

SEQÜÈNCIES D'ÀCID POLIADENÍLIC ASSOCIADES AMB ESPÈCIES D'ARN MISSATGER EN CÈL·LULES EUCARIOTES

per L. CORNUDELLA *, I. FAIFERMAN i A. O. POGO

Laboratory of Cell Biology, The New York Blood-Ctr., N. Y. 10021

El descobriment dels mecanismes pels quals l'ARN missatger en les cèl·lules eucariotes és «transcrit» en el nucli cel·lular, madurat i transferit al citoplasma per a acoblar-se en el dispositiu cel·lular de traducció genètica, és un dels problemes essencials que té avui plantejats la Biologia Cel·lular. Els darrers 3 anys han vist acumular-se una certa evidència, d'altra part poc sòlida, tendent a suggerir que les espècies missatgeres són magatzemades per la cèl·lula en el nucli en forma de partícules RNP, és a dir, complexos d'ARN i proteïnes, anomenats «informòfers» per algun grup investigador.

Nosaltres hem treballat recentment en aquesta problemàtica i, per tant, el nostre propòsit ara és simplement de comentar els nostres resultats, els quals desglossarem en tres etapes per a comprendre'n millor la significació.

- 1) En primer lloc, localització i reconeixement de partícules RNP en sistemes cel·lulars no dinàmics.
- 2) A continuació, establiment de la cinètica de transport per mitjà de complexos riboproteics particulats i integració d'aquests en un dispositiu de biosíntesi associat a reticle endoplasmàtic (RE).
- 3) Finalment, presència de segments homopolimèrics d'àcid adenílic units al terminal 3' del missatger i llur implicació en el mecanisme de transport postulat per nosaltres.

Ens limitarem a una breu exposició de les dues primeres fases a títol d'introducció i per tal de fer més entenedora la significació de la darrera.

* Adreça actual: Dpt. de Química Macromolecular - C.S.I.C. - Barcelona.

Primera fase

Esquemàticament, els trets més sobresortints de la nostra experimentació en la primera etapa foren:

- a) Establiment d'un mètode de fraccionament cel·lular —per lisi química (no mecànica)— de gran suavitat i efectiu en el manteniment de la integritat de les fraccions subcel·lulars.
- b) Aïllament d'una fracció soluble nuclear exempta d'ADN.
- c) Reconeixement en aquesta subfracció d'un grup de partícules RNP.
- d) Identificació d'una partícula —al voltant de 40 unitats de sedimentació— amb característiques de missatger, és a dir:

ARN de composició similar a ADN (baix contingut de GC).
Incorporació ràpida de precursors radioactius.

Segona fase

En la segona etapa, i donada la impossibilitat d'estudis cinètics en el sistema originàriament emprat —fetge de rata—, escollírem un nou sistema que exhibís aquesta característica. L'elecció recaigué en tumors ascítics, els quals, a més d'ésser líquids, poden ésser sincronitzats per dejuni d'aminoàcids. Els resultats assolits amb cèl·lules ascítiques de KREBS foren:

- a) Caracterització d'una població de partícules nuclears RNP similars a les de fetge de rata.
- b) Aïllament i caracterització d'una «Estructura membranosa» contenint ARN missatger i ribosomes.
- c) Reversibilitat del procés de desaparició dels ribosomes en citoplasma dependent de la presència o absència d'aminoàcids en el medi d'incubació.
- d) Confirmació addicional de la presència de ribosomes en «l'Estructura» en alliberar-ne subunitats 40S i 60S previ tractament amb EDTA.

Totes aquestes dades suggereixen que les cèl·lules ascítiques constitueixen un «complex de traducció» organitzat a nivell del RE. La possibilitat de tractar-se d'un «mecanisme universal de traducció», almenys pel que fa als organismes superiors, ens decidí a la recerca de nova evidència, i amb això encetem la darrera fase de la nostra experimentació.

Llargos segments de nucleòtids d'adenosina (Poli-A) han estat detectats recentment en ARN missatger (mARN) i ARN nuclear heterogeni (HnARN) de diversos tipus d'ARN d'eucariotes ^{4, 5, 10, 12, 14} i també vírics ^{1, 8, 9, 11, 15}. Sembla que l'addició de Poli-A al terminal 3'-OH del HnARN

