

Е. В. МЕТАКОВСКИЙ, В. Т. КАКПАКОВ, В. А. ГВОЗДЕВ

ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕРОНА НА КУЛЬТУРУ ПЕРЕСЕВАЕМЫХ КЛЕТОК DROSOPHILA MELANOGASTER: СТИМУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИПЕПТИДА И ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК

(Представлено академиком А. А. Баевым 30 XII 1974)

Пересеваемая культура клеток животных является удобной моделью для исследования механизмов гормональной регуляции действия генов у высших организмов. Особый интерес представляют в этом отношении пересеваемые культуры клеток *Drosophila melanogaster*. Известно, что экдистерон, важнейший гормон насекомых, проявляет свое действие не только *in vivo*, активно участвуя в регуляции метаморфоза у насекомых (¹), но и вызывает дифференцировку тканей и органов *in vitro* (^{1, 2}). В последнее время появились данные о влиянии экдистерона и на пересеваемые культуры эмбриональных клеток *D. melanogaster* (^{3, 4}). Экдистерон подавляет деление клеток в культуре (^{3, 4}) и ослабляет интенсивность синтеза суммарной РНК, хотя скорость синтеза клеточных белков остается практически неизменной по крайней мере на второй день после добавления гормона (⁴). Было также отмечено, что добавление экдистерона лишает клетки способности прикрепляться к стеклу (⁴). Можно предполагать, что экдистерон индуцирует синтез специфических белков, что, в частности, сопровождается изменением адгезивных свойств поверхности клеток. Задача настоящей работы состояла в исследовании изменений в спектре синтезируемых полипептидов и свойств поверхностных мембран культивируемых клеток *D. melanogaster* после добавления в среду экдистерона.

Работа проводилась на диплоидной линии клеток 67j 25D (⁵), культивируемой на коммерческой среде Шнейдер (фирма «GIBCO» США). Методы, использованные в работе, описаны ранее (^{4, 5}). После добавления гормона

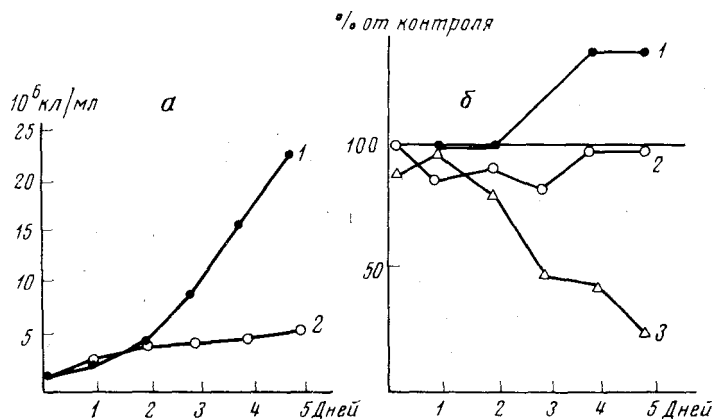


Рис. 1. Влияние экдистерона на пересеваемую культуру клеток дрозофилы. Гормон добавлен при посеве клеток. а — рост клеток: 1 — без гормона, 2 — гормон добавлен при посеве клеток; б: 1 — относительное содержание белка на 1 клетку по Лоури; 2 — включение ¹⁴С-аминокислот гидролизата белков хлореллы (уд. акт. 0,77 мкС/мг) или ¹⁴С-лизина (14—17 мкС/мл, уд. акт. 0,14 мкС/мг) в кислотонерастворимую фракцию клеток в течение 2—4 час.; 3 — включение ³Н-урацила (10—15 мкС/мл, уд. акт. 5,6 С/ммоль) в кислотонерастворимую фракцию клеток в течение 2—4 час. За 100% принято количество белка, интенсивность включения аминокислот и урацила в контроле (без добавления гормона) в соответствующие дни. Каждая точка представляет собой среднее 3—10 опытов

клетки существенно изменяются: они перестают делиться, увеличивается содержание белка в расчете на 1 клетку, в 2–5 раз падает скорость синтеза РНК, определяемая по включению ^3H -урацила в кислото-нерастворимую фракцию (рис. 1), клетки теряют способность прикрепляться к стеклу и свободно плавают в среде. Скорость синтеза белка в расчете на 1 клетку почти не меняется (рис. 1б), что не исключает, однако, предположения о влиянии эйдистерона на синтез отдельных белков клетки. Задачей следующего этапа работы являлся анализ спектра синтезируемых клетками полипептидов с целью выявить возможные изменения, индуцируемые гормоном.

