

УДК 577.576.343

ГЕНЕТИКА

Г. А. ДВОРКИН, В. Ф. ЕФИМОВА, Л. И. КОГАНИЦКАЯ

ВЛИЯНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ НА СИНТЕЗ РНК В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 20 XI 1972)

В регуляции транскрипции генома существенная роль принадлежит ядерно-цитоплазматическим отношениям ⁽¹⁾. Однако механизм влияния цитоплазмы на синтез РНК в ядрах остается во многом неясным. Исследования такого рода встречаются с большими трудностями, так как влияние это многообразно и сложно. Поэтому значительный интерес приобретает возможность изучения влияния цитоплазмы в упрощенных модельных системах. Условия классической бесклеточной системы существенно отличаются от условий, имеющих в интактной клетке. Более адекватной с этой точки зрения является бесклеточная система, в которой изолированные клеточные ядра инкубируются в среде с контролируемым составом или в цитоплазме, предварительно освобожденной от ядер и мембран. Такой методический подход был использован Томпсоном и Маккарти ⁽²⁾, которые исследовали действие цитоплазмы на изолированные ядра животных клеток. Авторы изучали скорость синтеза РНК в изолированных ядрах и обнаружили ее изменение при инкубации ядер в гомологичной и гетерологичной цитоплазме. Природа явления не исследовалась.

Целью настоящей работы было изучение особенностей транскрипции в изолированных ядрах и роли цитоплазмы в этом процессе. Для характеристики синтезированной ДНК-подобной РНК (Д-РНК) использовали гибридизационный анализ.

Объектами исследования являлись клетки печени крысы и асцитной гепатомы Зайделя. Ядра клеток выделялись по методу ⁽³⁾ с небольшой модификацией (использовался раствор 2,2 *M* сахарозы и 0,001 *M* $MgCl_2$).

Цитоплазма клеток печени была получена следующим образом. Печень голодных крыс помещали в раствор, содержащий 0,2 *M* трис, 0,05 *M* $MgCl_2$, 0,03 *M* β-меркаптоэтанола, рН 8,0, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера при соотношении ткани и указанного раствора 1 : 1. Гомогенат центрифугировали при 12000 *g* 15 мин. Надосадочную жидкость повторно центрифугировали при 105000 *g* в течение 1 часа и полученную свежеприготовленную надосадочную жидкость использовали в инкубационной смеси в качестве цитоплазмы.

Клетки гепатомы Зайделя получали из асцитной жидкости беспородных крыс на 5 сутки после перевивки опухоли (для перевивки крысе весом 100—120 г вводили внутривенно 0,5 мл асцитной жидкости). Клетки отмывали в 0,14 *M* NaCl в присутствии 0,01% гепарина и центрифугировали при 200 *g* 3 мин. Отмывку повторяли 3—5 раз.

Для получения цитоплазмы клеток Зайделя осадок отмывых клеток после центрифугирования взвешивали в том же растворе, что и при получении цитоплазмы печени, в соотношении 1 : 1 и разрушали клетки в гомогенизаторе Поттера. Дальнейшее выделение цитоплазмы проводили так же, как и в случае цитоплазмы печени. Все операции по выделению ядер и цитоплазмы проводились на холоду.

Инкубация ядер *in vitro* для определения синтеза РНК в них проводилась при 37° в течение 5 мин. Полная инкубационная смесь включала ядра

клеток печени или гепатомы (0,5–0,7 мг ядерной ДНК), цитоплазму этих клеток (7 мг белка), четыре нуклеозидтрифосфата (АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ) по 0,27 ммол., один из которых (АТФ или УТФ) был меченым по C^{14} (0,25 μ С), буферный раствор (0,2 М трис, 0,05 М $MgCl_2$, 0,03 М β -меркаптоэтанол, рН 8,0). Общий объем пробы 0,25 мл.

