

УДК 576.312.5

ГЕНЕТИКА

Н. В. СОНИНА, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, Н. Г. ШУШЕ

РНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК HeLa

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 31 IX 1973)

Исследования метаболизма РНК в течение клеточного цикла с помощью седиментационного анализа (¹, ²) и ДНК-РНК-гибридизации (³) не выявили различий в РНК, образующихся в разные периоды цикла. Однако предполагается, что такие различия существуют, так как в течение клеточного цикла многократно происходит синтез белков *de novo* и этому синтезу должно предшествовать появление соответствующих мРНК (⁴). Определенную информацию о механизмах регуляции прохождения клетками фаз цикла может дать система синтеза РНК *in vitro*, содержащая ядра, выделенные из синхронизированных клеток. В связи с этим нами была изучена РНК-полимеразная активность изолированных ядер клеток HeLa, находившихся в G₁, G₂ и S-периодах клеточного цикла.

В опытах использовали клетки HeLa S-3, растущие в монослое на среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и 50 ед/мл мономицина. Клетки синхронизировали с помощью двойного тимидинового блока (⁵). Синхронное прохождение клетками фаз цикла контролировали в параллельном опыте по изменению индекса меченых клеток и митотического индекса в течение суток после снятия второго тимидинового блока. Ядра из клеток в S-, G₂- и G₁-периодах цикла выделяли соответственно через 3, 7, 15 час. после второй отмычки от тимидина. Для выделения ядер клетки снимали трипсинизацией, центрифугировали, осадок ресуспендировали до концентрации 20 млн клеток/мл в гипотоническом буфере (0,01 M KH₂PO₄ - K₂HPO₄ pH 7,7, 0,01 M MgCl₂) и центрифугировали 10 мин. при 500g. Осадок ресуспендировали в этом же буфере до концентрации 30-50 млн клеток/мл, добавляли тритон X-100 до 0,07% и оставляли при 0° на 10 мин. Суспензию набухших клеток гомогенизировали в даунс-гомогенизаторе. Гомогенат центрифугировали при 600g 20 мин. в трехкратном объеме раствора (0,01 M трис-HCl, pH 8,0, 0,15 M сахараза, 0,001 M MgCl₂). Осадок ядер ресуспендировали в таком же растворе сахарозы до 70-100 млн ядер/мл и вносили в среду инкубации по 0,2 мл. Чистоту ядер контролировали под световым микроскопом. Среда инкубации содержала в конечном объеме 0,5 мл: трис-HCl 65 мкмоль, pH 8,0, АТФ, УТФ, ГТФ по 0,35 мкмоль, H³-ЦТФ 1 мкС (удельная активность 500 мС/ммоль), нерадиоактивный ЦТФ 0,075 мкмоль, 2-меркаптоэтанол 20 мкмоль, MgCl₂ 2 мкмоль или MnCl₂ 0,8 мкмоль. Для создания высокой ионной силы в среду добавляли (NH₄)₂SO₄ до 0,4 M. Инкубацию проводили при 37° 10 мин. со встряхиванием. Контрольные пробы инкубировали при 0° 1 мин. Реакцию останавливали добавлением холодной 10% ТХУ с 0,04 M Na₄P₂O₇, осадок ядер наносили на фильтры «Rufs», промывали холодной 5% ТХУ с шифосфатом, 70° этанолом, высушивали и определяли радиоактивность. Содержание ДНК в ядрах определяли по методу Бартон (⁶).

Определение содержания ДНК в препаратах ядер показало, что ядро клетки HeLa содержит в G₁-, G₂- и S-периодах соответственно 17·10⁻¹², 23,4·10⁻¹², 24·10⁻¹² ДНК. При синхронизации двойным воздействием избыточного тимидина степень синхронности клеток уменьшается от S-

периода к G_2 - и G_1 -периодам, поэтому определенное нами содержание ДНК в ядре G_1 -периода превышает действительное из-за примеси ядер G_2 - и S-периодов в препарате ядер G_1 -периода. Так как ядра клеток из разных точек цикла содержат разное количество ДНК, то активность проб стандартизовали не по количеству ДНК, а по количеству ядер в пробе.

Способность ядер клеток G_1 -, G_2 - и S-периодов клеточного цикла синтезировать РНК сравнивали в стандартной системе, содержащей Mg^{2+}

Таблица 1
Сравнение активности ядер клеток G_1 -, G_2 и S-периодов

Период цикла	Включенные H^3 -ЦМФ, имп/мин на 10^7 ядер	Относительная активность ядер, % от активности ядер G_1 -периода	Включенные H^3 -ЦМФ, имп/мин на 10^7 ядер в 10^{-5} ДНК
G_1	240	100	14,1
G_2	320	133	13,6
S	395	164	16,5

Примечание. Данные табл. 1 и табл. 2 являются средними данными трех независимых опытов.