Полипептиды экстрактов пересеваемых клеток фракционировали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом Na (ДДС-Na) по модифицированной методике (6). На 2–8 день роста клеток в присутствии эйдистерона (1 мкг на 1 мл) в среду добавляли ^{14}C -гидролизат аминокислот (3–5 мкС на 1 мл). Через 6 час. (импульсная метка) или 2–4 суток (длительная метка) клетки отмывали трижды солевым раствором и осадок клеток затем лизировали в буфере (6), содержащем 2% ДДС-Na и 2% меркаптоэтанола. Экстракт прогревали 5–7 мин. в кипящей водяной бане и наносили на гель по 100–200 мкг белка. Были использованы 9- и 10-процентные полиакриламидные гели длиной 12 см с целью получить максимальное разделение полипептидов. На рис. 2 представлены результаты одного из опытов после окраски гелей на белок. На 2–8 дни действия гормона на культуру клеток не было обнаружено появления новых полос или воспроизводимых различий в интенсивности окраски подавляющего большинства полос у обработанных эйдистероном клеток по сравнению с контролем. Исключение составляет лишь полоса № 8 с видимым молекулярным весом (м.в.) около 200 000 (рис. 2), которая в большинстве опытов усиливается в обработанных гормоном клетках. Вероятно, данный полипептид (или полипептиды) накапливается в клетках под действием гормона. В некоторых опытах наблюдалось также усиление интенсивности окраски полосы с м.в. около 50 000 (см. гели на рис. 3).

О накоплении полипептида с м.в. 200 000 свидетельствуют также опыты, в которых клетки выращивали 2–4 дня в присутствии ^{14}C -аминокислот на фоне эйдистерона, а затем изучали распределение метки по фракциям полипептидов. Для этого гель резали на диски по 1 мм и определяли долю радиоактивности на каждый диск по отношению к суммарной метке всего геля. Оказалось, что зона с м.в. около 200 000 в обработанных эйдистероном клетках метится в 1,5–2,0 раза сильнее, чем в контроле.

Активное повообразование высокомолекулярного полипептида по крайней мере в течение 2–8 дней после добавления к клеткам эйдистерона обнаружено в опытах с импульсной меткой. В серии таких опытов показано, что доля радиоактивности в этой зоне всегда увеличена в обработанных гормоном клетках на 20–40%, что говорит об усиленном синтезе данного полипептида (или полипептидов) в течение нескольких дней после добавления гормона. Воспроизводимых изменений в интенсивности синтеза других полипептидов не было отмечено, хотя в отдельных опытах можно наблю-

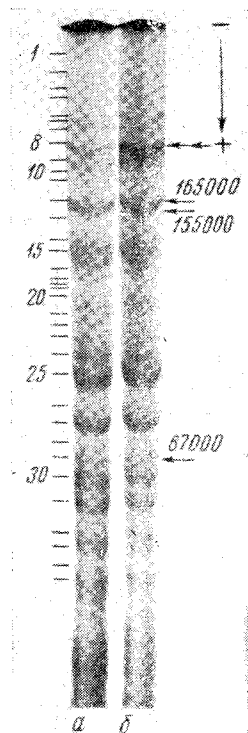


Рис. 2. Накопление полипептида с м.в. 200 000 (двойная стрелка) в клетках пересеваемой культуры клеток дрож-филлы после 5 дней действия эйдистерона. Окраска гелей кумасси ярко-синей R-250 после электрофореза экстрактов клеток. Представлена верхняя половина геля. а — без гормона, б — с гормоном. Однарные стрелки указывают расположение маркеров с соответствующим м.в.