Из пробы изолировали ядра. Из них методом термического фракционирования⁽⁴⁾ извлекали ДНК-подобную РНК. Радиоактивность препаратов определяли на сцинтилляционном счетчике. В ряде опытов ДНК-подобную

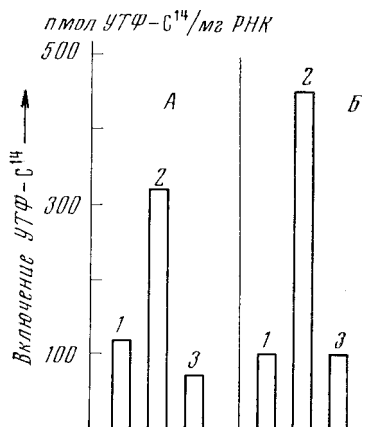


Рис. 1. Включение АТФ- C^{14} в ДНК-подобную РНК ядер клеток печени (А) и гепатомы Зайделя (Б) в различных условиях инкубации. Инкубация ядер в присутствии трис-буфера (1), цитоплазмы печени (2), цитоплазмы гепатомы (3)

РНК выделяли из полной инкубационной смеси, включающей ядра. ДНК-подобную РНК из печени и гепатомы получали методом термического фракционирования, а ДНК из печени — фенольным методом. Для выделения меченной по C^{14} РНК из печени и гепатомы крысам внутрибрюшинно вводили по 300–400 μ С оротовой кислоты вместе с 50 μ г актиномина Д (для подавления синтеза рибосомной РНК) за 4 часа до забоя животных.

Гибридизацию РНК с ДНК проводили на гелях ДНК, смитых у.-ф. облучением⁽⁵⁾ при соотношении ДНК/РНК = 50, в $2 \times SSC$ ($1 \times SSC$ это есть 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрата Na) при 65° в течение 36 час. В опытах по конкурентной гибридизации к ДНК добавляли кроме меченой РНК также различное количество немеченой РНК — конкурента. Общее количество РНК во всех пробах было одинаковым, что достигалось соответствующим добавлением РНК из *E. coli*.

Как видно из рис. 1, в изолированных ядрах клеток печени и гепатомы регистрируется заметный синтез РНК. Добавление цитоплазмы печени в инкубационную среду стимулирует синтез РНК как в ядрах печени, так и в ядрах гепатомы. При этом в ядрах гепатомы синтез РНК возрастает значительно, чем в ядрах печени. В отличие от действия цитоплазмы печени, цитоплазма опухолевых клеток не вызывала увеличения синтеза РНК в ядрах гепатомы и ингибировала его в ядрах печени. Этот эффект опухолевой цитоплазмы отличается от наблюдавшегося Томпсоном и Маккарти⁽²⁾. Специальная проверка, проведенная в присутствии печеночного ингибитора рибонуклеазы⁽⁶⁾ и полисом печени, показала, что отсутствие увеличения (или слабое увеличение) синтеза РНК при добавлении гепатомной цитоплазмы не связано с рибонуклеазной активностью последней.

Следующий вопрос, подлежащий рассмотрению, заключался в исследовании РНК, синтезированной в изолированных ядрах, инкубированных в различных условиях. Однако прежде всего нас интересовало сравнение РНК, синтезированных в ядрах печени и опухоли *in vivo* и *in vitro* соответственно. Оба эти вопроса были изучены с помощью метода конкурентной РНК — ДНК-гибридизации

В гибридизационных экспериментах исследовались меченные по C^{14} и немеченные РНК, выделенные из ядер печени и гепатомы (Y_n и Y_3), а также из предварительно изолированных ядер печени, проинкубированных *in vitro* в цитоплазме (Y_n^n) и из ядер клеток Зайделя, проинкубированных в гомологической цитоплазме (Y_3^3).

