

УДК 576.312.6

ГЕНЕТИКА

И. М. ШАПИРО, Н. Г. СТЕПАНОВА, В. Л. ШПИЦБЕРГ,
С. И. ТОМАРЕВ

**АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИГРАЦИИ
БЕЛКОВ В ЯДРА КУРИНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В РАННИЕ СРОКИ
ИХ РЕАКТИВАЦИИ В ГЕТЕРОКАРИОНАХ С КЛЕТКАМИ
ЧЕЛОВЕКА**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 24 IV 1973)

Ядра куриных эритроцитов, полностью репрессированные в процессе дифференцировки, реактивируются в гетерокарионах с клетками млекопитающих ⁽¹⁾. На начальных этапах реактивации происходит постепенная деконденсация хроматина, что сопровождается повышением способности ДНК связывать акридиновый оранжевый (АО) и изменением чувствительности ДНП к термальной денатурации ⁽²⁾. Из цитоплазмы гетерокариона начинается миграция белков, в результате которой сухой вес и размеры ядер эритроцитов увеличиваются; оба показателя хорошо коррелируют ⁽³⁾. Природа белков, мигрирующих в ядро эритроцита, остается невыясненной.

Накопившиеся в литературе данные о роли белков в регуляции клеточной активности ^(4, 5) позволяют предполагать, что белковый состав ДНП ядер эритроцитов может измениться в процессе их реактивации за счет белков, мигрирующих из цитоплазмы гетерокариона. Именно с этим, весьма вероятно, и связана дерепрессия генома ядра эритроцита. Первым этапом наших исследований в этом направлении явились опыты по автордиографическому анализу мигрирующих белков.

Эксперименты были проведены на гетерокарионах опухолевых клеток человека HeLa — куриный эритроцит, полученных по методу ^(6, 7) с некоторыми модификациями. Источником эритроцитов служили куриные эмбрионы на 13—14 день инкубации. Эритроциты дважды отмывали от аллантоисной жидкости раствором Хенкса без глюкозы при 2000 об/мин, 5 мин., подсчитывали и ресуспендировали в том же растворе в нужной концентрации и оставляли при 4°. Клетки HeLa на лог-фазе роста снимали со стекла раствором трипсина, дважды промывали раствором Хенкса без глюкозы при 1000 об/мин, 5 мин., получали преимущественно одноклеточную суспензию, подсчитывали, ресуспендировали в растворе Хенкса без глюкозы и оставляли на холоду. Вирус Сендай инактивировали у.-ф. ⁽⁸⁾ и охлаждали. Для гибридизации брали 5×10^6 клеток HeLa на 1 мл, примерно $2,5 \times 10^8$ эритроцитов на 1 мл и обычно 4000 г.а.е./мл вируса Сендай, смешивали, адсорбировали вирус на клетках при 4° 20 мин., а затем инкубировали при 37° 30 мин, мягко встряхивая на качалке. Индекс гибридизации, равный отношению числа ядер эритроцитов в гетерокарионах к общему числу ядер HeLa (в гетерокарионах, гомоткарионах и одноклеточных клетках), варьировал в разных опытах, в среднем составляя 0,6—0,8. По окончании гибридизации клетки отмывали от вируса и высевали во флаконы со стеклами в смеси среды Игла и гидролизата лактальбумина (1:1) с 20% бычьей сыворотки. Для автордиографического анализа проводили инкубацию клеток, выросших на покровных стеклах, в течение 2 час. при 37° в растворе Хенкса, содержащем либо 10 мкС/мл Н³-триптофа-

на (у.а. 3,7 С/мМ, «Аммаршем», Англия), либо 10 мС/мл Н³-лизина (у.а. 305 мС/мМ, «Аммаршем», Англия), препараты промывали в среде 199, фиксировали в 70° этаноле, высушивали и покрывали жидкой эмульсией типа М. В части опытов перед покрытием эмульсией клетки обрабатывали 3% хлорной кислотой 20 мин. на холоду и промывали 1 час в проточной воде. Автографы экспонировали в холодильнике 20 дней, проявляли в Д-19, фиксировали в Ф-10 и окрашивали гематоксилином Майера.

Таблица 1

Средняя интенсивность флуоресценции (в усл. ед.) ядер эритроцитов в гетерокарионах с клетками HeLa

До гибри- дизации	Время культивирования после гибридизации			Примечания
	5 час.	24 час.	48 час.	
13,5	70,2	94,2	115,2	Собственные данные Данные (2)
0,23	—	1,59	2,01	

Прижизненное флуорохромирование клеток АО по методу (8) через 24 час. после гибридизации показало практически полное отсутствие нежизнеспособных гетерокарионов. На рис. 1а представлен гетерокарион с лизосомами, аккумулировавшими флуорохром (рис. 1, см. вклейку к стр. 733).

