

В. В. КАЗАНЬЕВ

ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ МИТОТИЧЕСКОГО АППАРАТА В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 18 XI 1970)

Вопрос о происхождении белков митотического аппарата до сих пор остается дискуссионным. Иммунохимические исследования ⁽¹¹⁾ позволяют предполагать, что в интерфазной клетке существует запас макромолекул — «предшественника», который длительно хранится в цитоплазме и служит материалом для построения митотического аппарата. С другой стороны, ряд автордиографических исследований ^(2, 3, 5, 8) убеждают, что митотический аппарат образуется не только путем агрегации предсуществующих макромолекул, но и путем синтеза белков *de novo*. Если митотический аппарат действительно формируется из белков, синтезированных перед митозом, то было бы важно знать, в каком периоде интерфазы происходит этот процесс. Однако до сих пор мы располагаем лишь данными, согласно которым в разных клетках синтез цитоплазматических белков, идущих на удвоение массы цитоплазмы, происходит либо в течение периода G_2 ^(1, 10, 11, 13), либо в периодах G_1 и G_2 ^(6, 7). Время синтеза белков митотического аппарата пока остается неизвестным.

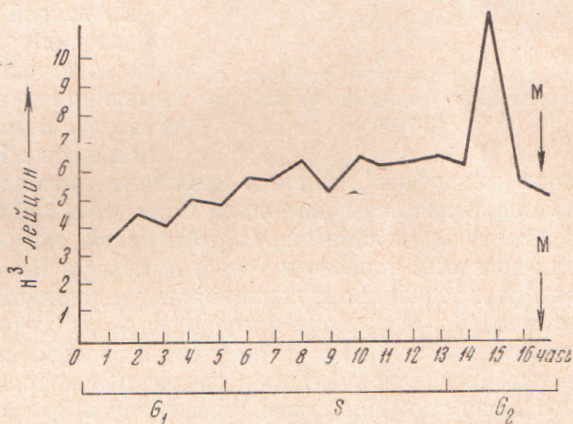


Рис. 1. Включение H^3 -лейцина на протяжении интерфазы синхронизированных клеток китайского хомячка

В настоящей работе предпринято изучение динамики синтеза белков в интерфазе и сделана попытка выявить использование этих белков для формирования митотического аппарата.

Опыты проводили на синхронизированной культуре хомячковых клеток линии 451. Синхронизация клеток осуществлялась колцемидом по методу Stubblefield ⁽⁹⁾. После обработки колцемидом (0,03 мкг/мл в течение 2 час.) была получена популяция клеток, 90—95% которой составляли клетки, находящиеся на стадии метафазы. Дополнительные исследования с H^3 -тимидином показали, что в период интерфазы сохраняется высокая степень синхронности развития клеток. Анализ динамики включения H^3 -тимидина и подсчет количества митозов позволили определить время генерации синхронизированной культуры клеток и установить продолжительность отдельных ее периодов. Расчеты показали, что продолжительность периода G_1 составляет 5—6 час., периода S 7—8 час. и периода G_2 2—4 часа. Об интенсивности синтеза белка в различные периоды интерфазы судили по включению H^3 -лейцина, который вводили в дозе

5 μ C/мл. После гидролиза 5% трихлоруксусной кислотой препараты покрывали эмульсией типа М (НИКФИ) и экспонировали в течение 30 дней. На полученных автографах проводили подсчет треков на единицу поверхности клетки.

Для изучения интенсивности синтеза белков на протяжении интерфазы и определения периода клеточного цикла, во время которого синтезируется белок, принимающий участие в построении митотического аппарата, были поставлены две серии опытов.



Рис. 2. Включение H^3 -лейцина в митотический аппарат во втором митозе

В первой серии опытов определяли включение H^3 -лейцина в течение каждого часа интерфазы. Результаты измерений (рис. 1) показывали, что интенсивность синтеза белка постепенно увеличивается на протяжении всей интерфазы. Обращает на себя внимание резкое увеличение синтеза белков в период G_2 , когда включение H^3 -лейцина увеличилось почти в 2 раза по сравнению с обычным интерфазным уровнем.

