

19. Brogley S. S., Pettijohn D. E. Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch // *J. Mol. Biol.*—1986.—187, N 1.—P. 47—60.
20. Rosette-like structures from nuclei with diffuse (nucleomeric or nucleosomic) chromatin / A. N. Prusov, V. Yu. Polyakov, O. V. Zatsepina et al. // *Cell Biol. Int. Rep.*—1983—7, N 10.—P. 849—858.
21. Comings D. E., Okada T. A. Nuclear proteins. The fibrillar nature of the nuclear matrix // *Exp. Cell Res.*—1976.—103, N 2.—P. 341—360.
22. Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E. coli* / А. И. Газнев, Л. А. Фоменко, Д. Т. Закржевская, В. А. Сягаева // *Биохимия.*—1985.—50, № 5.—С. 814—819.
23. Мазин А. Л. Классификация низкомолекулярных РНК млекопитающих // *Молекуляр. биология.*—1983.—17, № 4.—С. 784—792.
24. Ultrastructural features of minute chromosomes in a methotrexate-resistant mouse 3T3 cell line / B. A. Hamkalo, P. J. Faruham, R. Johnston, R. T. Schimke // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985—82, N 2.—P. 1126—1130.
25. Isolation properties and nucleolytic degradation of chromatin from *Escherichia coli* / K. Sjastad, P. Fadnes, P. G. Kruger et al. // *J. Gen. Microbiol.*—1982.—128, N 12.—P. 3037—3050.
26. Horz W., Aelterberger W. Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease // *Nucl. Acids Res.*—1981.—9, N 1.—P. 2558—2643.
27. Jonathan W. DNA banding and kinking // *Nature.*—1984.—309, N 5966.—P. 312—313.

Ин-т цитологии и генетики  
Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск

Получено 11.05.86

УДК 577.355

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНТЕЗИРУЕМОГО IN VITRO КАЗЕИНА С ИСКУССТВЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

Д. И. Балков, А. Э. Рачков, Л. И. Колчинская,  
Н. Ф. Стародуб, А. В. Ельская, В. К. Липко

**Введение.** Биогенез мембранных и секретируемых белков характеризуется рядом особенностей, в том числе синтезом на мембраносвязанных полисомах и наличием в незрелых полипептидах N-концевой «сигнальной» («лидерной») последовательности. Встраивание и секреция их осуществляется, по-видимому, ко-трансляционно [1—6]. Этот процесс включает связывание с эндоплазматическим ретикуломом рибосом, синтезирующих секреторный или мембранный полипептид, транслокацию его через липидный бислой и процессинг путем удаления сигнального пептида [4—7]. Существует мнение, что для связывания комплекса рибосома — растущий полипептид с мембраной и транслокации синтезирующегося белка необходимо наличие особого мембранного рецептора [8, 9]. Другие исследователи полагают, что ведущая роль в этом процессе принадлежит липидному бислою мембраны [10—12]. Для изучения трансмембранного переноса белков весьма плодотворным является использование моделей на основе реконструированных систем биосинтеза белка, содержащих липосомы с заданными характеристиками (внутренний объем, липидный состав и т. д.).

В настоящей работе рассматривается вопрос о возможности включения в липосомы эукариотических белков в процессе их синтеза в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы. Для этого использовали поли(А)<sup>+</sup>РНК из лактирующей молочной железы, кодирующую преимущественно секреторный белок казеин, и поли(А)<sup>+</sup>РНК из лизата ретикулоцитов, кодирующую несекреторный белок глобин.

**Материалы и методы.** Тотальную РНК из молочной железы коров получали по модифицированному методу [13]; РНК из ретикулоцитов кролика — согласно [14]. Поли(А)<sup>+</sup>РНК выделяли из суммарных препаратов РНК по методу, описанному ра-

нее [15]. Бесклеточная белоксинтезирующая система содержала S23-фракцию из зародышей пшеницы [16] в концентрации 20 ед.  $A_{260}/\text{мл}$ , 20 мМ НЕРЕС, рН 7,0, 80 мМ  $\text{KCH}_3\text{COO}$ , 3 мМ  $(\text{Cl}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , 1 мМ АТР, 40 мкМ ГТР, 10 мМ СР, 20 мкг/мл СРК, 2 мМ дитиотреитол, смесь  $^{12}\text{C}$ -аминокислот (20 мкМ каждая) без лейцина, 24 мкМ  $^{14}\text{C}$ -лейцин (8800 МБк/ммоль), 20 мкг/мл поли(А)+РНК. Поли(А)+РНК транслировались в течение 45 мин при 28 °С. Дальнейшую обработку проб проводили по [13].