Чтобы выяснить, происходит ли реактивация ядер эритроцитов в наших условиях культивирования, в первой серии опытов были изучены морфологические изменения ядер эритроцитов в разные сроки после образования гетерокарионов и их способность связывать АО.

Измерение интенсивности флуоресценции комплекса АО — ДНП ядер эритроцитов проводили при $\lambda = 536$ мμ на препаратах, фиксированных в смеси этанол — ацетон (1:1) и обработанных АО по методу (9) с некоторыми модификациями (10); полученные величины выражали в условных единицах (тока ФЭУ). На каждую точку измерений брали 60 ядер эритроцитов.

Как и в аналогичных экспериментах других авторов (2), в наших опытах ядра эритроцитов постепенно увеличивались в размерах (рис. 1б, в), хроматин деконденсировался и на 4 день в ядрах появлялись ядрышки.

В течение первых 24 час. после гибридизации интенсивность флуоресценции эритроцитов в гетерокарионах в несколько раз превышала таковую у эритроцитов, не слившихся с клетками HeLa, на вторые сутки она продолжала увеличиваться (табл. 1). Сравнивая эти результаты с данными (2), представленными в табл. 1, можно видеть их хорошее совпадение. Так как величину флуоресценции выражали в условных единицах, для сравнения следует брать отношения интенсивностей флуоресценции в соответствующие сроки фиксации.

Таким образом, на основании этих данных можно считать, что в выбранных условиях гибридизации и культивирования клеток в гетерокарионах действительно происходит реактивация ядер эритроцитов.

Во второй группе опытов была исследована миграция белков из цитоплазмы гетерокариона в ядро эритроцита в течение первых суток после слияния клеток. На каждую точку наблюдений анализировали 240 ядер эритроцитов. Через 5 час. после гибридизации число зерен серебра над ядром эритроцита, меченного Н³-триптофаном (рис. 1г), мало отличалось от такового над сравнимой площадью цитоплазмы (фон). На свободных от клеток участках препарата было 2—3 зерна на площади, равной площади эритроцита. Выбранная для характеристики фона величина дает его максимальную оценку, поскольку на препаратах толщина слоя цитоплазмы над ядром эритроцита меньше, чем в других участках клетки. Учиты-

вая эти соображения, можно полагать, что в этот период миграция белков из цитоплазмы гетерокариона в ядро эритроцита во всяком случае, мала.

Как видно из рис. 1*б* и 2, в последующие сроки наблюдений — 17,5 и 24 час. — миграция белков возрастает; одновременно увеличивается и диаметр ядер эритроцитов (рис. 3).

Было обнаружено, что скорость миграции белков через 48 час. повышается по сравнению с таковой спустя 24 часа: среднее число зерен сереб-

