

А. С. ПОПОВ, Е. В. БРАГИНА, Н. Г. СТЕПАНОВА

**РЕАКТИВАЦИЯ ЯДЕР КУРИНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ
В ГЕТЕРОКАРИОНАХ С КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА,
ЗАВИСИМАЯ ОТ СИНТЕЗА БЕЛКА**

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

В закончивших дифференцировку куриных эритроцитах ядра полностью репрессированы, но в гетерокарионах с клетками млекопитающих происходит их реактивация: в несколько раз увеличиваются объем ядер (¹⁻⁵) и их сухая масса (⁴), хроматин деконденсируется (^{3, 4}) и физико-химические свойства его изменяются (⁴). Все эти изменения сопровождаются возобновлением синтеза РНК (¹⁻⁵), а затем и ДНК (^{1, 2, 4, 5}). В более поздние сроки (2—4 суток после слияния клеток) в эритроцитах появляются ядрышки и одновременно обнаруживается синтез de novo специфических куриных белков как структурных, так и растворимых белков-ферментов (^{6, 7}). Если эритроциты до слияния облучены у.-ф. в дозе, подавляющей матричную активность их ДНК, то синтез РНК, ДНК и белков не возобновляется, однако изменения хроматина, объема и массы ядер происходят по-прежнему (^{3, 4}). Этот факт позволил предположить, что реактивация — следствие поступления каких-то веществ, вероятно, белков, в ядра эритроцитов из цитоплазмы гетерокариона (^{3, 4}). Это предположение получило частичное подтверждение в ряде работ. В опытах с гетерокарионами клеток с репрессированными (или генетически дефектными) ядрами и клеток с нормальными активными ядрами показаны: 1) необходимость предварительного синтеза РНК в активном ядре для возобновления синтеза ДНК в репрессированном ядре (⁸), 2) миграция ферментов, обеспечивающих репарацию ДНК после у.-ф. облучения, из ядер, обладающих этими ферментами, в ядра, лишенные их (⁹⁻¹¹), 3) миграция антигенов нуклеоплазмы и ядрышка активных ядер в репрессированные ядра; антигены локализируются в этих ядрах так же, как и в своих собственных, их накопление коррелирует с ростом объема и сухой массой (^{12, 13}), 4) поступление в реактивирующиеся ядра белков, синтезированных до и после слияния клеток (¹⁴).

Цель настоящей работы — выяснить, действительно ли синтез новых белков в гетерокарионах необходим для реактивации ядер куриных эритроцитов.

Исследования проведены на гетерокарионах куриных эритроцитов и клеток HeLa. Гетерокарионы получали по методу Харриса (²) с некоторыми модификациями. Куриные эритроциты осаждали из аллантоиновой жидкости 12—14-дневного эмбриона, 3—4 раза промывали раствором Хенкса без глюкозы, сливая верхний слой осадка для удаления лейкоцитов, ресуспендировали в том же растворе и оставляли на льду. Клетки HeLa в лог-фазе роста снимали со стекла раствором трипсина или версена, 2—3 раза промывали раствором Хенкса без глюкозы, ресуспендировали в том же растворе и полученную суспензию, состоящую почти целиком из одиночных клеток, переносили на лед. Вирус Сендай инактивировали стандартной дозой у.-ф. и охлаждали. Для гибридизации в 2—3 мл раствора Хенкса без глюкозы смешивали $4-5 \cdot 10^6$ клеток HeLa, $3-5 \cdot 10^8$ эритроцитов

и 800–1000 гемагглютинирующих единиц вируса, инкубировали на льду 25–30 мин., затем в водяной бане при 37° 30–50 мин., добавляли питательную среду, отмывали от вируса, ресуспендировали в 50–70 мл той же среды и высевали во флаконы с пкровными стеклами. Питательная среда состояла из смеси сред Игла и 199 (1:1) и 15–20% бычьей сыворотки. Гетерокарионы составляли 50–65% от числа всех клеток на препаратах, 40–50% ядер в гетерокарионах были эритроцитарными.

