

К. И. ХАНСОН, Б. Д. ЖИВОТОВСКИЙ

**ГИБРИДИЗАЦИЯ ЯДЕРНОЙ РНК КЛЕТОК ТИМУСА КРЫСЫ  
С ПОВТОРЯЮЩИМИСЯ И УНИКАЛЬНЫМИ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ ДНК**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 22 IV 1975)

Исследованиями последних лет установлено, что различные классы РНК клеток эукариотических организмов транскрибируются как с уникальных, так и с повторяющихся последовательностей ДНК<sup>(1)</sup>. Данный вывод базируется на экспериментах по гибридизации ДНК с нефракционированной клеточной и ядерной РНК<sup>(2-4)</sup>, гигантской ДНК — подобной ядерной РНК<sup>(5, 6)</sup> и полисомной информационной РНК<sup>(7, 8)</sup>. На ряде объектов (эмбрионы морского ежа<sup>(8)</sup>, клетки слизистой плесени<sup>(9)</sup>, печень крыс после введения кортизона<sup>(10)</sup>) обнаружено также, что в процессе развития и дифференцировки клеток и тканей наблюдается перераспределение в составе фракций ядерных РНК, считываемых с уникальных и повторяющихся генов. Удобной моделью для изучения процессов дифференцировки клеток высших организмов являются культуры лимфоцитов, стимулированных *in vitro* антигенами<sup>(11)</sup>.

В ответ на стимул резко активируется синтез РНК в ядрах<sup>(11)</sup>, однако меняется ли при этом спектр новообразованных РНК, остается невыясненным.

В настоящей работе исследовали гибридизацию ядерной РНК из нормальных и стимулированных фитогемагглютинином (ФГА) лимфоцитов тимуса крысы с фракцией уникальной ДНК и с тотальной ДНК при условиях большого избытка последней.

**Методика.** Суспензию клеток готовили из гомогенатов тимуса белых крыс-самцов весом 100—110 г. Стандартная культура содержала  $1 \cdot 10^5$  тимоцитов в 1 мл среды (2 части среды 199 и 1 часть сыворотки крови телят). Условия инкубации (37°, 48 час.) и оптимальная концентрация ФГА-II («Reanal», Венгрия) выбраны на основании опытов по включению <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК<sup>(7)</sup>. Клетки собирали, промывали и ядра получали по методике<sup>(8)</sup>. Для получения ядерной РНК использовали метод Ширрера и Дарналла<sup>(9)</sup>. РНК экстрагировали горячим фенолом при 65°. Конечный препарат РНК обрабатывали ДНКазой («Whorthington», США), пропазой («Serva», ФРГ) и подвергали очистке в градиенте CsCl, как описано в работе<sup>(10)</sup>. Выделенная фракция РНК имеет ДНК-подобный нуклеотидный состав и представляет собой так называемую гетерогенную ядерную РНК. ДНК для гибридизации получали из асцитной гепатомы Зайделя<sup>(11)</sup>. Препараты фрагментировали ультразвуком на установке УЗДН-1 при 15 кГц и 0,2 а. По данным анализа в градиенте щелочной сахарозы размер фрагментов около 500 нуклеотидов. Кинетику реассоциации денатурированной ДНК определяли фракционированием с помощью гидроксипиперидина (ГА)<sup>(12)</sup>. Препаративное получение меченой <sup>3</sup>H-тимидином «уникальной» ДНК и гибридизацию ее с РНК проводили, как в работе<sup>(13)</sup>. Для гибридизации с избытком ДНК<sup>(4)</sup> РНК метили <sup>125</sup>I<sup>(14)</sup>. Радиоактивность проб, меченных <sup>3</sup>H, подсчитывали в толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Nuclear Chicago», Mark II США. <sup>125</sup>I измеряли на спектрометре «Gamma» (Венгрия).

Результаты исследования и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые, отражающие кинетику реассоциации тотальной ДНК гепатомы Зайделя и фракции уникальной ДНК. По оси ординат отложена доля ренатурированной ДНК в процентах, а по оси абсцисс — величина  $C_0t$ , представляющая собой произведение начальной концентрации

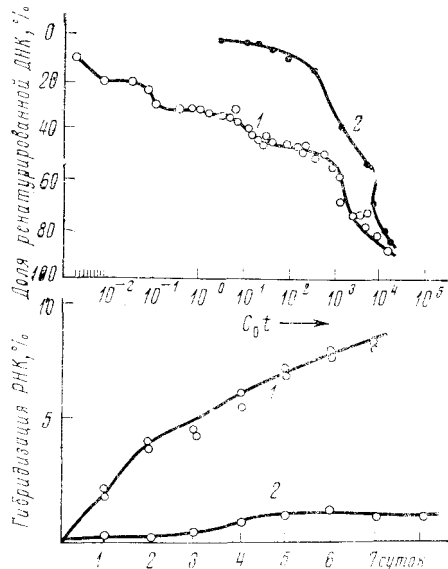


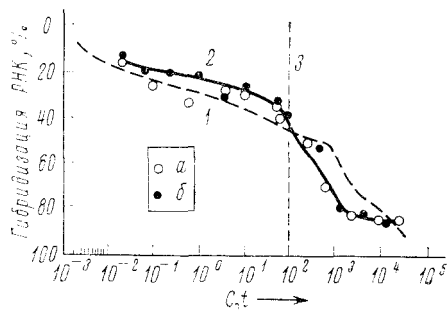
Рис. 1. Кинетика реассоциации ДНК гепатомы Зайделя. 1 — тотальная ядерная ДНК, 2 — «уникальная» ДНК

