

В. Т. КАКПАКОВ, Л. Г. ПОЛУКАРОВА

ПОЛИПЛОИДИЗАЦИЯ И СЛИЯНИЕ КЛЕТОК НАСЕКОМЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОНКАНАВАЛИНА А

(Представлено академиком А. С. Спириным 4 IV 1975)

Известно, что конканавалин А (Кон А) — лектин белковой природы, обладает свойством агглютинировать различные клетки (¹⁻⁷). С помощью Кон А обнаруживаются специфические изменения свойств поверхностной мембраны клеток (^{3, 4, 7}).

Беккер (⁸) обнаружил, что Кон А способствует слиянию клеток дрозофилы в культуре. Ему удавалось получать двуядерные клетки, которые в результате синхронного митоза образовывали синкарионы. Это свойство Кон А особенно важно в связи с тем, что попытки получать гибриды соматических клеток дрозофилы с помощью различных вирусов, хорошо сливающихся клеток позвоночных, не дали успеха (⁹).

В настоящей работе изучали действие Кон А на пересееваемые культуры диплоидных эмбриональных клеток дрозофилы и комара с целью выяснения возможности слияния клеток разных видов насекомых и разных сублиний клеток дрозофилы в культуре.

В опытах по слиянию клеток с помощью Кон А использованы следующие пересееваемые диплоидные культуры эмбриональных клеток насекомых: линия 67j 25D — клетки дрозофилы (¹⁰), ее дочерние сублинии: Да — клетки, не способные расти на среде, содержащей 0,1 мкг/мл экдистерона — гормона линьки насекомых, клетки легко отделяются от стекла и перестают делиться; Да Т(Х; 3) — клетки со спонтанно возникшей транслокацией значительной части Х-хромосомы на аутосому 3-й пары. Эти клетки активно растут на среде, содержащей 1 мкг/мл гормона и хорошо прикрепляются к стеклу (¹¹); линия MOs20A — диплоидные клетки комара (¹²).

Во всех опытах клетки культивировали в среде С-39 (¹¹), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Serva», ФРГ), рН среды 7,2. Эта среда содержала в 10 раз меньше солей Ca^{2+} и Mg^{2+} , чем среда С-15 (¹³). Клетки засеивали в концентрации $0,1-3,2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл в объеме 3—5 мл среды на чашках Петри диаметром 30—60 мм с покровными стеклами и культивировали при 28° в атмосфере воздуха и 5% CO_2 . Кон А («Calbiochem», США), добавляли в суспензию клеток во время посева и удаляли, когда это было необходимо, сменой среды на свежую без Кон А. Для определения количества двуядерных клеток покровные стекла с клетками фиксировали смесью этанол — уксусная кислота (3:1) и красили азур-эозином. Количество тетраплоидных клеток определяли после действия колхицина (1 мкг/мл, 2 часа).

Кон А, добавленный в концентрации 50 мкг/мл, подавляет рост клеток вдвое. Высокие концентрации Кон А (100—200 мкг/мл) почти полностью ингибируют деление клеток.

При культивировании клеток в среде с Кон А (100 мкг/мл) в течение 8 час. число двуядерных клеток оставалось на уровне контроля (2—4%). Через 24 часа после добавления Кон А отмечается агрегирование клеток и обнаруживается 50—70% двуядерных и 1—3% трехъядерных клеток. Цитоплазма клеток вакуолизируется, границы между клетками становятся нечеткими, в некоторых случаях ядро выталкивается из клетки (рис. 1а).

Через 48 час. усиливается вакуолизация клеток, и они начинают гибнуть. Зависимость образования двуядерных клеток от концентрации Кон А через 24 часа после его добавления показана на рис. 2 а. Максимальное количество двуядерных клеток (примерно 80%) обнаруживается при концентрации Кон А, равной 200 мкг/мл. Однако клетки, обработанные такой высокой концентрацией Кон А, не способны к дальнейшему делению даже при удалении Кон А из среды. Образование двуядерных клеток под действием Кон А также определяется исходной концентрацией клеток при посеве (рис. 2б). Клетки сублинии Да давали в два раза меньше двуядерных клеток, чем клетки сублинии Да Т (Х; 3). Количество двуядерных клеток образовавшихся под действием Кон А, было значительно меньше в сублинии Да, чувствительной к экдистерону, чем в сублинии Да Т (Х; 3), относительно устойчивой к гормону. Определение способности клеток этих сублиний к агглютинации по ранее описанной методике (7) под действием Кон А показало, что она повышена у клеток сублинии Да Т (Х; 3) по сравнению с сублинией Да. Это может говорить о различии поверхностных свойств этих сублиний.

