

А. Б. АЛЕКСЕЕВ, Т. Н. ЗУБАРЕВ, С. Л. СТОЛИНСКИЙ, А. А. ЯЗЫКОВ,
М. И. БЕТНА

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РНП-КОМПЛЕКСОВ АЦЕТАБУЛЯРИИ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 11 XII 1973)

Как было впервые показано (¹), в процессе морфогенеза одноклеточной водоросли *Acetabularia* из ядра в цитоплазму выделяются «морфогенетические вещества», способные в отсутствие ядра контролировать рост и развитие клетки, в частности формирование репродуцирующего органа — шапочки. Биохимические и ауторадиографические исследования косвенно показывают, что «морфогенетические вещества» ацетабулярии могут представлять собой ассоциированные с белком долгоживущие мРНК ядерного происхождения (²⁻⁴).

В данной работе проведено выделение из регенерирующих клеток *Acetabularia crenulata* специфических рибонуклеопротеидных комплексов, синтезируемых ядром при регенерации шапочки, и осуществлена инъекция этих комплексов в безъядерные нарастающие фрагменты ацетабулярии.

РНП-комплексы выделяли из ядерных фрагментов клеток, находившихся на стадии образования шапочки. Фрагменты получали наложением

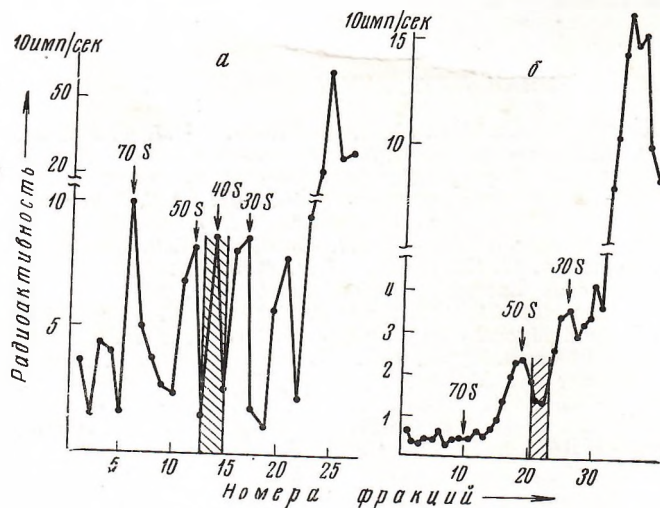


Рис. 1. Седиментационное распределение в сахарозном градиенте РНК-содержащего материала гомогената клеток ацетабулярии. Клетки инкубировали с H^3 -уридином ($19,4$ С/ммоль), центрифугирование вели в роторе Sw-25 при 25 000 об/мин в течение 10 час. Материал, соответствующий заштрихованным зонам градиента, далее центрифугировали в градиенте плотности $CsCl$. а — регенерирующие растения, б — нерегенерирующие растения

лигатуры на половине длины клетки с последующей ампутацией апикального конца. Фрагменты культивировали в течение 16 час. на свету в среде, содержащей 10–20 мкС/мл H^3 -уридина и 10–20 мкг/мл рифампицина. Отмытые клетки гомогенизировали в 1,5–2 мл 0,54 М глюкозы, содержащей 0,03 М NaCl; 0,01 М KCl; 0,03 М KNO_3 ; 0,03 М Na_2SO_4 ; 0,01 М $MgCl_2$; 0,03 М $NaHCO_3$; 0,006 М меркаптоэтанол; 0,01 М триэтаноламин-HCl, pH 7,5. Для ингибирования РНКаз использовали бентонит (2 мг/мл) и диизопропилфторфосфат ($2,5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) в комбинации с ионами Cu^{2+} ($4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). После гомогенизации взвесь центрифугировали 20 мин. при 20 000 g и отбирали надосадочную фракцию, 1,0 мл которой на-

слаивали на 10–30% линейный сахарозный градиент, содержащий 10% глицерина. Ультрацентрифугирование вели в бакет-роторе SW-25 в течение 10–12 час. при 25 000 об/мин. Анализ плавучей плотности рибонуклеопротеидов в градиенте CsCl вели по методу Спирина⁽⁵⁾.