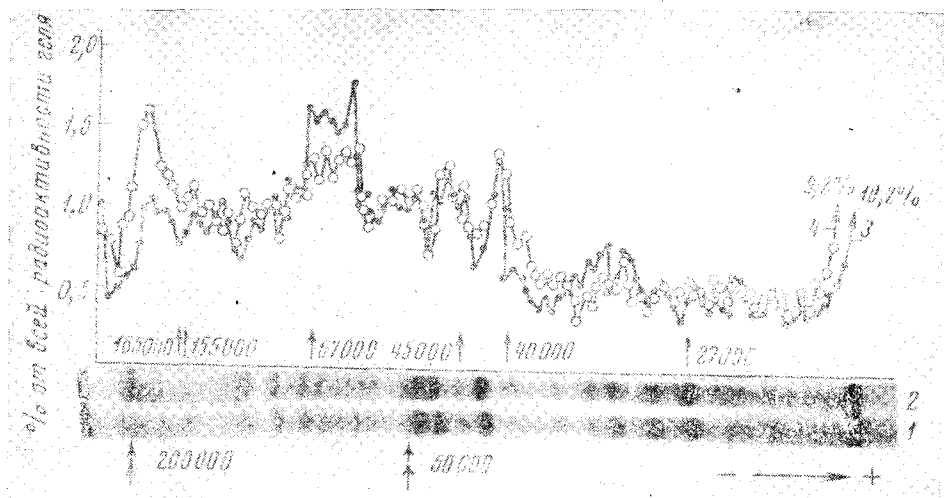


Рис. 3. Фракционирование полипептидов клеток пересеваемой культуры дрозофилы в полиакриламидном геле с ДДС-Na. Окраска гелей кумасси: 1 — без гормона, 2 — клетки после 8 дней культивирования в среде с экдистероном. Распределение радиоактивности по фракциям полипептидов: 3 — без гормона, 4 — с гормоном

дать небольшие различия и в других зонах (рис. 3). Усиление синтеза высокомолекулярного полипептида не является простым следствием остановки роста клеток, поскольку добавление в среду оксимочевины (15 мг/на 1 мл), которая подавляет деление клеток до такой же степени, как и экдистерон, не вызывает усиления синтеза этого полипептида. Природа гигантского полипептида остается неизвестной. Большинство полипептидов животных клеток с таким большим м.в. являются гликопротеинами (⁷⁻¹⁰), поэтому можно ожидать, что и полипептид с м.в. 200 000, обнаруженный в клетках дрозофилы, окажется гликопротеином.

Таким образом, клетки, обработанные экдистероном, продолжают синтезировать те же белки и примерно в тех же (за исключением 1—2 полипептидов) соотношениях, что и контрольные. Интенсивность включения в расчете на 1 клетку не меняется, но из-за увеличения содержания белка на 1 клетку удельная радиоактивность синтезируемых белков немного снижается, составляя около 70% от контроля. Значительно сильнее подавляется включение ³H-урацила в кислотонерастворимую фракцию. Остается неясным, отражает ли этот факт подавление синтеза определенных типов РНК или же под действием экдистерона нарушается использование ³H-урацила как предшественника.

Вызванные экдистероном изменения в синтезе белков и РНК сопровождаются снижением способности клеток прикрепляться к стеклу, что может свидетельствовать об изменении свойств их поверхностных мембран. Предполагаемые изменения поверхностных свойств клеток были нами изучены в опытах с агглютинацией клеток под действием конканавалина А (Кон А) — агента, присоединяющегося к углеводной части некоторых гликопротеинов поверхностной мембраны клеток (¹¹). Способность клеток к агглютинации оценивали (¹²), определяя процент клеток, находящихся в агрегатах по три и более, через 10 мин. после добавления Кон А. Уже на второй день действия гормона способность клеток к агглютинации падает с 60—70% до 5—10%, а при больших сроках действия экдистерон практически полностью подавляет способность клеток к агглютинации под действием Кон А (рис. 4). В среде без Кон А клетки практически не агглютинировали. Полученные результаты подкрепляют предположение об индуцируемых экдистероном изменениях в составе или структуре гликопротеинов поверхностной мембраны клеток дрозофилы.

В культурах клеток млекопитающих под действием гормонов удается наблюдать ряд явлений, которые можно рассматривать как клеточную дифференцировку: индукцию специфических белков, изменение формы клеток и т. д. (13). Параллельно с этим иногда наблюдается прекращение делений, увеличение размеров клеток, изменение их способности прикрепляться к стеклу (14, 15), т. е. эффекты, сходные с обнаруженными нами при действии экдистерона в культуре клеток дрозофилы. Известно, что в этих (14, 15), а также в других случаях (13) гормоны активируют аденилциклазу клеток, вызывая накопление циклической АМФ (ЦАМФ). Так же может влиять и экдистерон на клетки насекомых (16).

