

Н. Г. ВИНОГРАДОВА, А. В. ЗЕЛЕНИН

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ДНП ЛИМФОЦИТОВ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ АКТИВАЦИИ И ЧАСТИЧНОЙ ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ

(Представлено академиком А. А. Баевым 29 IV 1972)

Р. Риглером (¹³) был предложен цитофлуориметрический метод определения функционального состояния хроматина в отдельных клетках. В основе метода лежит химическое сродство люминесцирующего красителя акридинового оранжевого (АО) к фосфатным группам дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Интенсивность люминесценции отдельной клетки дает при этом представление об относительном количестве связанного с ДНК красителя и меняется при изменении функционального состояния хроматина.

В опытах с использованием этого метода (^{4, 7, 8, 11}) было установлено, что интенсивность люминесценции клеток резко возрастает после воздействия активирующего агента. Одновременно изменяется чувствительность ДНП к термальной денатурации и к кислотному гидролизу. Эти явления не сопровождаются изменением размера клеток, интенсификацией синтеза РНК или белка, наступающими позже, и расцениваются авторами как наиболее ранние изменения физико-химических свойств ДНП на пути превращения его из неактивного хроматина в функционирующую матрицу для синтеза РНК (подробнее см. обзор Рингертца (¹⁵)).

Изученные к настоящему времени модели имели либо полностью репрессированный хроматин (эритроциты птиц (^{7, 8}), лимфоциты периферической крови человека (¹¹), спермии мыши (⁴)), либо представляли

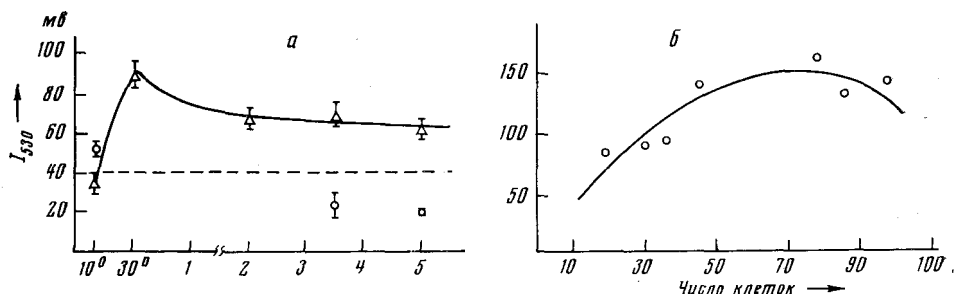


Рис. 1. Зависимость интенсивности зеленой люминесценции лимфоцитов лимфатических узлов I_{530} от времени действия ФГА (а) и от количества клеток на поверхности стекла (б)

собой пролиферирующие клетки культуры ткани (⁵). Представляло интерес изучить процесс активации хроматина в клетках, занимающих промежуточное положение между полностью неактивными спермиями и ядерными эритроцитами, с одной стороны, и пролиферирующими клетками культуры ткани, с другой. В качестве такой модели нами были взяты лимфоциты из лимфатических узлов мыши.

Суспензию лимфоцитов осаждали на стекле и инкубировали в культуральной среде 199 с добавлением сыворотки и витаминов. Фиксацию и окраску препаратов проводили по методике Риглера (¹³) с некоторыми изменениями (⁴), состоявшими в том, что отмывку препаратов от избытка

красителя проводили в растворе этого же красителя в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М. Принимая во внимание незначительное количество РНК в лимфоцитах, в большинстве опытов опускали процедуру ацетилирования и ограничивались определением интенсивности только зеленой люминесценции. Измерения проводили с помощью микроскопа — цитофлуориметра, собранного ⁽⁴⁾ на базе микроскопа МУФ-2. Опыты по термальной денатурации проводили согласно описанной в литературе методике ⁽¹⁴⁾.

Активацию хроматина осуществляли двумя способами: либо с помощью фитогемагглютинаина (ФГА), добавляя его в суспензию выделенных клеток ⁽¹¹⁾, либо осаждая на стекле определенное количество клеток, добиваясь эффекта «клеточной плотности» ⁽⁵⁾.

В первом случае зависимость интенсивности зеленой люминесценции (I_{530}) от времени действия ФГА выглядит так, как это показано на рис. 1а. В течение первых 30—40 мин. I_{530} у стимулированных лимфоцитов достигает максимального значения, и затем практически не меняется, в то время как контрольные клетки на протяжении всего времени инкубации сохраняют более или менее постоянное значение интенсивности люминесценции.

Увеличение интенсивности люминесценции зависит от концентрации ФГА в инкубационной среде, а при концентрации 100 мкг/мл составляет, как правило, 150—200% от интенсивности люминесценции нестимулированных клеток.

Для гистограмм, построенных по величине интенсивности люминесценции, характерно значительное смещение максимумов вправо и более размытый контур у стимулированных лимфоцитов по сравнению с контрольными. Коэффициент вариации увеличивается от 6—8% у контрольных до 10—15% у активированных клеток, что, вероятно, свидетельствует о различной чувствительности лимфоцитов из лимфатических узлов к активирующему агенту.