Для подавления синтеза белка в гетерокарионах после слияния клеток к культурам добавляли пуромидин (25 мкг/мл) за 4–24 час. до фиксации.

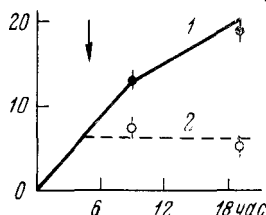


Рис. 1. Включение ^3H -уридина в ядра куриных эритроцитов в гетерокарионах с клетками HeLa. По оси ординат — среднее число зерен на 1 ядро. По оси абсцисс здесь и на рис. 3, 4 — время после слияния клеток; 1 — без пуромидина, 2 — с пуромидином. Стрелка — момент введения пуромидина. На каждую точку приходится в среднем 40 ядер

Оставшаяся часть культур служила контролем. Препараты фиксировали в различные сроки от 4 до 92 час. после слияния клеток либо в смеси этанол — уксусная кислота (3:1), либо формалин — спирт — уксусная кислота. О реактивации ядер куриных эритроцитов судили по трем параметрам: синтезу в них РНК, росту их объема и сухой массы. В первые сутки после слияния за 30 мин. до фиксации ко всем культурам добавляли ^3H -уридин (5 мкС/мл, удельная активность 21 С/ммол, Прага, Чехословакия). Для автордиографического исследования препараты покрывали жидкой эмульсией типа М. После окрашивания препаратов по Гимза подсчитывали число зерен над ядрами за вычетом фона. Карниометрию проводили с помощью винтового окуляр-микрометра (10 $\times$) с объективом 90 $\times$ $\times$ 1,30. Микроинтерферометрические определения сухой массы проводили на интерференционном микроскопе в водной среде (¹⁵). Ядра куриных эритроцитов отличали от ядер HeLa по размеру и структуре хроматина. Почти все они были правильной круглой формы, что позволяло для оценки объема ограничиться измерением только одного

диаметра. Так как степень реактивации эритроцитарных ядер зависит от соотношения двух видов ядер в гетерокарионах (¹³), измерения проводили преимущественно в тех гетерокарионах, в которых это соотношение было 1:1. Дополнительным контролем для определения исходных величин сухой массы и диаметра до реактивации служили эритроцитарные ядра, расположенные на тех же стеклах в отдалении от клеток.

Как видно из рис. 1 и 2, в наших опытах в первые часы после слияния куриных эритроцитов с клетками HeLa в эритроцитарных ядрах возобновлялся синтез РНК. Скорость синтеза увеличивалась в течение первых суток почти линейно. Следовательно, в условиях наших экспериментов действительно происходила реактивация ядер эритроцитов. Пуромидин немедленно останавливал увеличение скорости синтеза РНК, соответственно на рис. 1 подъем кривой сменяется появлением плато. Несмотря на дальнейшее достаточно длительное культивирование гетерокарионов, скорость синтеза РНК оставалась постоянной на уровне, достигнутом к моменту добавления пуромидина.

Аналогичные данные получены и в результате измерения сухой массы и диаметра куриных эритроцитов. В контроле (без пуромидина) сухая масса возрастала к концу вторых суток в 4 (рис. 3), а диаметр — почти в 3 раза (рис. 4), что соответствует увеличению объема ядер не менее чем в 10 раз (ядра в однослойных культурах сплюснены, поэтому зависимость между диаметром и объемом ближе к квадратической, чем к кубической). Следует отметить линейный характер увеличения сухой массы в первые сутки. Пуромидин полностью прекращал рост сухой массы и объема независимо от времени введения в любой период реактивации вплоть до четвертых суток после слияния клеток (рис. 3 и 4). В первые часы реактива-

ции, после добавления пурамицина сохраняется тенденция к некоторому увеличению сухой массы и объема, что объясняется, по-видимому, поступлением ранее синтезированных белков (¹⁴). В условиях блока белкового синтеза клетки в культуре не могут долго сохранять жизнеспособность.

