

А. А. КУЧЕРЯВЕНКО, Л. В. ВАНЬКО

О СВЯЗИ РНК, УСТОЙЧИВОЙ К РИБОНУКЛЕАЗЕ, С СИНТЕЗОМ ДНК И ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 31 VII 1974)

Иммунизация приводит к увеличению синтеза нуклеиновых кислот в клетках лимфоидных органов, что связывают с усилением пролиферации клеток и подготовкой к синтезу антител (⁴, ⁵, ⁹). Опубликовано сообщение (⁸), в котором приведены данные, свидетельствующие об увеличенном содержании в антителообразующих клетках РНК, резистентной к рибонуклеазе, и, по мнению авторов, находящейся в гибридном комплексе с ДНК. Вопрос о том, связан ли этот факт с продукцией антител или с пролиферацией антителообразующих клеток, авторами не решен. В нашей лаборатории было показано, что лимфоциты (периферической крови человека), бласттрансформирующиеся под влиянием фетогематоглютина (ФГА), синтезируют РНК, устойчивую к обработке рибонуклеазой в растворах высокой ионной силы (¹⁻³). Эту резистентную РНК можно обнаружить в интерфазных ядрах и в метафазных хромосомах.

Целью настоящей работы было выяснение вопроса, связано ли увеличение в антителообразующих клетках содержания РНК, устойчивой к рибонуклеазе, с их усиленной пролиферацией.

Последовались клетки селезенки мыши, синтезирующие антитела и специфически связывающие антиген, а также клетки, не участвующие в этих процессах, на 3 сутки иммунного ответа (период максимальной пролиферации антителообразующих клеток). Моделью для изучения связи резистентной РНК в клетках с процессом пролиферации и определения периода ее синтеза в отношении к фазам клеточного цикла служила пересаживаемая культура клеток HeLa.

Эксперименты проводили на мышцах-самцах линии СВА, весом 18—20 г, и штамме клеток HeLa, полученном из Института микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи.

Животных иммунизировали внутрибрюшинным введением 0,2 мл 25% взвеси эритроцитов барана. Через 3 суток мышей забивали и из селезенкиготавливали взвесь клеток. Клетки инкубировали в течение 1 часа с 10 мкС/мл тимидина-³H (удельная активность 4 С/ммоль) или 30 мин. с 20 мкС/мл уридина-³H (удельная активность 14 С/ммоль) при 37°. Отмытые от уридина клетки инкубировали еще в течение 1 часа. Среда, используемая для инкубации клеток с уридином-³H, содержала холодный тимидин (5 мкг/мл).

Для выявления антителообразующих клеток применяли модифицированный метод Эрне (⁶). Отмытые клетки помещали в смесь 0,75% раствора агара («Дифко») и эритроцитов барана при 45°. Смесь настилали на предметные стекла, которые помещали в чашки Петри. После образования геля в чашки добавляли раствор комплемента (1:10) и инкубировали в течение 1,5 час. при 37°. Затем стекла споласкивали физиологическим раствором, высушивали и фиксировали метиловым спиртом.

Розеткообразующие клетки выявляли по методу (¹⁰). К клеткам селезенки мыши добавляли эритроциты барана (1:8), центрифугировали при 200 об/мин в течение 15 мин. (0°) и оставляли на 30 мин. при 0°. Приго-

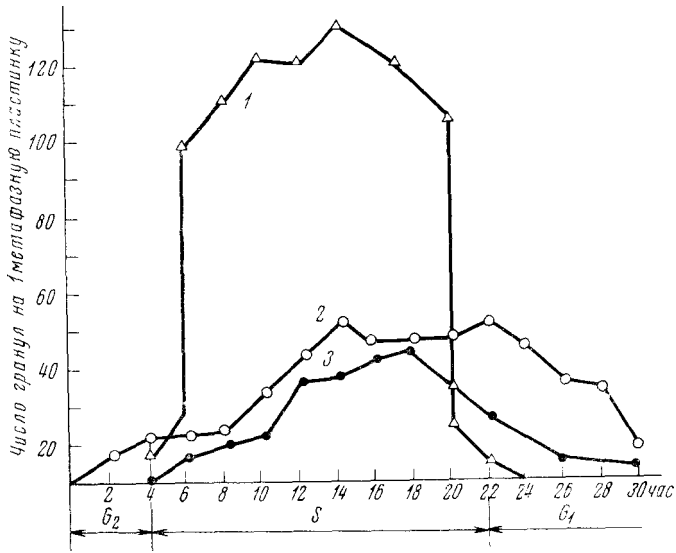


Рис. 1. Динамика синтеза ДНК и РНК, выявляемых в метафазных хромосомах клеток. Отсчет времени в обратном направлении — от митоза до импульсной метки. 1 — ДНК, 2 — суммарная РНК, 3 — РНК, устойчивая к обработке рибонуклеазой