Опыты с меченым уридином показали (табл. 1), что включение радиоактивной метки в течение первого часа инкубации лимфоцитов в культуральной среде практически отсутствует как в контроле, так и в присутствии ФГА.

Таким образом, люминесцентный ответ на действие ФГА наблюдается значительно раньше, чем начинается синтез РНК в активированных клетках в наших условиях культивации.

В то же время после 4 час. инкубации с ФГА процент меченых клеток в 5 раз превышает эту величину в контрольных клетках, а среднее число зерен серебра на 1 клетку увеличивается по сравнению с контролем в

два раза (табл. 1). Эти данные согласуются с литературными ⁽¹²⁾.

Второй способ активации, в основе которого лежит эффект «клеточной плотности», состоит в том, что активирующим агентом являются сами клетки, которые, прикрепляясь к стеклу, оказывают воздействие друг на друга, по-видимому, путем выделения особого эксудата, существование которого дока-

Таблица 1
Действие ФГА на включение H^3 -уридина в лимфоциты лимфатических узлов (по данным автордиографического исследования)

	Через 1 час после начала опыта		Через 3 часа после начала опыта	
	конт-роль	ФГА	конт-роль	ФГА
Число меч. кл. (в %)	2,0	2,6	4,8	30,6
Число зерен серебра на 1 меч. кл.	10,0	9	12	21

зано иммунофлуоресцентным методом ⁽⁶⁾. Зависимость I_{530} от концентрации лимфоцитов при этом способе активации продемонстрирована на рис. 1 б.

В интервале от 0,5 до 5—7 клеток в стандартном поле зрения микроскопа ($40 \times 10 \times 1,6 \times$) интенсивность люминесценции практически не ме-

няется; начиная с концентрации 5–7 клеток отмечается четкая линейная зависимость величины I_{530} от концентрации клеток на поверхности стекла. При концентрации 70–80 клеток в поле зрения кривая выходит на плато, и начиная с определенной, более высокой концентрации наблюдается некоторое понижение I_{530} (рис. 1 б), видимо, вызванное контактным торможением. Разность между максимальными и минимальными значениями I_{530} составляет 300–400% от интенсивности люминесценции неактивированных клеток.

Полученные нами кривые плавления ДНК активированных и контрольных лимфоцитов из лимфатических узлов представлены на рис. 2, из которого следует, что те изменения, которые происходят с ДНП в процессе

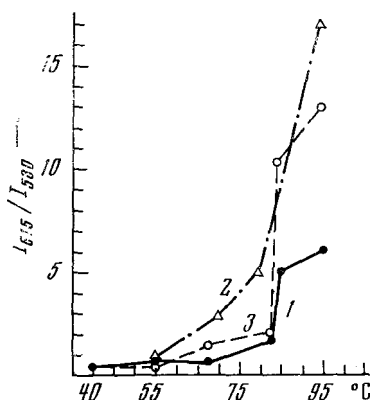


Рис. 3

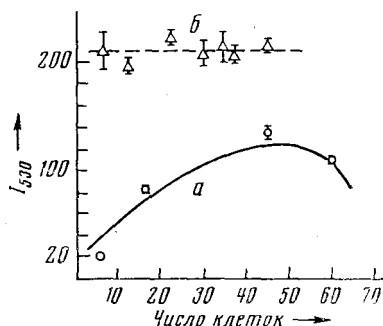


Рис. 2

Рис. 2. Кривые плавления ДНП лимфоцитов из лимфатических узлов: лимфоциты неактивированные (1), активированные (2), неактивированные лимфоциты после экстракции 0,6 М NaCl (3)

Рис. 3. Зависимость интенсивности зеленой люминесценции лимфоцитов от числа клеток на стекле: а — норма, б — экстракция 0,6 М NaCl

активации, существенно меняют физико-химическое состояние комплекса ДНП и делают его менее устойчивым к термальной денатурации.

Таким образом, оказалось, что лимфоциты из лимфатических узлов мыши отвечают на действие активирующего агента резким возрастанием связывания АО и изменением чувствительности комплекса ДНП к термальной денатурации. Эти изменения наблюдаются значительно раньше, чем отмечается синтез РНК в активированных клетках.

В литературе было высказано предположение ⁽¹⁵⁾, что в основе указанных изменений цитохимических свойств ДНП лежит ослабление связи ДНК с гистоном и наступающее вследствие этого освобождение фосфатных групп ДНК, способных реагировать с акридиновым оранжевым. Эта точка зрения базируется на ряде более или менее косвенных данных. В частности показано, что увеличение связывания АО, наблюдаемое при стимуляции лимфоцитов ФГА, полностью коррелирует с интенсификацией ацетилирования гистонов в активированных клетках ⁽¹⁶⁾. На выделенных ДНП установлено, что после удаления богатой лизином фракции гистона F₁ наступает усиление их матричной активности ⁽³⁾ и повышение связывания акридинового оранжевого ⁽¹⁾.

