузнецова, И. В. Фетисова, В. З. Тарантул // Молекуляр. биология.*—1979.—13, № 4.— С. 761—768.
13. *Venetianer P., Leder P.* Enzymatic synthesis of solid phase-bound DNA sequences corresponding to specific mammalian genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1974.—71, N 10.— P. 3892—3895.
14. *Reynaud C.-A., Imaizumi-Scherrer M.-T., Scherrer K.* The size of the transcriptional units of the avian globin genes defined at the pre-messenger RNA level // *J. Mol. Biol.*—1980.—140, N 4.— P. 481—505.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 12.01.88

УДК 577.214.43

ФАКТОР ИНИЦИАЦИИ 3 (IF-3)

Escherichia coli ЯВЛЯЕТСЯ СУБСТРАТОМ

ДЛЯ ЛЕЙЦИЛ(ФЕНИЛАЛАНИЛ)-тРНК-ПРОТЕИН ТРАНСФЕРАЗЫ*

Н. В. Белицина

Фактор инициации 3 (IF-3) *E. coli* играет определяющую роль в узнавании мРНК в процессе инициации трансляции [1]. Известны две формы IF-3 (длинная и укороченная) — α и β [2], или l и s [3]. В препаратах IF-3 в виде миноров встречаются также l-форма без концевой метионина, содержащая лизин с N-конца, и s-форма, которая с N-конца имеет аргинин [4].

Лейцил(фенилаланил)-тРНК-протеин трансфераза *E. coli* (ЕС 2.3.2.6) переносит аминокислотные остатки из аминоацил-тРНК только на те субстраты, которые на N-конце имеют положительно заряженную аминокислоту (аргинин, лизин, гистидин) [5]. Так, в частности, субстратом являются α_{s1} -казеин и β -казеин. При этом с N-конца полипептид удлиняется на одну аминокислоту: лейцин, фенилаланин или метионин. Фермент использует для этого Лей-тРНК^{Leu}, Фен-тРНК^{Phe} и элонгаторную Мет-тРНК^{Met} [6]. До сих пор в *E. coli* не был идентифицирован белок, который являлся бы субстратом для Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы.

В настоящей работе приведены данные о перенесении лейцина, фенилаланина и метионина из соответствующих аминоацил-тРНК в IF-3. Из двух его полипептидных

* Представлена членом редколлегии А. В. Ельской.