ускорение синтеза РНК связывают с удвоением ДНК в клетках в S-периоде (², ⁷). Возможно, увеличение РНК-синтезирующей способности изолированных ядер клеток S-периода также связано с удвоением матриц ДНК в ядрах. Однако при пересчете радиоактивности, включенной в 10^7 ядер, на содержание ДНК в этом количестве ядер оказывается, что активность ДНК ядер клеток G_1 -периода на 17% ниже активности ДНК в S-периоде. Более высокую РНК-полимеразную активность ядер S-периода можно объяснить особым состоянием матрицы ДНК.

Известно, что высокие концентрации солей вызывают стимуляцию синтеза РНК изолированными ядрами в системе *in vitro* (⁸). Если исходить из того, что основная причина этой стимуляции — нарушение связи ДНК с белками хроматина (¹⁰), то можно ожидать, что активность ядер S-периода в меньшей степени изменится под действием высокой ионной силы. Результаты наших опытов показывают (табл. 2), что включение меченого предшественника ядрами клеток S-периода почти не стимулируется в системе, содержащей $Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M, в этих же условиях синтез в ядрах G_2 -периода увеличивается на 11%, а в ядрах G_1 — на 76%. Эти данные хорошо согласуются с выводом о том, что матричная активность ядер в РНК-полимеразной системе уменьшается от ядер S-периода к ядрам G_2 - и G_1 -периодов.

РНК-синтезирующая способность ядер складывается из нескольких РНК-полимеразных активностей, которые можно разделить на две составляющие: 1) РНК-полимеразная активность, связанная с ядрышком, требующая присутствия ионов Mg^{2+} , производящая РНК рибосомального типа и нечувствительная к α -аманитину; 2) РНК-полимеразная внеядрышковая активность, требующая присутствия ионов Mn^{2+} и синтезирующая ДНК-подобную РНК (⁸, ¹⁰). Действие высокой ионной силы стимулирует активность внеядрышковой РНК-полимеразы, а α -аманитин — ингибирует. Используя ответы этих двух РНК-полимеразных активностей на добавление $Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M и α -аманитина, можно оценить соотношение обоих типов активностей в ядрах клеток различных фаз цикла и таким образом получить указания на события, происходящие в целых клетках.

α -Аманитин в концентрации 1 мкг/мл, введенный в инкубационную среду, содержащую Mg^{2+} , примерно одинаково ингибирует синтез РНК ядрами всех периодов цикла (табл. 2). Так как α -аманитин действует

только на активность Mn-зависимой РНК-полимеразы, то, следовательно, в ядрах клеток всех периодов существует довольно высокий фоновый уровень РНК-полимеразы II. Ингибирующее действие α -аманитина в системе, содержащей $Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M, максимально выражено на ядрах клеток S-периода (ингибирование включения предшественника на

Таблица 2

Действие высокой ионной силы и α -аманитина на РНК-полимеразную активность ядер, имп/мин на 10^7 ядер

Период цикла	Условия инкубации ядер						
	Mg^{2+}	$Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M	стимуляция, % от включения в системе, с Mg^{2+}	$Mg^{2+} + \alpha$ -ама- нитин	подавление, % от включе- ния в системе с Mg^{2+}	$Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M + α -ама- нитин	подавление, % от включе- ния в системе с $Mn^{2+} + (NH_4)_2SO_4$ 0,4 M
G ₁	240	423	176	144	60,0	99	41
G ₂	320	362	113	191	59,6	98	30,6
S	395	404	102	244	62,0	35	8,9

91%), меньше — на ядрах клеток G₂- и G₁-периодов (соответственно ингибирование на 69,4 и на 59%). Можно предполагать, что повышенная чувствительность ядер клеток S-периода связана с увеличенным синтезом РНК АУ-типа в этих ядрах. Результаты опытов с α -аманитином подтверждают эффект высокой ионной силы и также говорят о более активном состоянии матрицы ДНК в ядрах клеток S-периода клеточного цикла.

И Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
31 X 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Robbins, M. D. Scharff, Cell Synchrony. Studies on Biosynthetic Regulation, N. Y.—London, 1966, p. 353. ² S. E. Pfeiffer, J. Cell Physiol., v. 71, 95 (1968). ³ G. N. Pagoulatos, J. E. Darnell, J. Cell Biol., v. 44, 476 (1970). ⁴ G. C. Mueller, Federat. Proc., v. 28, 1780 (1969). ⁵ D. Bootsma, L. Budke, O. Vos, Exp. Cell Res. v. 33, 301 (1964). ⁶ K. Burton, Biochem. J., v. 62, 315 (1956). ⁷ S. E. Pfeiffer, L. J. Tolmach, J. Cell Physiol., v. 71, 77 (1968). ⁸ C. C. Widnell, J. R. Tata, Biochim. et biophys. acta, v. 123, 478 (1966). ⁹ A. O. Pogo, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 56, 550 (1966). ¹⁰ R. G. Roeder, W. J. Rutter, Nature (London), v. 224, 234 (1967).