Результаты представлены в табл. 1. Можно видеть, что ДНК-подобная РНК, выделенная из Y_n^n , хорошо конкурирует с ДНК-подобной РНК из клеток печени и наоборот. Аналогичные результаты имеем с РНК из Y_3^3

и из клеток Зайделя. Специфичность гибридизации в условиях эксперимента (температура отжига 65°) специально контролировалась. Полученные данные указывают на то, что в изолированных ядрах клеток печени и гепатомы продолжается синтез тех же РНК, что и в ядрах соответствующих перазрушенных клеток. Разумеется, такое заключение справедливо лишь для тех РНК, которые выявляются в описанных выше условиях конкурентной гибридизации, т. е. в условиях, когда гибридизация наблюдается лишь на многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностях ДНК.

Таблица 1

Гибридизация ДНК-подобной РНК-СМ с ДНК в присутствии разных РНК-конкурентов

Источник РНК-СМ	Я _п →							Я _з →						Я _п ^п →	
Источник РНК-конкурента	—	Я _п	Я _з	Я _п ^п	Я _п ^з	Я _з ^п	Я _з ^з	—	Я _з	Я _п	Я _з ^з	Я _з ^п	Я _п ^з	Я _п ^п	Я _п
Гибридизация (%)	11,0	1,2	8,1	2,0	4,6	6,4	7,3	9,1	2,0	2,1	2,3	2,3	2,8	2,2	1,4

Интересно сопоставить спектр синтезируемых РНК в клетках печени и гепатомы, точнее, их конкурентные отношения в гибридизационных экспериментах. Как видно из табл. 1, ДНК из печени хорошо конкурирует с РНК из гепатомы Зайделя, снижая гибридизацию последней с 9,1 до 2,1%. Однако РНК гепатомы снижает гибридизацию РНК печени заметно слабее.

Таким образом, РНК гепатомы конкурирует лишь с частью РНК печени. Можно отсюда заключить, что в клетках гепатомы синтезируется более «бедный» набор молекул РНК по сравнению с печенью. Поскольку можно думать, что геномы в печени и гепатомы идентичны, вероятно, в клетках гепатомы считывается меньшая часть генома по сравнению с печеночными клетками, т. е. в опухолевых клетках имеет место ограничение транскрипции. При этом наблюдаемое ограничение происходит за счет повторяющихся, по-видимому, регуляторных участков генома. Мы предполагали, что такое ограничение транскрипции обусловлено влиянием цитоплазмы опухолевых клеток. Это предположение можно было проверить в системе *in vitro*, инкубируя изолированные ядра клеток печени в цитоплазме клеток гепатомы и исследуя конкурентную гибридизацию РНК, синтезированную в этих условиях. Результаты таких опытов приведены в табл. 1. Можно видеть, что РНК из ядер печени, инкубированных в цитоплазме гепатомы (Я_п^з) хуже конкурирует с меченой РНК печени (Я_п), чем РНК из Я_п^п. С другой стороны, РНК из Я_з^з хуже конкурирует с РНК из Я_п^п и из печени, чем РНК из Я_з^п. Все исследованные РНК хорошо конкурируют с РНК гепатомы.

Таким образом, спектр синтезируемых РНК в изолированных ядрах задается цитоплазмой, в которой эти ядра инкубируются. При этом цитоплазма клеток гепатомы, по-видимому, специфически ограничивает транскрипцию в ядрах печени и сужает спектр новообразованных РНК. Эти результаты, как и приведенные выше данные о синтезе РНК в ядрах *in vivo* и *in vitro*, соответствуют результатам, полученным *in vivo* на клетках печени и опухолях.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
15 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ H. Harris, Nucleus and Cytoplasma, Oxford, 1968. ² H. R. Thompson, B. J. McCarthy, Biochem. Biophys. Res. Commun., **30**, 2, 166 (1968). ³ A. O. Pogo, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **56**, 2, 550 (1966). ⁴ Г. П. Георгиев, В. И. Мантьева, Биохимия, **27**, 949 (1962). ⁵ В. Я. Арнон, Г. П. Георгиев, ДАН, **172**, 716 (1967). ⁶ Gribnau, J. G. Schoenmakers et al., Biochim et biophys. acta, **224**, 1, 55 (1970).