Препарат суммарного казеина выделяли из свежего молока коров [19] и иодировали Т-хлораминовым методом [20]. Удельная радиоактивность казеина составляла 9 ТБк/мкг. В опытах использовали лецитиновые липосомы, полученные методом «обращенных фаз» [18]. Яичный лецитин получали по [17].

Эксперименты по встраиванию синтезирующихся белков в липосомы проводили следующим образом. К 100 мкл белоксинтезирующей системы, содержащей 2 мкг мРНК, добавляли 20 мкл липосом в концентрации 25 мг/мл и инкубировали 45 мин при 28 °С. Затем в пробы вносили по 2,5 мкл 20 мМ пуромидина и инкубацию продолжали еще 20 мин. Липосомы из системы выделяли гель-фильтрацией на колонке (11×1 см) с сефарозой 4В. Фракции объемом по 0,3—0,5 мл собирали и анализировали в них уровни радиоактивности и оптического поглощения при 206 нм. Фракцию липосом обрабатывали проназой (10 мкг/мл элюата липосом) в течение 30 мин при 37 °С и очищали гель-фильтрацией. Количество метки, связанной с липосомами, определяли в сцинтилляторе ЖС-103 на счетчике SL-40 (Франция).

Выделение липосом из бесклеточной системы проводили также с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте концентрации фиколла: 30, 15, 10 %. Смесь, содержащую липосомы, вносили на дно пробирки и центрифугировали в течение 40 мин при 26000 g.

Иммунохимическое выявление казеина в липосомах осуществляли после делипидирования проб [21]. Контролем служил казеин из стандартных растворов, а также белки бесклеточной системы, в которую не вносили экзогенных мРНК. В иммуноферментной реакции использовали препарат антител, полученных аффинной хроматографией антисыворотки кролика на казеинсефарозной колонке, в качестве вторых антител брали конъюгат антикроличьего Ig с пероксидазой («Amersham», Англия). Пероксидазную активность выявляли с помощью 4-хлоро-1-нафтола.

**Результаты и обсуждение.** Использованная в работе поли(А)+РНК из лактирующей молочной железы является гетерогенным препаратом. При электрофорезе в полиакриламидном геле помимо небольшой примеси 18S рибосомальной РНК в препарате выявляются три фракции, соответствующие мРНК белков молока. Одна из них является основной и соответствует 16S мРНК казеина [15]. Основная масса продукта трансляции этой мРНК в бесклеточной системе пресципитирует с антисывороткой к казеину и по результатам автордиографии соответствует трем типам полипептидных цепей указанного белка. Из литературы известно, что поли(А)+РНК из ретикулоцитов кролика кодирует почти исключительно глобин [14].

В предварительных экспериментах было показано, что при совместной инкубации компонентов бесклеточной системы с липосомами ее функциональная активность сохраняется: 1 мкг РНК стимулирует включение в ТХУ-осаждаемый продукт 10—12 пмоль  $^{14}\text{C}$ -лейцина в случае казеиновой и 30—40 пмоль — глобиновой мРНК. Для достоверной оценки включения белков в липосомы были использованы два метода отделения их от меченых компонентов системы: гель-фильтрация через сефарозу 4В и центрифугирование в градиенте концентрации фиколла. В обоих случаях оценивали количественный выход. Оказалось, что при гель-фильтрации в свободном объеме колонки выходит основная масса везикул независимо от того, инкубировались они в системе или нет. Используя центрифугирование также удалось выделить около 80 % внесенных в бесклеточную систему липосом, но поскольку гель-фильтрация является менее трудоемким процессом, ее использовали в дальнейшем.

Последующие эксперименты показали, что в свободном объеме колонки элюируются не только липосомы, но и полисомы, содержащие незавершенные  $^{14}\text{C}$ -полипептиды. Для отделения от рибосом пептидил-

тРНК пробы обрабатывали пурамицином в конечной концентрации 0,5 мМ. Для удаления адсорбированных на поверхности мембран меченых полипептидов липосомы подвергали обработке проназой с последующей гель-фильтрацией.