Рис. 2. Гибридизация фракции «уникальной» ДНК с ядерной РНК тимуса крысы. 1 — ДНК:РНК-гибриды, 2 — ДНК:ДНК-дуплексы

( $C_0$ ) фрагментов ДНК (моли нуклеотидов на литр) на время реассоциации ( $t$ ) в секундах. Ранее нами было установлено (<sup>11</sup>), что ход процесса ренатурации ДНК гепатомы Зайделя и тимуса крысы полностью совпадают (<sup>11</sup>). Это послужило основанием для использования высокометченой  $^3\text{H}$ -ДНК опухоли для гибридизации с РНК тимоцитов (<sup>11</sup>, <sup>15</sup>). Из результатов, представленных на рис. 1, видно, что уникальная  $^3\text{H}$ -ДНК практически не реассоциирует до величины  $C_0t$   $10^2$ . Следовательно, она не содержит многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Данную фракцию  $^3\text{H}$ -ДНК гибридизовали с тысячекратным избытком ядерной РНК тимуса (рис. 2). За время инкубации образовывалось 7,8% устойчивых к РНКазе ДНК:РНК-гибридов. Формирование ДНК:ДНК-дуплексов за тот же период не превышало 1,5%.

Для того чтобы выяснить, наблюдаются ли при ФГА-стимуляции тимоцитов перераспределения в составе фракций ядерных РНК, транскрибируемых с разных по частоте повторяемости участков генома, применили метод гибридизации РНК с большим избытком ДНК. Меченую  $^{125}\text{J}$ -РНК гибридизовали с ДНК в широком диапазоне значений  $C_0t$  от  $10^{-3}$  до  $10^4$ . Результаты исследования (рис. 3) представлены в виде графика Мак

Рис. 3. Кинетика гибридизации ядерной РНК тимуса с большим избытком ДНК. 1 — реассоциация ДНК; 2 — образование ДНК:РНК-гибридов с РНК из нормальных (а) и ФГА-стимулированных (б) тимоцитов; 3 —  $C_0t$   $10^2$ , условная граница между повторяющимися и уникальными последовательностями в геноме



Калла и Аронсона (<sup>4</sup>). Величина  $C_0t$   $10^2$  принята за условную границу между повторами и уникальной зоной генома. Данные по гибридизации РНК нормировали по отношению к реассоциации ДНК, величина которой при  $C_0t$   $10^4$  составляет 88% (рис. 1). Истинный уровень гибридизации РНК при этом был равен 65%. Видно (рис. 3), что до  $C_0t$   $10^{-2}$  не наблюдается существенного образования гибридов, т. е. транскрибируются преимущественно умеренные повторы и уникальные последовательности ДНК. Около 47% РНК вступает в реакцию до величины  $C_0t$   $10^2$ , оставшая часть РНК реагирует с редкоповторяющейся и уникальной ДНК. Это вполне согласуется с данными о распределении последовательностей в ДНК крысы (<sup>11</sup>, <sup>15</sup>).

Таким образом, встречаемость отдельных классов ядерной РНК в тимocyтах приблизительно пропорциональна представительству тех последовательностей ДНК, с которых они транскрибируются. Наиболее существенным является тот факт, что нами не обнаружено различий гибридизационных свойств РНК, полученных из нормальных и стимулированных тимocyтов. В то же время были получены данные, указывающие на то, что в процессе развития эмбрионов морского ежа отмечается увеличение транскрипции уникальной части генома (<sup>4</sup>). В работе (<sup>6</sup>), напротив, авторы наблюдали в печени крыс под влиянием кортизона депрессию преимущественно повторяющихся последовательностей ДНК. Причины обнаруженных особенностей разных клеточных систем требуют дальнейшего анализа.

Центральный научно-исследовательский  
рентгено-радиологический институт  
Ленинград

Поступило  
8 III 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. Melly, C. Whithfield et al., Nature New Biol., v. 231, 8 (1970). <sup>2</sup> D. S. Holmes, J. Bonner, Biochemistry, v. 13, 841 (1974). <sup>3</sup> K. I. Газарян, В. З. Тарангул и др., Мол. биол., т. 8, 372 (1974). <sup>4</sup> R. S. McCall, A. J. Aronson, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 56, 47 (1974). <sup>5</sup> R. S. Firtel, J. Mol. Biol., v. 66, 363 (1972). <sup>6</sup> V. I. Vorob'ev, I. M. Konstantinova, V. A. Kulitchcova, FEBS Lett., v. 47, 39 (1974). <sup>7</sup> Н. Р. Лунг, Стимуляция лимфоцитов, М., «Медицина», 1971. <sup>8</sup> S. Penman, J. Mol. Biol., v. 17, 117 (1966). <sup>9</sup> K. Scherrer, J. E. Darnell, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 7, 496 (1962). <sup>10</sup> W. Sauvebier, A. Brütigam, Biochim. et biophys. acta, v. 199, 36 (1970). <sup>11</sup> К. П. Хансон, Б. Д. Живоровский, Бюлл. эксп. биол. мед., т. 11, 92 (1974). <sup>12</sup> Н. С. Куприянова, М. Я. Тимофеева, Мол. биол., т. 7, 140 (1973). <sup>13</sup> L. Grouse, M. D. Chilton, B. J. McCarthy, Biochemistry, v. 11, 798 (1972). <sup>14</sup> S. L. Commerford, Biochemistry, v. 10, 1933 (1971). <sup>15</sup> K. Mori, M. Wintzerith, FEBS Lett., v. 35, 7 (1973).