Увеличение содержания ЦАМФ

в клетках животных вызывает изменения, сходные с наблюдавшимися нами в культуре клеток дрозофилы под действием экдистерона. Так, накопление ЦАМФ подавляет деление клеток (14, 14, 17), в том числе и пересеваемых клеток *D. melanogaster* (18), влияет на агглютинацию под действием лектинов (17, 19) и усиливает синтез гликопротеина с м.в. 200 000 в культуре фибробластов хомяка (20).

Известно, что дифференцированные клетки, в противоположность эмбриональным и трансформированным вирусом, практически не агглютинируются некоторыми лектинами (11). Поэтому потеря пересеваемыми клетками дрозофилы, обработанными экдистероном, способности агглютинировать под действием Кон А может свидетельствовать о дифференцировке этих клеток. Наоборот, при вирусной трансформации животных клеток индуцируется их пролиферация и резко увеличивается способность к агглютинации лектинами, в том числе и Кон А (11). Накапливаются данные о том, что при трансформации в мембранах клеток уменьшается количество или избирательно исчезают некоторые крупные гликопротеины с м.в. 160 000 (7), 210 000 (8), 250 000 (9), 200 000 (20), перестает синтезироваться гликопротеин с м.в. 150 000 (10). Обнаруженный нами усиленный синтез гигантского полипептида (возможно, гликопротеина) с м.в. 200 000 можно противопоставить специфическому ослаблению синтеза таких же молекул при трансформации. Продолжая аналогию, можно предположить, что полипептид локализован в мембранах клеток дрозофилы. Увеличение количества полипептида под действием экдистерона может привести к изменению поверхностных свойств пересеваемых клеток, в результате чего они отделяются от стекла и теряют способность агглютинироваться Кон А.

Институт атомной энергии им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
20 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 А. А. Азрев, И. С. Левина, Ю. А. Титов, Экдизоны-стероидные гормоны насекомых, Минск, 1973. 2 Л. М. Мухоматова, В. Т. Какпакоев, Онтогенез, т. 6, 80 (1975). 3 А. М. Courgeon, Exp. Cell Res., v. 74, 327 (1972). 4 В. А. Гвоздев, В. Т. Какпакоев и др., Онтогенез, т. 5, 33 (1974). 5 В. Т. Какпакоев, В. А. Гвоздев и др., Генетика, т. 5, 67 (1969). 6 U. K. Laemmli, Nature, v. 227, 680 (1970). 7 R. O. Hynes, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 3170 (1973). 8 C. S. Greenberg, M. C. Glick, Biochemistry, v. 11, 3680 (1972). 9 N. M. Hogg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 489 (1974). 10 H. Sakiyama, B. W. Burge, Biochemistry, v. 11, 1366 (1972). 11 M. M. Burger, Federat. Proc., v. 32, 91 (1973). 12 R. D. Glynn, C. R. Thrash, D. D. Cunningham, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2676 (1973). 13 Н. А. Юдаев, Т. Н. Протасова, Усп. совр. биол., т. 72, в. 4, 118 (1971). 14 H. Masui, L. D. Garren, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 3206 (1971). 15 E. O'Keefe, P. Cautrecasas, ibid., v. 71, 2500 (1974). 16 S. W. Applebaum, L. I. Gilbert, Develop. Biol., v. 27, 165 (1972). 17 J. R. Sheppard, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 1316 (1971). 18 В. Т. Какпакоев, А. А. Шамшурин и др., Изв. АН Молд. ССР, сер. биол. и хим., т. 3, 67 (1974). 19 H. Sakiyama, P. W. Robbins, Arch. Biochem. and Biophys., v. 154, 407 (1973). 20 C. G. Gahmerg, S. I. Hakomori, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 3329 (1973).

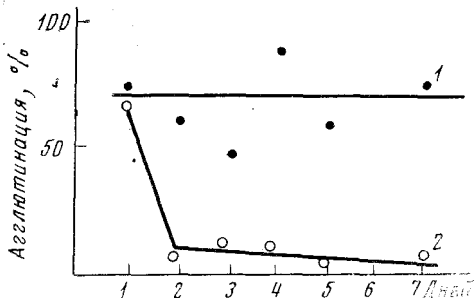


Рис. 4. Подавление экдистероном способности клеток дрозофилы агглютинировать под действием Кон А (100 мкг/мл). 1 — без гормона, 2 — с гормоном (1 мкг/мл), добавленным при посеве клеток