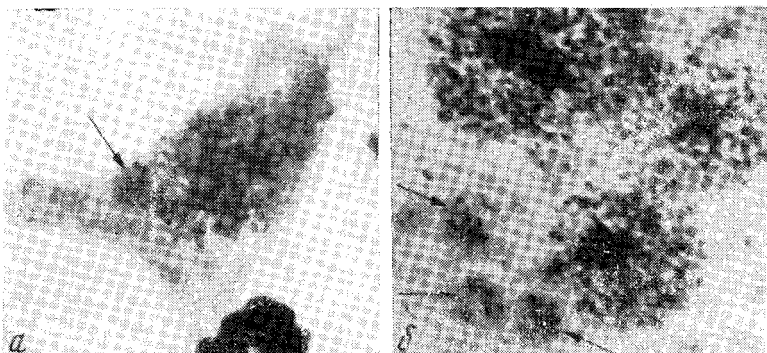


Рис. 2. Гетерокарионы куриных эритроцитов и клеток HeLa через 9 час. после слияния. Метка ³H-уридином. Эритроцитарные ядра обозначены стрелками. а — гетерокарион с одним ядром HeLa и одним эритроцитарным ядром, действие пурамицина в течение 4 час. перед фиксацией. Ядро HeLa сильно мечено, ядро эритроцита немечено и реактивировано очень слабо. Рядом на стекле вне клеток агглютинировавшие ядра эритроцитов, не вступивших в слияние с клетками. б — контроль без пурамицина. Центральная часть крупного гетерокариона, содержащего 3 сильно меченых ядра HeLa и 3 эритроцитарных ядра, которые мечены и заметно реактивированы

Максимальное время действия пурамицина в наших опытах близко к пределу выживаемости клеток. Вероятно, поэтому, а также вследствие вариабельности данных, кривые роста пересекают плато иногда не совсем точно в момент соответствующего введения пурамицина, хотя и достаточно близко к этой точке (рис. 3 и 4).

В качестве дополнительного контроля в некоторых экспериментах в культуру вводили избыток тимидина (2 мМ), который подавляет синтез ДНК. Тимидин добавляли сразу после слияния клеток или в различные сроки до 4 суток. В этих опытах вплоть до 8 суток после слияния клеток никакого различия в диаметре ядер по сравнению с контролем (без тимидина) не наблюдали.

Таким образом, полученные результаты показывают, что пурамицин останавливает реактивацию ядер куриных эритроцитов. Быстрое действие примененной дозы пурамицина и отсутствие эффекта от воздействия избытка тимидина дают основание заключить, что влияние пурамицина действительно определяется специфическим подавлением синтеза белка. Действие пурамицина обнару-

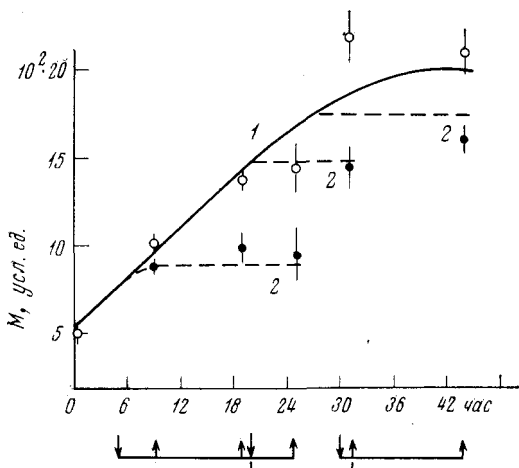


Рис. 3. Сухая масса (M) ядер куриных эритроцитов в гетерокарионах с клетками HeLa. Горизонтальные линии внизу соответствуют времени действия пурамицина: стрелки вниз — введение пурамицина, стрелки вверх — соответствующие фиксации. На каждую точку приходится в среднем 25 ядер

