

УДК 612.014.1/2

БИОХИМИЯ

М. Т. А. МАРТИНЕС, Б. Б. ФУКС

ЦИТОХИМИЯ РНК В МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМАХ ФГА-БЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 24 II 1971)

В течение шестидесятих годов появились немногочисленные сообщения о наличии РНК в метафазных хромосомах у животных (¹⁻⁵). Опубликованы две работы (^{4, 5}), в которых меченая РНК обнаружена в метафазных хромосомах ФГА-бластов человека. Однако метка в метафазных пластинках располагалась не только над хромосомами, но и между ними. В перечисленных работах не была исключена возможность того, что меченая РНК содержится не в самой хромосоме, а в слое кариоплазмы, окутывающем метафазную хромосому. Свойства этой РНК почти не исследованы, хотя имеются данные (¹) о ее длительном присутствии в интерфазных и метафазных хромосомах.

В настоящем исследовании была поставлена задача установить, имеются ли в метафазных хромосомах собственно хромосомная РНК и каковы ее свойства.

Опыты поставлены на 15 72-часовых культурах лимфоцитов крови стимулированных фитогемагглютинином (Welcome), от 6 разных людей. При выборе условий опыта мы исходили из данных (⁶), что после 60 час. культивирования быстромеченая (30 мин.) РНК в ФГА-блестах представлена в основном нерибосомной РНК (в частности по нуклеотидному составу), и из данных (^{7, 8}), согласно которым 0,1—0,15 мкг/мл актиномицина D полностью блокируют синтез рибосомной РНК в этих клетках.

ФГА-бласти метили H^3 -уридином (20 мкг/мл, уд.ак. 24 С/ммоль) в течение 15; 60 мин. и 6 час. в растворе Хэнкса с 20% бычьей сыворотки. Для предотвращения включения уридина в ДНК к среде добавляли холодный тимидин (5 мкг/мл). В двух группах опытов меченые в течение часа клетки трижды отмывали той же средой, содержащей холодный тимидин (5 мкг/мл) и холодный уридин (50 мкг/мл), а затем культивировали в течение 4 и 9 час. в такой же среде. Контрольные опыты показали, что в таких условиях утилизация предшественников из пула или реутилизация продуктов деградации были практически исключены. После этого следовало изготовление препаратов метафазных пластинок. Мазки помещали в холодную трихлоруксусную кислоту и покрывали эмульсией типа «М» (НийХимфото). В препаратах подсчитывали число гранул серебра над 50—100 метафазными пластинками или над 300—1000 интерфазных ядер. Результаты подсчетов обрабатывали статистически.

Для изучения свойств меченой РНК в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах препараты подвергали действию рибонуклеазы в растворах хлористого калия разной ионной силы при разной температуре, дезоксирибонуклеазы, проназы и уксусного ангидрида в разных комбинациях. В некоторые культуральные сосуды для блокирования ДНК-зависимого синтеза РНК сначала вводили актиномицин D в концентрации от 0,1 до 5 мкг/мл и через 30 мин. вводили H^3 -уридин. Через 30 мин. после добавления меченого уридина готовили препараты метафазных пластинок. Обработка метафазных пластинок рибонуклеазой в дистиллированной воде (3 мкг/мл, 20 мин. 37°) ведет к удалению меченой РНК из межхромосомных