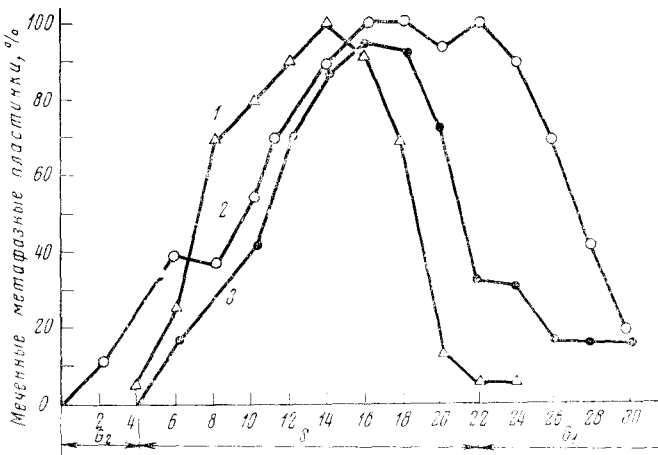


Рис. 2. Динамика мечення метафазных пластинок клеток HeLa тимидином-³H и уридином-³H. 1-3 — то же, что на рис. 1

тавливали мазки и фиксировали их метиловым спиртом. Клетки HeLa культивировали в среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки. После получения монослоя среду заменяли раствором Хенкса с сывороткой, содержащим тимидин-³H или уридин-³H. Клетки метили в течение 1 часа, затем монослой трижды отмывали от изотопов, добавляли свежую среду с сывороткой и культивировали при 37°. Через каждые 2 часа из этого монослоя избирательным методом извлекали клетки, находящиеся в митозе (¹²). Из полученных клеток приготавливали препараты метафазных пластинок.

Препараты лимфоидных клеток и метафазных пластинок HeLa обрабатывали 3 или 100 мкг/мл панкреатической рибонуклеазы в течение 20 мин. или 1 часа («Fluka и Buchs», Швейцария) в растворе высокой

Таблица 1

Доля меченых клеток, синтезирующих суммарную и устойчивую к обработке рибонуклеазой РНК, среди антителообразующих, розеткообразующих и других лимфоидных клеток селезенки мыши (% через 3 суток после иммунизации)

Обработка клеток	Лимфоидные клетки			Плакообразующие клетки			Розеткообразующие клетки		
	в популяции	бласты	дифференцируемые	в популяции	бласты	дифференцируемые	в популяции	бласты	дифференцируемые
Необработанные	97,0	98,0	96,1	82,2	98,1	57,0	98,0	99,1	95,0
Обработанные рибонуклеазой	8,5	60,0	3,5	36,5	52,5	1,2	21,5	43,5	4,5

ионной силы (0,6 M KCl). Обработанные и необработанные рибонуклеазой препараты отмывали холодной 5% ТХУ (5°) в течение 20 мин. Препараты покрывали эмульсией типа М (НИИХимфото) и экспонировали при 4° в течение 7 суток. На радиоавтографах подсчитывали число гранул серебра над метафазными пластинками HeLa и лимфоидными клетками, а также процент меченых пластинок HeLa и процент меченых клеток среди плакообразующих, розеткообразующих и остальных лимфоидных клеток.

Синтез суммарной РНК имел место в значительной части антителообразующих, розеткообразующих и остальных лимфоидных клеток. Обработка рибонуклеазой приводила к уменьшению количества клеток, содержащих метку (табл. 1), причем доля клеток, которые содержали РНК, устойчивую к обработке РНКазой, неодинакова для разных категорий клеток. Характерным было значительное содержание меченых клеток в группе бластов и очень небольшое среди зрелых плазматических клеток и лимфоцитов.