При центрифугировании материала в сахарозном градиенте наряду с рибосомами и их субъединицами удается выявить пики радиоактивности в зонах 20–25 S, 40–45 S и 80–100 S (рис. 1а). Величина плавучей плотности для рибосом и их субъединиц составляла соответственно 1,58; 1,54 и 1,64 г/см³, а для 20–25 S, 40–45 S и 80–100 S РНП 1,38–1,41 г/см³ с

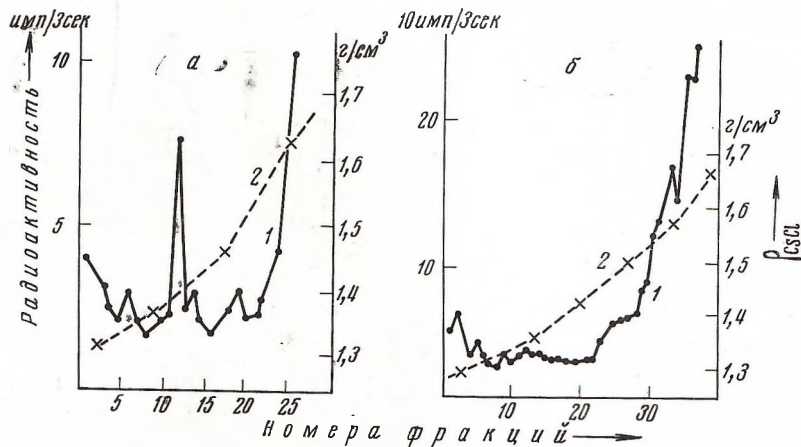


Рис. 2. Центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия фракций сахарозного градиента, указанных на рис. 1 (заштриховано). а, б — то же, что на рис. 1. 1 — радиоактивность, 2 — плавучая плотность

максимумом при $\rho = 1,40$ г/см³ (рис. 2а). Последний класс РНП выявляется только у регенерирующих растений, а у регенерирующих клеток или безъядерных фрагментов он не выявляется (рис. 1б, 2б). На основании этих результатов можно было предположить, что появление 20–25 S, 40–45 S и 80–100 S с $\rho = 1,4$ г/см³ РНП-комплексов связано с процессами морфогенеза ацетабулярии. Известно, что рибонуклеопротеиды с близкими значениями ρ и содержащие, как принято считать, мРНК, были обнаружены и у других объектов^(5,7). Предполагается, что это одна из форм транспорта и хранения мРНК в клетке.

Для получения безъядерных нарастающих фрагментов ацетабулярии использовали клетки длиной 2,5–3 см на стадии сформировавшейся шапочки. Фрагменты, длиной 1–1,5 см, полученные в результате ампутации ризоидов и верхней половины клетки, помещали в нормальные условия культивирования⁽⁸⁾. На 15–17 день культивирования, когда обычно проявляются четкие признаки морфогенеза, отбирали такие фрагменты, у которых отсутствовали апикальные заострения, зачатки мутулов и шапочек. В опытах было использовано около 1000 безъядерных нарастающих фрагментов, которые были разделены на четыре группы: в фрагменты первой группы через один из концов сифона вводили фракцию сахарозного градиента, содержащую рибосомы или прогретую в течение 1 часа при 100° фракцию 40–45 S РНП, в фрагменты второй группы — фракцию нативных 40–45 S РНП, в третью группу фрагментов трансплантировали ядра из нормальных клеток ацетабулярии, четвертая группа оставалась для контроля. В каждый фрагмент вводилось 0,15–0,35 мкл изучаемых препаратов (в зависимости от диаметра и длины фрагмента). После инъекции на оперированный конец фрагмента накладывалась плотная лигатура. Микрохирургические операции осуществляли при температуре 4° в искусственной среде.