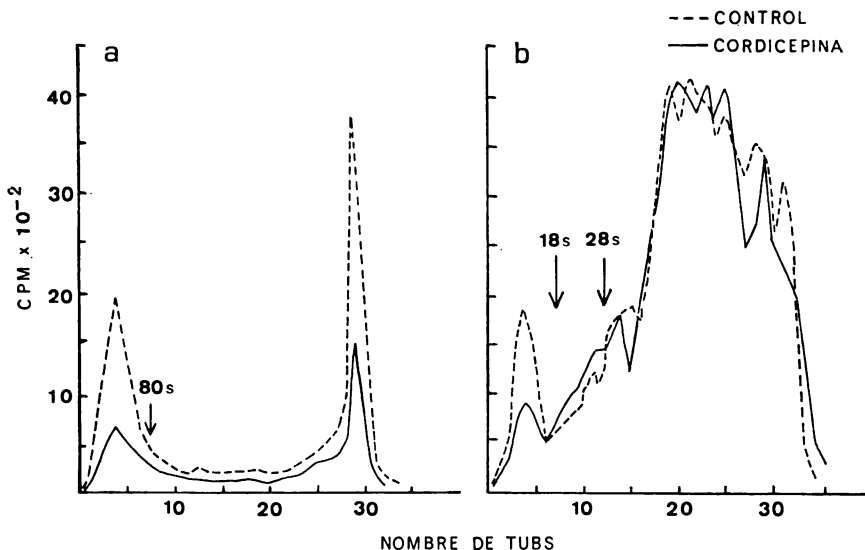


FIG. 1a. — Cèl·lules ascítiques d'Ehrlich foren extretes de ratolins una setmana després de la inoculació, rentades dues vegades en tampó salí de fosfat i incubades a una densitat de 2×10^4 cèl·lules/ml, com ha estat ja descrit¹, contenint $0,04 \mu\text{g/ml}$ d'actinomicina-D i $1 \mu\text{g/ml}$ de bromur d'etidi. Passats 30 minuts d'incubació, hom hi afegí $25 \mu\text{g}$ de cordicepina, seguit de $2,5 \mu\text{Ci/ml}$ d'³H-uridina (25 Ci/mol ; Schwarz/Mann) 30 minuts més tard i la incubació continuada per una altra mitja hora. La incorporació fou deturada per addició d'uridina no radioactiva en excés de 10^4 i alíquotes foren recollides després de 3 h. d'incubació. Les cèl·lules foren rentades i lisades, i la fracció nuclear crua fou rompuda mitjançant una premsa de French¹. Hom centrifugà els nuclis trencats, a 12.000 r. p. m. durant 15 minuts. El sobrenedant es diposità damunt un gradient al (10-30) % de sacarosa que contenia 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, preparat sobre un coixí de 2 ml de 2 M sacarosa, i fou centrifugat a 40.000 r. p. m. durant 50 minuts en el SPINCO SW-40. Els gradients foren fraccionats i cadascuna de les fraccions fou precipitada amb àcid tricloracètic al 10 % i analitzada com ha estat descrit.

FIG. 1b. — Les cèl·lules foren incubades en les mateixes condicions esmentades en la figura 1a. Al final de la incubació hom retirà ensembles alíquotes de 10 ml del cultiu-control i del tractat amb cordicepina i les vessà damunt 30 ml de solució gelada al 0,9 % de NaCl. Les cèl·lules foren rentades dues vegades en solució salina i l'ARN fou extret pel mètode del fenol-dodecilsulfat sòdic¹. L'ARN aïllat es diposità en un gradient de sacarosa al (15-30) % en 0,05 M acetat sòdic pH 5,0 i 0,1 M NaCl i fou centrifugat durant 16 h. a 25.000 r. p. m. Un cop fraccionats, les fraccions foren dissoltes en barreja de Bray i llur radioactivitat fou mesurada¹.

té lloc després del procés de transcripció i es conserva durant l'elaboració de mARN a partir de HnARN ^{3, 13}.

En publicacions prèvies ^{2, 6, 7} hem palesat que partícules nuclears aïl·lades de tumors ascítics, contenint mARN, són transportades al citoplasma cel·lular, on romanen unides a membranes del reticle endoplasmàtic o bé

els transfereixen llur mARN. Amb la finalitat d'entendre la correlació de la biosíntesi de l'HnARN amb la formació d'aquestes partícules nuclears i l'enllaçament del mARN a les membranes citoplasmàtiques, hem estudiat la cinètica de síntesi i el contingut de Poli-A en aquests components aïllats de cèl·lules de tumors ascítics.