Наибольший процент бластов на 3 сутки иммунного ответа наблюдался среди плакообразующих клеток (50%). В группе розеткообразующих клеток было 30% бластов, а их содержание среди остальных клеток не превышало 4,5%. В группе бластов отмечен наибольший процент синтезирующих ДНК клеток, т. е. они являются наиболее активно пролиферирующими элементами среди лимфоидных клеток.

Тип клеток	Меченые клетки в популяции, %	Меченые бласты, %
Лимфоидные	4,5	52,6
Плакообразующие	58,0	57,1
Розеткообразующие	25,0	41,2

На рис. 1 суммированы результаты изучения синтеза суммарной РНК метафазных хромосом и РНК, резистентной к рибонуклеазе, в течение клеточного цикла. Можно видеть, что динамика синтеза РНК, устойчивой к обработке рибонуклеазой, отличается от динамики синтеза суммарной РНК. Синтез суммарной РНК происходит с разной интенсивностью в течение почти всего клеточного цикла, за исключением периода митоза. РНКазоустойчивая РНК синтезируется главным образом в конце G₁ и в начале S-периода, т. е. перед началом и во время синтеза ДНК, и прекращается в конце S-фазы. Синтез этой РНК не был обнаружен в G₂-периоде и во время митоза.

На рис. 2 представлены данные, характеризующие соотношение суммарной и РНКазо-резистентной РНК метафазных хромосом, а также ДНК, в разных фазах клеточного цикла. Можно видеть, что синтез РНК, устойчивой к рибонуклеазе, коррелирует во времени с синтезом ДНК, начинаясь несколько раньше, чем синтез ДНК.

Наибольшее количество РНК, резистентной к обработке рибонуклеазой, было найдено в лимфоидных клетках, имеющих морфологическую характеристику бластов. По-видимому, оно не зависело от специфической функции клеток, так как эта РНК была найдена как в клетках, синтезирующих антитела и несущих специфические рецепторы, так и в прочих лимфоидных клетках. Для всех клеток, содержащих резистентную РНК, общим свойством является высокая пролиферативная активность. По-видимому, ее более высокое содержание в антителообразующих клетках связано с процессом пролиферации.

Целесообразно сопоставить наши результаты с данными (7, 11). Эти авторы показали на *E. coli* необходимость синтеза РНК в качестве инициатора синтеза ДНК. Инкубация клеток в присутствии актиномицина *D* препятствовала началу репликации ДНК. Это позволило предположить, что в течение пререпликативного периода синтезируется особый тип РНК, необходимый для последующего синтеза ДНК.

Мы установили, что в клетках HeLa слабый синтез РНК, резистентной к рибонуклеазе, начинается в G_1 -периоде клеточного цикла, достигает максимума в конце G_1 и начале S-периодов и прекращается в конце S-периода. Таким образом, синтез этой РНК во времени несколько предшествует синтезу ДНК. Можно предположить необходимость синтеза именно этой РНК для начального этапа синтеза ДНК. Этот вопрос должен стать предметом дальнейших исследований.

Институт морфологии человека
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
31 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Б. Фукс, М. Т. А. Мартинес, ДАН, т. 200, № 6, 1466 (1971). ² Б. Б. Фукс, М. Т. А. Мартинес, А. А. Кучерявенко, Вестн. АМН СССР, т. 10, 35 (1971). ³ B. B. Fuchs, M. T. Martinez, Exp. Cell Res., v. 79, 2, 338 (1973). ⁴ B. M. Balfour, E. H. Cooper, E. L. Alpen, Immunol., v. 8, 230 (1965). ⁵ H. Cottier, N. Odartchenko et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 113, 612 (1964). ⁶ N. K. Jerne, A. A. Nordin, Science, v. 140, 405 (1963). ⁷ J. D. Karkas, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 8, 2288 (1972). ⁸ A. M. Koros, L. H. Kosier, M. J. Mowery, Nature, New Biol., v. 232, 34, 239 (1971). ⁹ B. Mach, P. Vassalli, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 54, 3, 975 (1965). ¹⁰ D. Osoba, J. Exp. Med., v. 132, 2, 368 (1970). ¹¹ A. Sugino, S. Hirose, H. Okazaki, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 7, 1863 (1972). ¹² T. Terasima, J. J. Tolmach, Exp. Cell Res., v. 30, 2, 344 (1963).