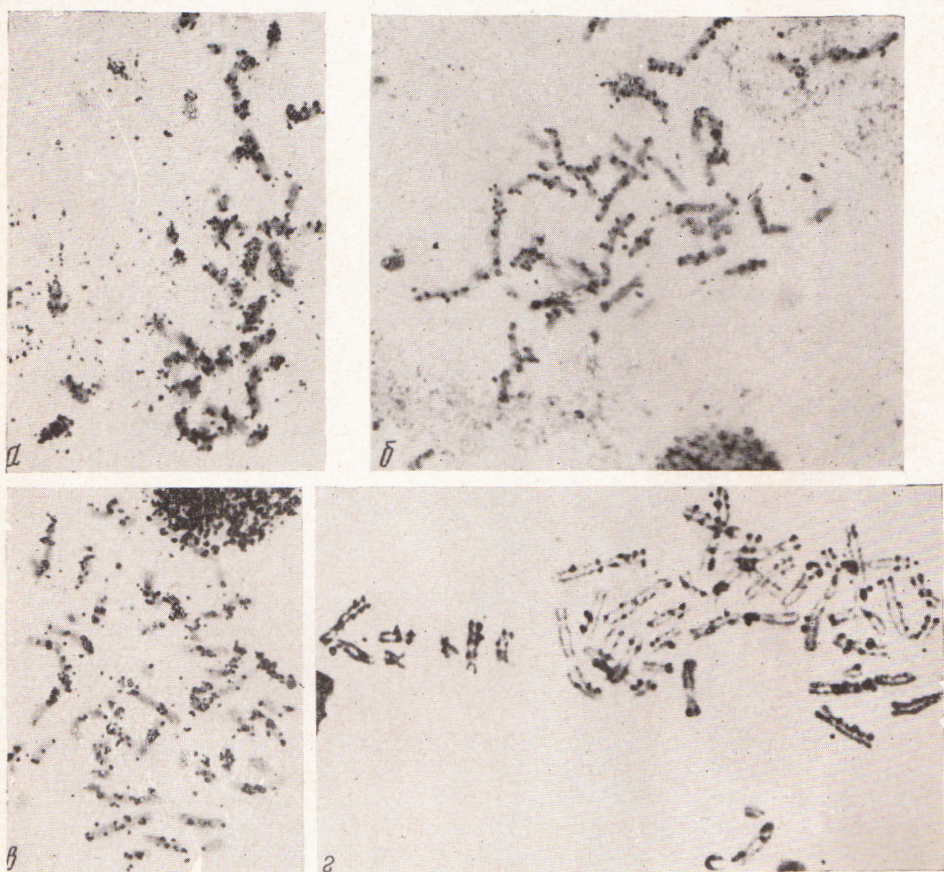


Рис. 1. Меченая РНК в метафазных хромосомах. 900X. *а* — до обработки рибонуклеазой; клетки метились за 9 час. до митоза. *б* — после обработки рибонуклеазой (3 $\mu\text{г}/\text{мл}$ в 0,6 *М* KCl); клетки метились за 9 час. до митоза. *в* — клетки метились в течение часа; мазок обработан рибонуклеазой в растворе высокой ионной силы. *г* — ФГА-бласты помещены в среду с актиномицином D (1 $\mu\text{г}/\text{мл}$) на 15 мин., затем в среду добавляли H^3 -уридин на 45 мин.; мазки обработаны рибонуклеазой в 0,6 *М* растворе KCl

промежутков и 97,5% метки над хромосомами. Обработка раствором рибонуклеазы в 0,6 М КСl сопровождается почти полным удалением метки из межхромосомных промежутков, но лишь 20% метки из хромосом (рис. 1). Такая же резистентная к ферменту РНК была найдена в интерфазных ядрах ФГА-бластов (рис. 2) в опытах с часовой меткой и в опытах с 4- и 9- часовым слежением. В интерфазных ядрах ФГА-бластов разных людей обнаружено 40—70% быстромеченой РНК, резистентной к рибонуклеазе в растворе высокой ионной силы. В процессе 9-часового слежения доля резистентной РНК в ядрах ФГА-бластов одного и того же человека закономерно возрастала (например в одном из опытов с 57 до 76%).

Резистентная к ферменту РНК, которую импульсно метили в интерфазе за 5—9 час. до митоза, обнаруживалась в метафазных хромосомах (рис. 1б) после chase в условиях, когда реутилизация была практически исключена. Ее содержание в интерфазных ядрах в течение 9-часового слежения падало не более чем на 27,6%.