Во второй серии опытов была сделана попытка определить, в какой период клеточного цикла синтезируются белки, принимающие участие в построении митотического аппарата. После часовой инкубации клеток с H^3 -лейцином в различные пе-

риоды интерфазы, с целью исключить перераспределение включившегося изотопа, препараты помещали в среду, содержащую избыточное количество немеченного лейцина. Обработанные таким способом клетки фиксировали во время первого и второго митозов. На полученных препаратах изучали распределение и локализацию в делящейся клетке H^3 -лейцина. Было установлено, что после инкубации в различные интервалы периода G_1 включившийся изотоп располагается в основном по периферии делящейся клетки. После инкубации в различные интервалы периода S метка локализовалась как над хромосомами, так и по периферии клетки. После введения H^3 -лейцина в периоде G_2 изотоп распределялся диффузно над всей поверхностью делящейся клетки. В этом случае хромосомы оставались не меченными. Исследование клеток после фиксации во втором митозе показало, что после инкубации в периодах G_1 и S включившийся H^3 -лейцин располагается в основном по периферии клеток. В клетках, инкубированных с H^3 -лейцином в периоде G_2 , во втором митозе изотоп локализовался преимущественно над зоной митотического аппарата (рис. 2). Эти наблюдения позволяют полагать, что синтез белков митотического аппарата осуществлялся в периоде G_2 , но используется главным образом для построения митотического аппарата через одно поколение.

Таким образом, результаты наших опытов показывают, что каждому митозу предшествует синтез белков в препрофазе. Белки, синтезированные в периоде G_2 , идут не только на удвоение массы цитоплазмы, но и на формирование митотического аппарата. Однако в дискуссии о происхождении митотического аппарата мы должны занять промежуточную позицию. Хотя каждому митозу действительно предшествует синтез белков митотического аппарата, однако для построения этой структуры они преимущественно используются не сразу, а лишь через один клеточный цикл. В свете этих данных можно говорить о запасном фонде белков митотического аппарата. Но под этим понятием следует (во всяком случае для данного объекта) понимать не длительно хранящийся запас материала, как это подразумевает гипотеза «предшественника», а лишь задержку ис-

пользования синтезированных белков для построения митотического аппарата на одно клеточное поколение.

Научно-исследовательский институт
морфологии человека
Москва

Поступило
9 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. Я. Левина, И. М. Шапиро, ДАН, 176, № 6, 1411 (1967). ² Th. Bibring, G. Cousineau, Nature, 21, 4960, 805 (1964). ³ P. R. Gross, G. Cousineau, J. Cell Biol., 19, 1, 260 (1963). ⁴ F. Legros, J. Brachet, J. Embriol. and Exp. Morphol., 13, 2, 195 (1965). ⁵ J. Mangan, T. Miki-Noumura, P. R. Gross, Science, 147, 1575 (1965). ⁶ G. Mittermayer, R. Braun, H. Rusch, Biochim. et biophys. acta, 91, 399 (1964). ⁷ C. Mittermayer, R. Braun et al., Nature, 11, 5041, 53 (1966). ⁸ D. W. Stafford, R. M. Iverson, Science, 143, 3606, 580 (1964). ⁹ K. Stubblefield, R. Klevecz, Exp. Cell Res., 40, 3, 660 (1965). ¹⁰ Van't Hof, Nature, 23, 3690, 341 (1963). ¹¹ G. Went, D. Mazia, In: Micromolec. Compl., N. Y., 1961, p. 191, 177. ¹² J. W. Woodard, E. Rasch, H. Swift, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 9, 3, 445 (1961). ¹³ A. Zetterberg, D. Killander, Exp. Cell Res., 39, 1, 22 (1965).