Через 24 часа после смены среды на свежую без Кон А отмечается резкое увеличение процента тетраплоидных клеток и уменьшение процента двуядерных клеток. Это свидетельствует о том, что в двуядерных клетках, образовавшихся в результате обработки Кон А, происходят синхронные митозы, в результате чего и образуются тетраплоидные клетки. Динамика образования тетраплоидных клеток в культуре, обработанной Кон А (100 мкг/мл), представлена на рис. 3 а, б. В последующие сроки культивирования клеток (96 час.) в среде без Кон А отмечалось снижение количества двуядерных клеток от 40 до 5—10% при соответствующем увеличении количества тетраплоидов. При повторной обработке Кон А можно получить до 20% активно делящихся октаплоидных клеток.

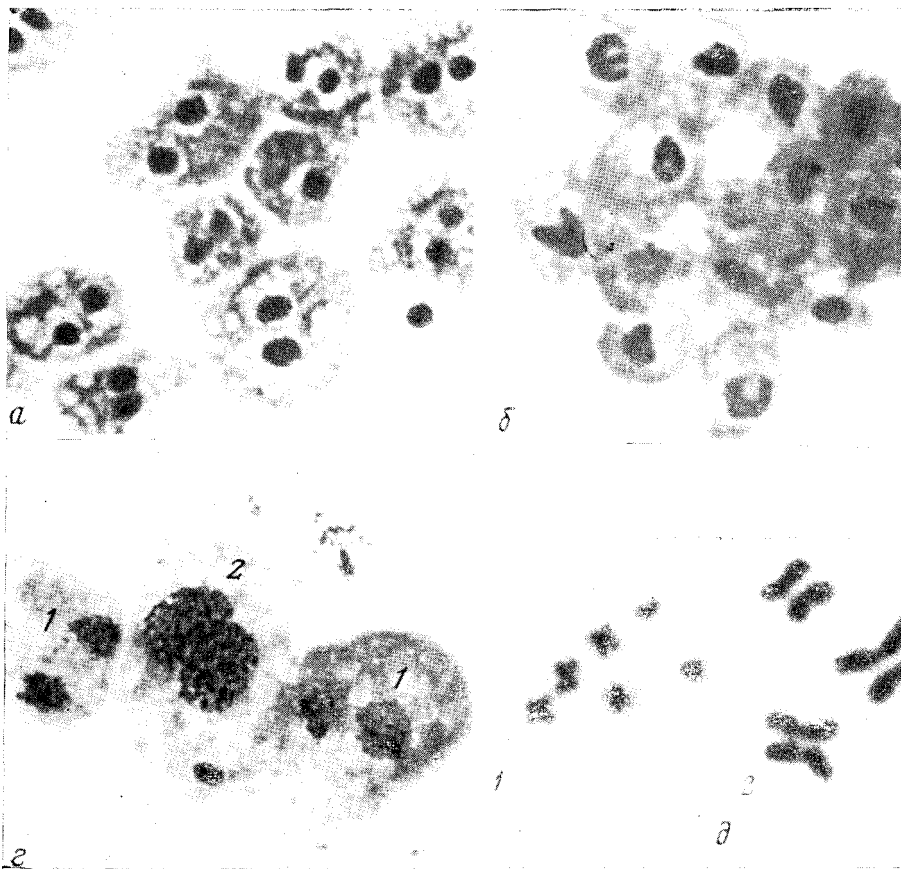
Таблица 1

Образование двуядерных клеток при совместном культивировании меченых и немеченых клеток дрозофилы двух сублиний в среде, содержащей 100 мкг/мл Кон А

Смешанные культуры	Типы двуядерных клеток, %		
	оба ядра меченые	оба ядра немеченые	метка в одном ядре
X *+X	43	47	10
X *+Y	47	53	0
Y *+X	34	65	1
Y *+Y	53	38	9

Примечание. Меченные ³H-тимидином культуры обозначены звездочкой. X — сублиния Да, чувствительная к экдистерону. Y — сублиния Да Т (Х; 3), устойчивая к экдистерону. В каждом варианте проанализировано 100 двуядерных клеток.