После ацетилирования препаратов уксусным ангидридом (100%, 60°, 24 часа) из интерфазных ядер удалялось только $37 \pm 3,01\%$ РНК, резистентной к рибонуклеазе в 0,6 М растворе КСl. Можно заключить, что речь идет об РНК, находившейся в ионной связи с белками. При этом полностью исчезала меченая РНК из ядрышек ФГА-бластов.

Обработка слабыми концентрациями проназы (1—5 $\mu\text{г/мл}$ в фосфатном буфере рН $7,2 \pm 37^\circ$) с последующей обработкой рибонуклеазой в 0,6 М КСl вела к удалению из интерфазных ядер $30 \pm 3\%$ РНК, резистентной к рибонуклеазе в растворе высокой ионной силы.

Были предприняты попытки выяснить, не находится ли часть РНК, резистентной к РНКазе, в гибридной связи с ДНК. С этой целью препараты обрабатывали рибонуклеазой в 0,6 М растворе КСl в течение 20 мин. при разных температурах (от $+37^\circ$ до $+100^\circ$). Обращало на себя внимание незначительное падение (на 10—20%) содержания резистентной к ферменту РНК в ядрах ФГА-бластов в интервале между $+37^\circ$ и $+80^\circ$ и несколько более быстрое падение (на 20%) в интервале между 80° и 100° . Пока эти данные не позволяют с уверенностью говорить о плавлении ДНК — РНК гибридов в ядра ФГА-бластов. Опыты должны быть продолжены в условиях максимально возможной депротенинизации ядер и хромосом.

Таким образом, показано, что лишь часть быстромеченой РНК, резистентной к РНКазе, в ядрах ФГА-бластов связана с белками солевыми связями. Вопрос о причинах резистентности остальной РНК (примерно 60%) остается открытым.

На рис. 3 представлены результаты исследования зависимости скорости синтеза суммарной быстромеченой РНК, локализованной в ядрах (рис. 3а) и в хромосомах (рис. 3б), от концентрации актиномицина D. Видно, что доля РНК, чувствительной к актиномицину D, и в ядрах и в хромосомах невелика. Нижние кривые получены следующим образом. Интерфазные ядра или хромосомы ФГА-бластов, которые перед тем синтезировали РНК в присутствии разных концентраций актиномицина D, обрабатывали рибонуклеазой в 0,6 М КСl.

Можно видеть, что РНК, синтез которой резистентен к актиномицину, — это в большей части та РНК, которая резистентна также к рибонуклеазе в растворе высокой ионной силы.

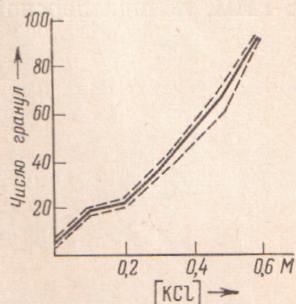


Рис. 2. Зависимость степени гидролиза меченой РНК в интерфазных ядрах ФГА-бластов от концентрации хлористого калия, в котором содержалась рибонуклеаза (3 $\mu\text{г/мл}$)

Очевидно, что резистентная к ферменту быстромеченая РНК в интерфазных ядрах и в метафазных хромосомах ФГА-бластов не является рибосомной.

Таким образом, в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах ФГА-бластов человека цитохимически обнаружена быстромечающаяся РНК, резистентная к рибонуклеазе в растворах высокой ионной силы.

Примерно треть ее находится в солевой связи с белками. Синтез этой РНК относительно резистентен к актиномицину D.