В первой и контрольной группах фрагментов не было обнаружено никаких признаков роста или дифференцировки (рис. 3а), во второй группе инъекции 40 S РНП в ~10% случаев приводили к инициации четко выраженного морфогенеза на одном из концов фрагмента (появление структур, напоминающих зачатки мутовок, зачатки камер шапочек и т. п., рис. 3б-д). Случаи слабо выраженного роста апикального конца не учитывались. У фрагментов, которым были трансплантированы ядра, нормальные шапочки формировались в 40% случаев (рис. 3е).

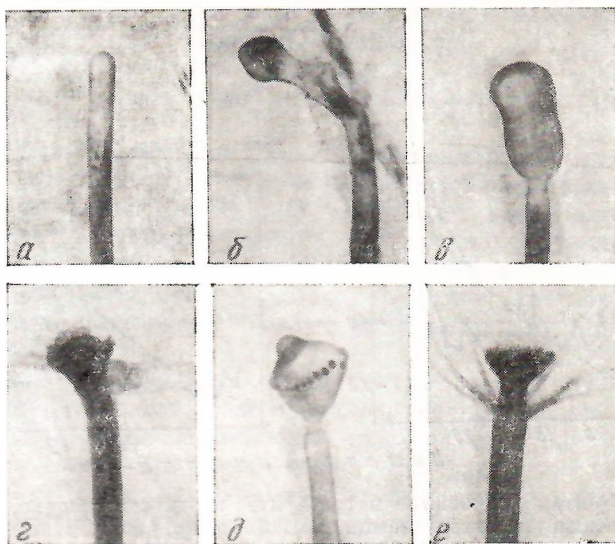


Рис. 3. Фрагменты *A. crenulata* на 15–17 день после операции. а — инъекция 40S РНП, прогретых при 100° в течение 1 часа; б, в, г, д — инъекция 40S РНП; е — трансплантация ядер

Как видно из рис. 3, при введении 40 S РНП формирующиеся структуры заметно отличаются от структур, наблюдаемых при регенерации ацетабулярии в присутствии ядра. Это, возможно, связано с тем, что при инъекции 40 S РНП в фрагменты вводилась лишь небольшая доля (1–2%) общего количества 40 S РНП, имеющихся в регенерирующей клетке ацетабулярии. Следует отметить также, что инъекция 40 S РНП в старые фрагменты (~70 дней) не приводила к инициации морфогенеза, а при пересадке ядер в такие фрагменты отмечено резкое снижение числа сформировавшихся зачатков шапочек.

Результаты проведенной работы показывают, что 40 S РНП-комплексы с $\rho=1,4 \text{ г/см}^3$, появляющиеся в регенерирующей клетке ацетабулярии, принимают участие в морфогенезе клетки, входя в состав ее «морфогенетических веществ». Из совокупности приведенных данных следует также, что для успешной индукции в нарастающих безъядерных фрагментах ацетабулярии нормального морфогенеза необходимо выполнение многих условий, которые требуют дальнейшего тщательного анализа.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Москва

Поступило
27 XI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Hämmerling, Arch. Entwicklungsmech., B. 131, 1 (1934). ² F. de Vitry, Bull. Soc. chim. biol., v. 47, 1325 (1965). ³ G. Werz, K. Zetsche, Planta, v. 59, 563 (1963).
- ⁴ J. Brachet, Curr. Top. Devel. Biol., v. 3, 1 (1968). ⁵ A. S. Spirin et al., J. Mol. Biol., v. 14, 611 (1965). ⁶ E. M. Lucanidin et al., Nature, v. 238, 193 (1972). ⁷ A. S. Spirin, M. Nemer, Science, v. 150, 214 (1964). ⁸ М. И. Бетина и др., Физиол. раст., т. 20, 5, 1072 (1973).