Оставался неясным вопрос, образуются ли двуядерные клетки под действием Кон А в результате слияния клеток, или же непосредственной причиной их образования является нарушение деления, сопровождающееся полиплоидизацией. Для ответа на этот вопрос смешивали две порции клеток одной сублинии, одну из которых 43 часа метили ³H-тимидином (5 мкС/мл, удельная активность 11,6 С/мМ, ЧССР). При этом 96% клеток содержало меченые ядра. Затем равное число меченых (отмытых от тимидина) и немеченых клеток смешивали, обрабатывали Кон А и определяли процент двуядерных клеток, содержащих меченые и немеченые ядра. Из табл. 1 видно, что при смешивании клеток одной сублинии 90% двуядерных клеток содержат либо оба ядра меченые, либо оба ядра немеченые и только 9—10% двуядерных клеток содержат меченое и немеченое ядра как в устойчивой Да Т (Х; 3), так и в чувствительной к экдистерону сублинии Да.



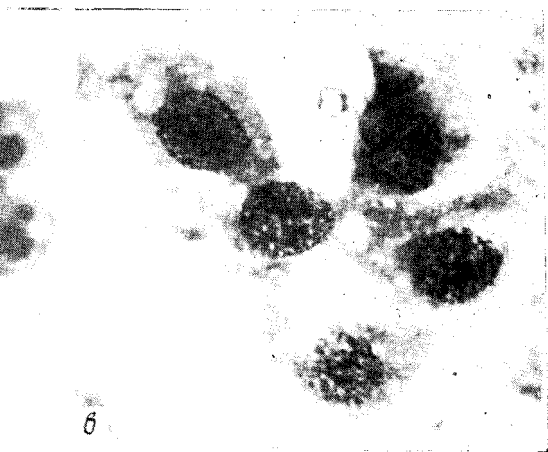


Рис. 1. Образование двуядерных клеток дрозофилы (*a*, *б*) и комара (*в*, *г*) под действием Кон А (100 мкг/мл) в течение 24 час. культивирования. *a* — с Кон А; *б*, *в* — без Кон А; *г* — дикарионы в смешанной культуре клеток дрозофилы (1) и комара (2); *д* — диплоидная метафазная клетка дрозофилы (1) и комара (2). 1250×

При совместном культивировании клеток двух разных сублиний число двуядерных клеток, содержащих только одно меченое ядро, не превышало 1%. Если бы меченые и немеченые клетки одной сублинии сливались друг с другом с одинаковой вероятностью, то половина (а не 10%) двуядерных клеток содержала бы меченое и немеченое ядра. Следовательно, не более 20% двуядерных клеток образуются путем слияния, а остальные 80% — результат полиплоидизации (поликариоцитоза), вызванной нарушением деления

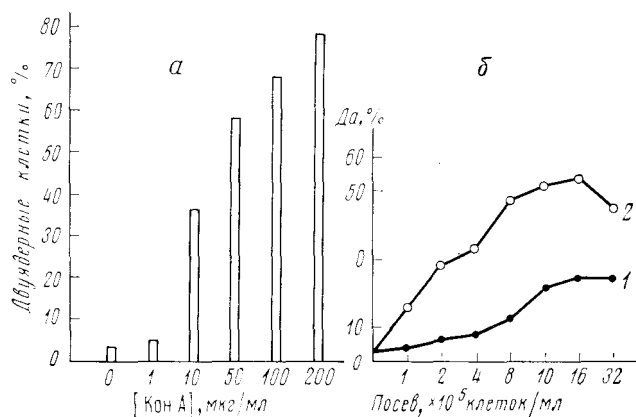


Рис. 2. Образование двуядерных клеток линии 67j25D в среде С-39, содержащей Кон А. а — зависимость образования двуядерных клеток от концентрации Кон А в среде в течение 24 час. культивирования; б — зависимость образования двуядерных клеток сублинии Да Т (1) и Да Т (Х; 3) (2) от исходной концентрации клеток при посеве в среде с Кон А (100 мкг/мл)

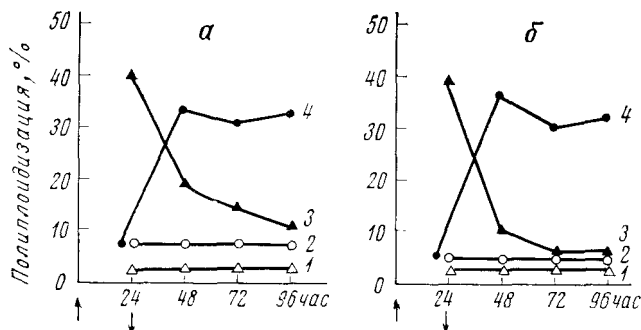


Рис. 3. Полиплоидизация клеток дрозофилы (а) и комара (б) под действием Кон А (100 мкг/мл). 1 — двуядерные клетки в контроле, 3 — в среде с Кон А; 2 — тетраплоиды в контроле, 4 — в среде с Кон А. Стрелки указывают время добавления (вверх) и удаления (вниз) Кон А из среды