В ряде работ (⁶⁻¹⁰) показано, что в ФГА-бластах активируется синтез 4S-РНК, полидисперсной РНК в интервале 10—30S и более и, наконец,

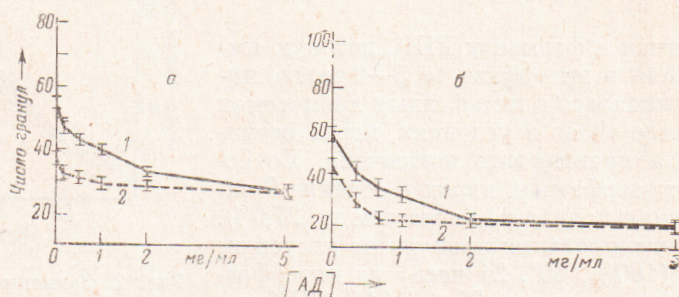


Рис. 3. Подавление синтеза РНК в ядрах ФГА-бластов при действии разных концентраций актиномицина D (1). Резистентность меченой РНК к рибонуклеазе в растворе высокой ионной силы (2). а — интерфазные ядра, б — метафазные хромосомы

рибосомной РНК и ее предшественников (18S, 28S, 32S, 45S). На относительно позднем этапе культивирования (свыше 60 час.) (^{6, 7}) рибосомная РНК составляла лишь малую часть тотальной быстромеченой РНК. Эти данные, а также отмеченная нами резистентность синтеза РНК, локализованной в метафазных хромосомах, к актиномицину D, говорят против ее рибосомной природы. Описываемая нами хромосомная РНК отличается большой длительностью жизни от полидисперсной РНК ФГА-бластов в указанных выше опытах (^{6, 7}). Правда, авторы не исключают возможность ускорения распада полидисперсной РНК в присутствии актиномицина D.

Полидисперсная РНК (⁷) отличалась от рибосомной высоким содержанием уридиловой и низким содержанием гуаниловой кислот, а от ДНК — большой разницей в содержании адениловой и уридиловой кислот. Не исключено, что РНК в метафазных хромосомах является одной из фракций полидисперсной РНК. Относительная резистентность хромосомной РНК к актиномицину D не обязательно зависит от преобладания АУ над ГЦ, но может быть связана с преобладанием определенных нуклеотидных последовательностей (¹¹).

4S-РНК, синтез которой активируется в ФГА-бластах (⁷), является, по-видимому, транспортной РНК, так как интенсивно метилируется (¹⁰).

Транспортные РНК легко теряются из клеток при цитохимических процедурах. Между тем описываемая нами РНК в метафазных хромосомах была к ним весьма резистентна. Можно было бы думать о сходстве РНК метафазных хромосом с РНК (3,4S), ковалентно связанной с белками. Последняя обнаружена в хроматине интерфазных ядер ряда тканей (¹²). Этот вопрос исследуется.

Независимо от вопроса о природе РНК в метафазных хромосомах стоит вопрос о закономерностях ее локализации в геноме. В первом приближе-

нии можно говорить о высокой частоте симметричного расположения этой меченой РНК в хроматидах, чаще в теломерных участках хромосомы (рис. 1а).

Институт морфологии человека
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
16 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. M. Prescott, M. A. Bender, J. Cell. and Comp. Physiol., 62, Suppl. 1, 175 (1963). ² L. E. Feinendegen, C. P. Bond, Exp. Cell Res., 26, 260 (1963). ³ R. R. Klewecz, T. C. Hsu, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 3 (1964). ⁴ S. Fujita et al., Nature, 210, № 5034 (1966). ⁵ M. T. A. Мартинес и др., ДАН, 187, № 4 (1969). ⁶ A. D. Rubin, H. L. Cooper, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 2 (1965). ⁷ H. L. Cooper, J. Biol. Chem., 243, 1 (1968). ⁸ Y. E. Kay, B. G. Levental, H. L. Cooper, Exp. Cell Res., 54, 1 (1969). ⁹ U. Torrelli et al., Exp. Cell Res., 42, 1 (1966). ¹⁰ I. P. P. V. Monjardino, A. MacGillivray, Exp. Cell Res., 60, 1 (1970). ¹¹ K. D. Wells, Y. E. Larson, J. Mol. Biol., 49 (1970). ¹² J. Bekhor, J. Bonner, G. K. Damhus, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 62, 1 (1969).