живается по всем изученным параметрам эритроцитарных ядер и во все периоды реактивации. Особенно показательны данные о немедленном прекращении увеличения скорости синтеза РНК, так как они являются прямым свидетельством остановки процесса активации новых генов в этих ядрах. Тем самым наши результаты подтверждают предположение⁽¹³⁾, что какие-то ядерноспецифические белки партнера (в данном случае HeLa) функционируют как сигналы, включающие гены в ядрах куриных эритроцитов и вызывающие реактивацию этих ядер в гетерокарионах с клетками млекопитающих. Так как пуромицин действовал без задержки, то, по-ви-

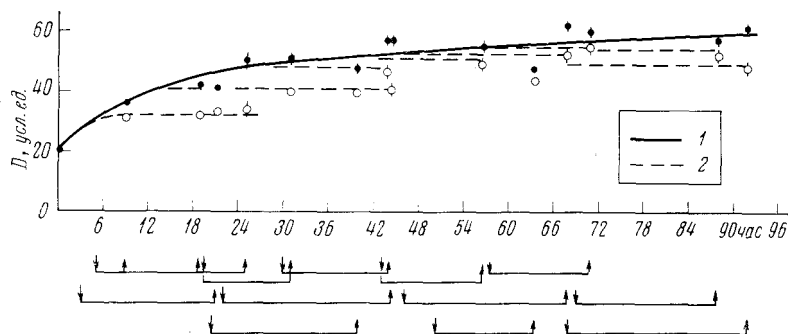


Рис. 4. Диаметр (D) ядер куриных эритроцитов в гетерокарионах с клетками HeLa. На каждую точку приходится в среднем 50 ядер. В тех случаях, когда стандартная ошибка не показана, она укладывается в размер точки на графике

димому, в клетках HeLa нет существенного пула этих белков-регуляторов (рис. 1). Результаты наших экспериментов свидетельствуют о невозможности реактивации ядер куриных эритроцитов без синтеза новых белков в гетерокарионах.

Авторы выражают благодарность проф. В. Я. Бродскому и А. В. Зеленину за ценные консультации, а также сотрудникам Лаборатории цитологии Института биологии развития АН СССР за помощь в овладении микроинтерферометрией.

Институт биологии развития
Академии наук СССР

Поступило
25 XII 1974

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Harris, Nature, v. 206, 583 (1965). ² H. Harris, J. F. Watkins et al., J. Cell Sci., v. 1, 1 (1966). ³ H. Harris, J. Cell Sci., v. 2, 23 (1967). ⁴ L. Bolund, Z. Darżynkiewicz, N. Ringertz, Exp. Cell Res., v. 56, 406 (1969). ⁵ S.-A. Carlsson, R. E. Savage N. Ringertz, Nature, v. 228, 869 (1970). ⁶ H. Harris, E. Sidebottom et al., J. Cell Sci., v. 4, 499 (1969). ⁷ P. Cook, J. Cell Sci., v. 7, 1 (1970). ⁸ S. Gordon, Z. Cohn, J. Exp. Med., v. 133, 321 (1971). ⁹ Z. Darżynkiewicz, Exp. Cell Res., v. 69, 477 (1971). ¹⁰ Z. Darżynkiewicz, E. Chelmiczka-Szorc, B. Arnason, Exp. Cell Res., v. 74, 602 (1972). ¹¹ F. Gianelli, P. Croll, S. Lewin, Exp. Cell Res., v. 78, 175 (1973). ¹² N. Ringertz S.-A. Carlsson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 3228 (1971). ¹³ S.-A. Carlsson N. Ringertz, R. E. Savage, Exp. Cell Res., v. 84, 255 (1974). ¹⁴ R. Appels, L. Bolund et al., Exp. Cell Res., v. 85, 182 (1974). ¹⁵ В. Я. Бродский, Трофика клетки, «Наука» 1966.