Нам представлялось интересным провести непосредственное сравнение изменений в свойствах ДНП, наступающих в процессе естественной активации лимфоцитов, с изменениями, возникающими при искусственной депротеинизации ядер. Для этого были поставлены опыты по частичной депротеинизации хроматина фиксированных лимфоцитов. Препараты лимфоцитов после фиксации в спирте с ацетоном подвергали солевой экстракции по методике, разработанной для растворов нуклеопротеидов ⁽³⁾, а затем окрашивали АО по применяемому нами способу. Эксперименты пока-

зали, что обработка клеток 0,6 М раствором хлористого натрия приводит к значительному возрастанию I_{530} (рис. 3) и увеличению чувствительности ДНП к нагреванию (рис. 2) подобно тому, как это имеет место в активированных клетках.

Для проверки чистоты экстракции была проведена серия биохимических контролей. Экстракт, полученный после обработки большого числа фиксированных на стекле клеток 0,6 М хлористым натрием, был исследован электрофоретически⁽¹⁰⁾. На гелях была получена четкая полоса, которая при сравнении с тотальным гистоном была идентифицирована как полоса F₁. Следовательно, обработка фиксированных клеток 0,6 М хлористым натрием приводит к избирательному удалению богатой лизином фракции гистона F₁, подобно тому как это имеет место в опытах с нуклеопротеидом *in vitro*⁽²⁾.

Таким образом, наши эксперименты показали, что удаление наиболее лабильной фракции гистона F₁ из фиксированных клеток в модельных опытах приводит к возникновению тех же цитохимических изменений в свойствах ДНП, которые наблюдаются в клетках при активации. Установление этого факта позволило попытаться выяснить реальное участие гистона F₁ в процессе активации хроматина. С этой целью удаление указанной фракции гистона было проведено из активированных и неактивированных лимфоцитов. Опыты показали, что экстракция 0,6 М хлористым натрием устраняет различия в интенсивности зеленой люминесценции между клетками разной активности (рис. 3). Полученные данные, как нам кажется, подтверждают существующее в литературе предположение об отходе гистонов от ДНК на ранних этапах активации хроматина. В то же время наши результаты дают возможность конкретизировать эти представления и полагать, что наблюдаемые в процессе активации ранние изменения физико-химических свойств ДНП, если не полностью, то в значительной степени, связаны с отходом гистона F₁. Это заключение вполне согласуется с результатами, полученными Георгиевым и др.⁽²⁾ на выделенных ДНП, но находится в противоречии с результатами Ауэра и Зеттерберга⁽⁵⁾ об участии в процессе активации хроматина только гистонов, богатых аргинином. Возможно, что в результате наших опытов и опытов Ауэра и Зеттерберга выявляются разные стороны или различные этапы активации хроматина. Разумеется, для окончательного выяснения причин указанного расхождения необходимы дополнительные исследования.

Авторы выражают благодарность А. А. Строкову и В. А. Колесникову за помощь при проведении отдельных экспериментов.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
29 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. Ф. Борисова, Э. Е. Минят, Мол. биол., 3, в. 5, 758 (1969). ² Г. П. Георгиев, Ю. В. Ильин, Мол. биол., 1, в. 6, 815 (1967). ³ П. Юхас, С. А. Лимборская и др., Мол. биол., 5, в. 4, 586 (1971). ⁴ И. М. Шапиро, В. А. Колесников и др., Онтогенез, 3, 618 (1972). ⁵ G. Auer, A. Zetterberg, D. Killander, Exp. Cell Res., 62, 1, 32 (1970). ⁶ L. Bolund, Z. Darzynkiewicz, N. Ringertz, Exp. Cell Res., 62, 1, 76, (1970). ⁷ L. Bolund, N. R. Ringertz, H. Harris, J. Cell Sci., 4, 1, 71 (1969). ⁸ L. Bolund, Z. Darzynkiewicz, N. Ringertz, Exp. Cell Res., 56, 3, 406 (1969). ⁹ Z. Darzynkiewicz, L. Bolund, N. R. Ringertz, Exp. Cell Res., 56, 3, 418 (1969). ¹⁰ B. W. Johns, J. Biochem., 104, 1, 78 (1967). ¹¹ D. Killander, N. Rigler, Exp. Cell Res., 39, 3, 701 (1965). ¹² J. P. P. V. Monjarding, A. MacGillivray, Exp. Cell Res., 60, 1, 1, (1970). ¹³ R. Rigler Jr., Acta physiol. scand., 67, Suppl. 267 (1966). ¹⁴ R. Rigler, D. Killander et al., Exp. Cell Res., 55, 2, 215 (1969). ¹⁵ N. R. Ringertz, Handbook of Molecular Cytology, Amsterdam—London, 1969, p. 656. ¹⁶ B. G. T. Pogo, V. G. Allfrey, A. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 55, 805 (1966).