На основании проведенных исследований составлена схема постановки опыта по изучению возможности встраивания синтезирующихся полипептидов в липосомы. Она включала следующие этапы: 1) трансляцию поли(А)+РНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе в присутствии липосом; 2) удаление пептидил-тРНК из рибосом с помощью дополнительной инкубации системы с пурамицином; 3) выделение липосом из системы гель-фильтрацией через сефарозу 4В; 4) обработку липосом проназой и повторную очистку их гель-фильтрацией; 5) определение в липосомах продуктов трансляции с помощью радиоизотопных и иммунохимических методов.

Таблица 1

Содержание <sup>14</sup>С-аминокислоты в препарате липосом после их инкубации в бесклеточной системе трансляции поли(А)+РНК

Label level assambled with liposomes after their incubation in cell-free system of lactating mammary gland and reticulocytes poly(A)+RNA translation

Источник поли (А)+РНК	Тотальный ТХУ-преципитируемый продукт трансляции, %	Продукт трансляции, связанный с липосомами, %	
		До обработки проназой	После обработки проназой
Лактирующая молочная железа	100	31	23
Ретикулоциты	100	25	2

Контролем на сорбцию аминокислот служило связывание метки с липосомами, инкубированными в системе при отсутствии мРНК. Величина эта оказалась весьма незначительной: 1—2 % суммарного ТХУ-преципитируемого продукта.

В экспериментах, проведенных по такой схеме (табл. 1), было показано, что при трансляции поли(А)+РНК из молочной железы в обработанных проназой липосомах обнаруживается 23 % меченого ТХУ-осаждаемого продукта. В то же время при использовании РНК из ретикулоцитов содержание метки едва достигает 2 %.

Недоступность полипептидов протеолитическому расщеплению может быть обусловлена их встраиванием во внутренний объем липосом и (или) интегрированием в бислой. Для рассмотрения этих вариантов в опыте использовали липосомы, наполненные проназой. После инкубации в бесклеточной системе очищенные препараты таких липосом подвергали разрушению с последующей преципитацией содержимого 3 %-ной ТХУ. Мы исходили из того, что проникающие внутрь липосом меченые полипептиды расщепляются проназой и при осаждении ТХУ остаются в надосадочной жидкости, а пептиды, встроенные в бислой, выпадают в осадок. Как видно из табл. 2, с липосомами в указанных условиях связывается 32 % тотального продукта трансляции поли(А)+РНК из лактирующей молочной железы. Причем около 23 % этого продукта содержится внутри липосом и лишь около 9 % встроено в мембрану.

Таким образом, основная масса связанного с липосомами продукта трансляции поли(А)+РНК лактирующей молочной железы проникает через липидный бислой и накапливается во внутреннем объеме липосом. Поскольку использованные препараты поли(А)+РНК кодируют преимущественно синтез казеина [15], есть все основания полагать, что именно он проникает внутрь липосом. Справедливость этого заключения подтвердилась иммунохимическим анализом содержимого липосом (рис. 1).

Транслокация казеина через липидную мембрану, как и других секреторных белков, осуществляется, по-видимому, ко-трансляционно. Так, в случае использования в системе вместо мРНК  $^{125}\text{I}$ -меченного казеина при гель-фильтрации через колонку с сефарозой 4В компонентов этой системы (рис. 2) метка ( $^{125}\text{I}$ -казеин) элюируется значительно позднее, чем липосомы (выходят в свободном объеме). Это свидетельствует о том, что зрелый казеин не способен проникать через липидный бислой.