клеток. Как уже отмечалось, эти сублинии хорошо отличаются кариотипически: сублиния Да Т (Х; 3) — диплоидная со спонтанно возникшей транслокацией значительной части Х-хромосомы на аутосому 3-й пары. В гибридной клетке можно было бы видеть эту маркерную хромосому. Однако при анализе кариотипа смешанных культур клеток двух сублиний среди тысячи проанализированных тетраплоидных метафаз не было обнаружено гибридных клеток, содержащих маркерные хромосомы родителей. Таким образом вопрос о возможности слияния клеток дрозофилы двух разных сублиний с помощью Кон А остается открытым.

В другой серии опытов была использована возможность слияния клеток комара и дрозофилы при их совместном культивировании. Эти клетки отли-

чаются друг от друга по размеру, морфологии и кариотипу (рис. 1б, в, д). Отмечено, что клетки комара, как и клетки дрозофилы, образовывали около 40% двуядерных клеток под действием Кон А (рис. 3б). В смешанной культуре можно видеть двуядерные клетки комара и дрозофилы (рис. 1г). Среди тысячи проанализированных двуядерных клеток не было обнаружено гетерокариопов, т. е. клеток, содержащих ядра двух видов. Смешивание культур клеток комара и дрозофилы в разных соотношениях (1:1, 1:2, 1:3, 1:4), встряхивание их и обработка 0,2% трипсином или 0,1% проназой не способствовали образованию гетерокариопов. Кроме того, как и в опытах по слиянию клеток дрозофилы двух разных сублиний, среди тысячи проанализированных тетраплоидных метафаз не были обнаружены гибридные клетки комара и дрозофилы. Таким образом, в данных условиях Кон А образует двуядерные клетки комара и не сливает клетки комара с клетками дрозофилы. Полученные результаты наводят на мысль о том, что в обработанных Кон А клетках дрозофилы и комара образование двуядерных клеток может быть вызвано не только слиянием двух клеток⁽⁸⁾. По-видимому, основная масса двуядерных клеток (80%) образуется за счет обратимого нарушения деления клетки.

Таким образом, вопрос о возможности слияния (гибридизации) клеток разных линий с помощью Кон А остается открытым. По-видимому, препятствием для слияния клеток двух разных сублиний дрозофилы под действием Кон А являются какие-то специфические различия их поверхностных свойств. Не исключена возможность, что при использовании селективных сред удастся выделить гибридные тетраплоидные клетки, которые, по-видимому, не имели селективного преимущества перед тетраплоидными клетками родительских сублиний.

Авторы считают приятным долгом выразить благодарность В. А. Гвоздеву и Л. З. Файзуллингу за ценные советы при обсуждении работы.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
20 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. B. Sumner, J. Bacteriol., v. 32, 227 (1936). ² G. M. Edelman, B. A. Cunningham et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 2580 (1971). ³ M. M. Burger, Federat. Proc. v. 32, 91 (1973). ⁴ В. И. Гельфанд, Бюлл. экпер. биол. и мед., 4, т. 82 (1973).
- ⁵ G. M. Edelman, C. F. Millette, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 2436 (1971). ⁶ B. F. Mackler, J. Nat. Cancer Inst., v. 49, 935 (1972). ⁷ Е. В. Метаковский, В. Т. Какпаков, В. А. Гвоздев, ДАН, т. 221, № 4 (1975). ⁸ J. L. Becker, C. R., v. 275, 2969 (1972).
- ⁹ G. H. Hannon, G. Echallier, Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 55, 227 (1971).
- ¹⁰ В. Т. Какпаков, В. А. Гвоздев и др., Генетика, т. 5, 67 (1969). ¹¹ В. А. Гвоздев, В. Т. Какпаков и др., Онтогенез, т. 5, 33 (1974). ¹² M. G. R. Varma, M. Pudney, J. Med. Entomol., v. 6, 432 (1969). ¹³ В. А. Гвоздев, В. Т. Какпаков, Генетика, т. 2, 129 (1968).