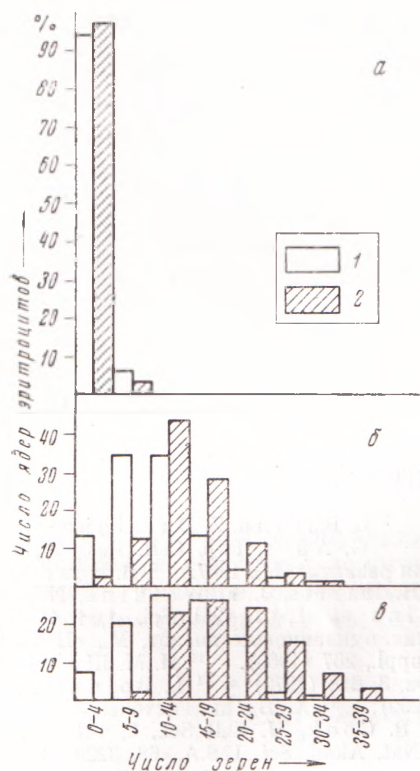


Рис. 2

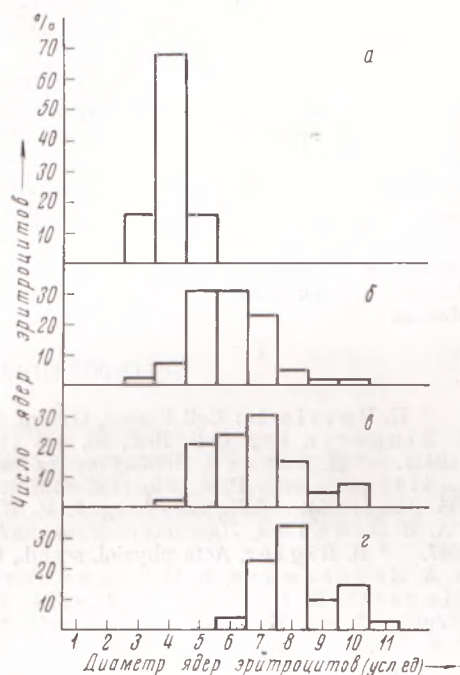


Рис. 3

Рис. 2. Распределение ядер эритроцитов, меченных H^3 -триптофаном (1) и H^3 -лизинном (2) в гетерокарионах в разные сроки после гибридизации. Показано среднее число зерен за вычетом фона над равной площадью цитоплазмы. а — через 5 час., б — через 17,5 часа, в — через 24 часа

Рис. 3. Распределение эритроцитов по размерам в гетерокарионах в разные сроки после гибридизации. а — через 5 час., б — через 17,5 часа, в — через 24 часа, г — через 48 час.

ра (за вычетом фона) над ядром эритроцита в гетерокарионах, меченных H^3 -триптофаном и H^3 -лизинном, возрастает в 2 и 2,9 раза соответственно. Размеры ядер при этом также увеличиваются (рис. 3). В указанный период количество ДНК в ядре эритроцита достигает 4с (¹¹), и поэтому можно предположить, что мигрирующие белки используются для построения новых молекул ДНК.

Во все приведенные выше сроки наблюдений были проведены параллельные опыты с мечением гетерокарионов H^3 -лизинном. Полученные результаты хорошо совпадают с представленными данными по включению H^3 -триптофана (рис. 2). Как известно, триптофан входит в состав негистоновых белков ядра (¹²). Поэтому результаты экспериментов с использованием H^3 -триптофана однозначно показывают, что уже в ранние сроки после гибридизации в ядро эритроцита мигрируют негистоновые белки

Поскольку H^3 -лизин включается как в гистоновые, так и негистоновые белки (¹²), то полученные данные по включению этого предшественника, во-первых, подкрепляют вывод о миграции негистоновых белков и, во-вторых, дают основание полагать, что в ядро эритроцита могут одновременно мигрировать и гистоны. Проникающие в ядро эритроцита в этот период белки являются практически полностью человеческими, так как во время гибридизации происходит лизис эритроцита и в цитоплазму клетки HeLa попадает лишь его ядро (¹), синтез же куриных белков в гетерокарионе начинается позже — лишь после образования ядрышка в ядре эритроцита (¹³, ¹⁴).

Поскольку анализ миграции был проведен на интерфазных ядрах, результаты опытов не позволяют судить о том, идет ли включение белков, попавших в ядро эритроцита, в ДНП, либо они остаются в ядерном соке до начала репликации ДНК.

Полученные в настоящее время предварительные данные по фракционированию белков эритроцитов, изолированных из гетерокарионов в разные сроки после слияния, подтверждают данные, представленные выше. Они позволяют считать, что в первые 24 часа в ядро куриного эритроцита мигрируют главным образом негистоновые белки. Белки, проникая в ядро эритроцита, включаются в состав хроматина.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
17 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Harris, In: Cell Fusion, Oxford, 1970. ² L. Bolund, Z. Darzinkewics, N. Ringertz, Exp. Cell. Res., 56, 406 (1969). ³ G. Auer, Exp. Cell. Res., 75, 231 (1972). ⁴ Д. Боннер, Молекулярная биология развития, М., 1967. ⁵ R. Baserga, G. Stein, Federat. Proc., 30, 1752 (1972). ⁶ H. Harris, J. F. Watkins, Nature, 205, 640 (1965). ⁷ H. Harris, J. F. Watkins et al., J. Cell. Sci., 1, 1 (1966). ⁸ А. В. Зеленин, Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот, М., «Наука», 1967. ⁹ R. Rigler, Acta physiol. scand., 67, Suppl., 267 (1966). ¹⁰ И. М. Шапиро, В. А. Колесников, В. М. Сенин, Онтогенез, 3, 618 (1972). ¹¹ L. Bolund, N. R. Ringertz, H. Harris, J. Cell Sci., 5, 71 (1969). ¹² X. Буш, Гистоны и другие ядерные белки, М., 1967. ¹³ H. Harris, P. R. Cook, J. Cell Sci., 5, 121 (1969). ¹⁴ N. Ringertz, S. Carlsson et al., Proc. Nat. Akad. Sci. U.S.A., 68, 3228 (1971).