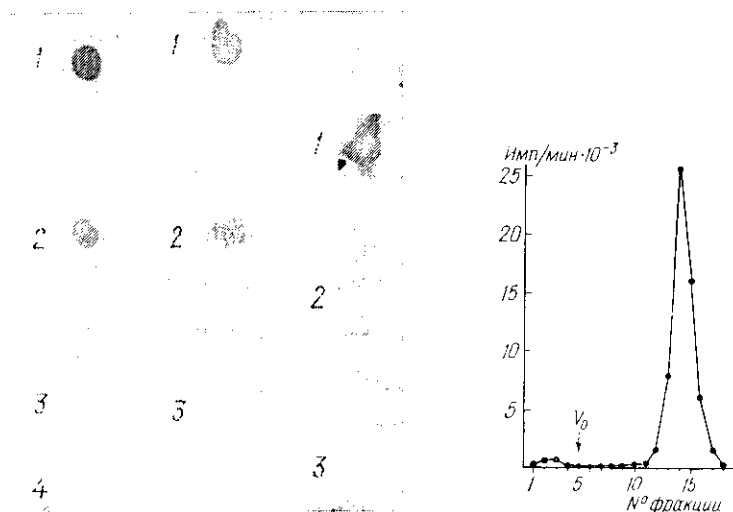


Рис. 1. Иммунохимический анализ продукта трансляции, связанного с липосомами, инкубированными в бесклеточной системе трансляции поли(А)+РНК из лактирующей молочной железы и обработанными проназой: а — 400 (1), 40 (2), 4 (3) и 1 нг (4) казеина; б — 400 нг казеина (1), 20 (2) и 4 мкл (3) раствора препарата, выделенного из липосом, инкубированных в бесклеточной системе трансляции казеиновой мРНК; в — 400 нг казеина (1), 20 (2) и 4 мкл (3) раствора препарата, выделенного из липосом, инкубированных в бесклеточной системе без добавления экзогенных мРНК

Fig. 1. Immunochemical assay of the translation product assembled with liposomes after their incubation in the cell-free system of lactating mammary gland poly(A)+RNA translation and treated with pronase: а — 400 (1), 40 (2), 4 (3) and 1 ng (4) of casein; б — 400 ng of casein (1), 20 (2) and 4  $\mu\text{l}$  (3) of the preparation isolated from liposomes incubated in the cell-free system of casein mRNA translation; в — 400 ng of casein (1), 20 (2) and 4  $\mu\text{l}$  (3) of the preparation isolated from liposomes incubated in the cell-free system without exogenous mRNA

Рис. 2. Радиоактивность фракций при гель-фильтрации через колонку с сефарозой 4В компонентов бесклеточной белоксинтезирующей системы, содержащей липосомы и  $^{125}\text{I}$ -меченный казеин (вместо мРНК)

Fig. 2. Sepharose-4B gel filtration of the components of the cell-free system for synthesis and transfer of casein into liposomes contained  $^{125}\text{I}$ -labelled casein (instead of mRNA)

Таблица 2

Содержание  $^{14}\text{C}$ -аминокислоты в препарате липосом, нагруженных проназой, после инкубации их в бесклеточной системе трансляции поли(А)+РНК из лактирующей молочной железы

Label level assembled with pronase containing liposomes after their incubation in cell-free system of casein mRNA translation

Условия внесения липосом в систему	Тотальный продукт трансляции, %	Продукт трансляции, связанный с липосомами, %		
		Целые липосомы	Разрушенные липосомы	
			Осадок	Супернатант
До начала синтеза казеина	100	32	9	23
После окончания синтеза казеина	100	9	9	0

Примечание. Липосомы разрушали добавлением в среду ТХУ до конечной концентрации 3%. Смесь центрифугировали и определяли уровень метки в преципитате и надосадочной жидкости.

Видимо, наличие на N-конце синтезирующегося казеина «лидерной» последовательности и позволяет ему прошикать через мембрану в отличие от глобина и зрелого казеина, не содержащих такой последовательности.

Недавно было показано, что предшественники некоторых секреторных белков прочно связываются с липосомами, причем определенная часть полипептидной цепи оказывается недоступной действию протеаз [22]. Авторы полагают, что этими участками являются «сигнальные» последовательности, проникающие в бислои. Остальная же часть полипептида находилась на наружной поверхности липосом. Скорее всего, при нашей постановке эксперимента происходит не только встраивание фрагментов казеина в фосфолипидный бислой, но и проникновение синтезированных полипептидов во внутренний объем везикул, хотя о размере встроивших полипептидов судить еще трудно.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что транслокация казеина через искусственный фосфолипидный бислой протекает ко-трансляционно, наличие же в мембране специального белкового рецептора не является обязательным.

#### INTERACTION OF IN VITRO SYNTHESIZED CASEIN WITH ARTIFICIAL PHOSPHOLIPID VESICLES

*D. I. Bulkov, A. E. Rachkov, L. I. Kolchinskaya, N. F. Starodub, A. V. Elskaya, V. K. Lishko*

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The model system is developed to study the incorporation of products of eukaryotic mRNA cell-free translation into lecithin liposomes. It is shown that in the presence of casein mRNA the <sup>14</sup>C-labeled product of translation is accumulated inside liposomes. When mRNA for globin, a nonsecretory protein, is translated in this cell-free system, <sup>14</sup>C-label is not found in the internal volume of liposomes. The polypeptides extracted from liposomes after their incubation in the system of casein mRNA translation interact specifically with anti-casein antibodies.