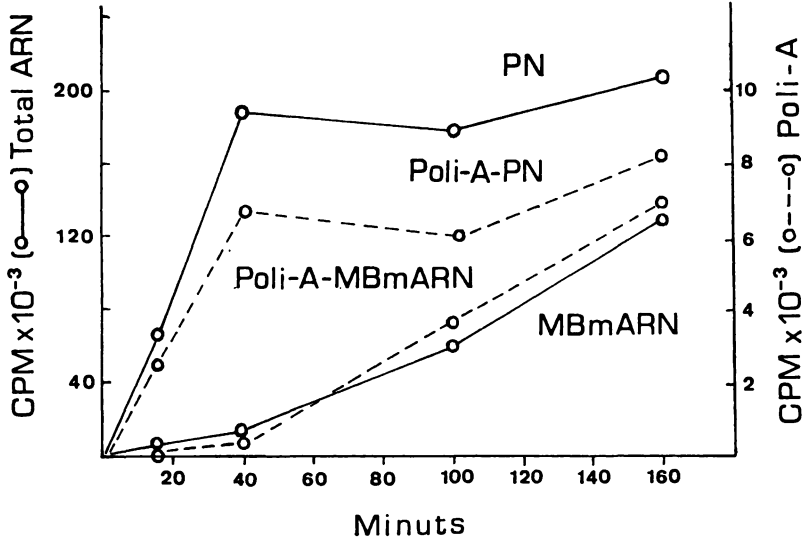


FIG. 2. — Les cèl·lules foren incubades en les condicions de la fig. 1a. A continuació hom hi afegí 3 μ Ci/ml d'³H-adenosina (25 Ci/mmol; Schwarz/Mann) i 0,7 μ Ci/ml d'¹⁴C-uridina (50 m Ci/mmol; Schwarz/Mann). Hom recollí al·lquotes en els intervals indicats. Les partícules nuclears i el mARN unit a les membranes foren obtinguts com ja ha estat indicat i llur ARN extret pel mètode esmentat en la fig. 1b. Una al·lquota de l'ARN extret fou dissolta en una solució que contenia 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂ i digerida amb DNasa I (20 μ g/ml; Worthington Biochem. Corp.) durant 15 minuts a 37 °C. L'àcid poliadenílic fou mesurat per la tècnica del Millipore ¹⁵. Cap compte de ¹⁴C-uridina no fou retintut pel filtre. En l'altra al·lquota, l'ARN extret fou precipitat per l'àcid tricloracètic al 10 % i la radioactivitat de l'³H-adenosina i ¹⁴C-uridina mesurades. Un procés similar d'incorporació fou obtingut amb els dos precursors d'ARN marcats.

³H-adenosina incorporada en ARN total.

³H-adenosina incorporada en Poli-A.

PN=partícules nuclears, MBmARN=mARN enllaçat a membranes.

Quan les cèl·lules ascítics foren incubades amb cordicepina fou inhibida la formació de partícules nuclears i de mARN enllaçat a membranes (Fig. 1a), però la síntesi d'HnARN no fou alterada (Fig. 1b). La droga, doncs, inhibeix la transformació de l'HnARN, però no la seva síntesi. O sigui, el seu efecte global consistí a deturar el flux de molècules de mARN des de l'HnARN a les partícules nuclears.

La cinètica de l'aparició d'ambdós, ARN i Poli-A, en partícules nu-

clears i membranes és apreciable a la Fig. 2. Durant els primers 40 minuts d'etiquetat, la incorporació radioactiva en ARN i Poli-A es limita a les partícules nuclears. A continuació s'assoleix un estat estacionari en la incorporació, per a produir-se finalment l'aparició d'ARN i Poli-A marcats en les membranes, probablement coincidint amb el temps precisat per a establir-se l'equilibri en la reserva cel·lular de partícules. Les anteriors observacions indiquen una relació «precursor-producte» de partícules nuclears i mARN unit a membranes, tot assenyalant una simultània entrada de Poli-A i ARN total en ambdues estructures; per tant, confirmen les nostres troballes prèvies⁷ referents a la presència de mARN en partícules nuclears i membranes citoplasmàtiques.

En definitiva, els resultats aquí esmentats suggereixen que en cèl·lules ascítiques, el flux de mARN del nucli cel·lular al citoplasma comença per l'addició de Poli-A a l'HnARN i continua amb el trencament de les molècules d'HnARN i subsegüent unió amb proteïnes (partícules nuclears 43s), per a enllaçar finalment amb membranes del reticle endoplasmàtic.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, J. A., EDMONDS, M., NAKAZATO, M., PHILLIPS, B. A. i VAUGHAN, M.: «Science» 176, 526 (1972).
2. CORNUDELLA, L., FAIFERMAN, I. i POGO, A. O.: Abs. «8th FEBS Meeting» (479) Amsterdam, Agost 1972.
3. DARNELL, J. E., PHILIPSON, L., WALL, R. i ADESNIK, M.: «Science», 174, 507 (1971).
4. DARNELL, J. E., WALL, R. i TUSHINSKI, R. J.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1321 (1971).
5. EDMONDS, M., VAUGHAN, M. i NAKAZATO, H.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1336 (1971).
6. FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. i POGO, A. O.: «Fed. Proc.», 30-311, 1290 (1971).
7. FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. i POGO, A. O.: «Nature New Biol.», 233, 234 (1971).
8. GILLESPIE, D., MARSHALL, S. i GALLO, R. C.: «Nature New Biol.», 236, 227 (1972).
9. JOHNSTON, R. E. i BOSE, H. R.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 69, 1514 (1972).
10. KATES, J.: «Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.», 35, 743 (1970).
11. LAI, M. M. C. i DUESBERG, P. H.: «Nature», 235, 383 (1972).
12. LEE, S. Y., MENDECKI, J. i BRAWERMAN, G.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1331 (1971).
13. MENDECKI, J., LEE, S. Y. i BRAWERMAN, G.: «Biochem», 11, 792 (1972).
14. PEMBERTON, R. E. i BAGLIONI, C.: «J. Mol. Biol.», 65, 531 (1972).
15. PHILIPSON, L., WALL, R., GLICKMAN, G. i DARNELL, J. E.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 2806 (1971).