These data provide evidence that the transfer of synthesizing casein through bilayered lipid membrane does not require a specific receptor. Insertion and transfer of this protein occur co-translationally, due to the interaction of «signal peptide» with membrane lipids

1. Спиринов А. С. Ко-трансляционное встраивание, компартментализация и модификация белков // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 6.— С. 1445—1460.
2. Blobel G., Sabatini D. D. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fraction. I. Location of the polypeptides within ribosomes // J. Cell Biol.— 1970.—45, N 1.— P. 130—145.
3. Sabatini D. D., Blobel G. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fraction. II. Location of the polypeptides in rough microsomes // Ibid.— P. 146—157.
4. Michel H., Meyer D. Pushing the signal hypothesis: what are the limits? // Biol. Cell.— 1984.—52, N 1.— P. 1—8.
5. Adelman M. R., Sabatini D. D., Blobel G. Ribosomes-membrane interaction. Nondisassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components // J. Cell Biol.— 1973.—56, N 1.— P. 206—229.
6. Smith W. P., Tai P. C., Davis B. D. Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1978.—75, N 12.— P. 5922—5925.
7. Onno-Iwashita G., Wolf P., Wickner W. Processing of preprotein by liposomes bearing leader peptidase // Biochemistry.— 1984.—23, N 25.— P. 6178—6184.
8. Meyer D., Krause E., Dobberstein B. Secretory protein translocation across membranes — the role of the «docking protein» // Nature.— 1982.—297, N 5865.— P. 647—650.

9. *Walter P., Blobel G.* Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 12.— P. 7112—7116.
10. *Synthesis of phage M13 coat protein and its assembly into membranes in vitro / W. Wickner, G. Mandel, C. Zwizinski et al.* // *Ibid.*—1978.—75, N 4.— P. 1754—1758.
11. *Взаимодействие щелочной фосфатазы с кислыми фосфолипидами клеток E. coli и искусственных мембран / М. А. Несмеянова, М. В. Богданов, М. Н. Колот, О. А. Землянухина* // *Биохимия.*—1982.—47, № 4.— С. 671—677.
12. *Несмеянова М. А.* Молекулярные механизмы участия мембран в биосинтезе секретрируемых белков и его регуляции у *Escherichia coli* // *Успехи соврем. биологии.*—1982.—94, № 2.— С. 225—252.
13. *Выделение индивидуальных мРНК и иммунохимическое тестирование продуктов трансляции / Н. Ф. Стародуб, А. Э. Рачков, А. В. Петик и др.* // *Методы молекуляр. биологии.*— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 90—99.
14. *Выделение глобиновой мРНК человека и синтез комплементарной ей ДНК путем обратной транскрипции / С. А. Лимборская, Л. Ю. Фролова, Е. Е. Макаровская, С. Н. Хилько* // *Докл. АН СССР.*—1976.—230, № 4.— С. 981—984.
15. *Рачков А. Э., Стародуб Н. Ф.* Выделение биологически активных мРНК из молочной железы коров // *Молекуляр. биология.*—1984.— Вып. 37.— С. 29—33.
16. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryo cell-free system // *Meth. Enzymol.*—1974.—30.— P. 749—754.
17. *Bangham A. D., Hill H. W., Miller M.* Preparation and use of liposomes as model of biological membrane // *Meth. Membrane Biol.*—1974.— N 1.— P. 1—68.
18. *Szoka P., Papahadjopoulos D.* Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase emulsification // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75, N 9.— P. 4194—4198.
19. *Al-Sarray K., White D., Mayer K. J.* Purification and properties of casein from mammary gland of rabbits // *Eur. J. Biochem.*—1978.—9, N 2.— P. 269—277.
20. *McConahey P. J., Dixon F. J.* Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method // *Meth. Enzymol.*—1980.— 70, pt A.— P. 210—213.
21. *Wessel D., Flugge U. I.* A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids // *Anal. Biochem.*—1984.—138, N 1.— P. 141—143.
22. *Interaction of secretory protein precursors with phospholipides in liposomes / S. Nambu, A. Hikawa, N. Kitoo et al.* // *J. Biochem.*—1984.—96, N 4.— P. 1133—1142.
23. *Yoshikawa M., Mizukami T., Omori K.* Isolation and characterization of mRNA from mammary gland lactation cow // *Agr. and Biol. Chem.*—1981.—45, N 1.— P. 177—183.
24. *Structural properties of signal peptides and membrane insertion / J. Garnier, P. Grave, J. C. Merier, B. Robson* // *Biochimie.*—1980.—62, N 4.— P. 231—239.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР,  
Киев  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,  
Киев  
Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР,  
Киев

Получено 02.03.86