

С. Н. АЛЕКСАНДРОВ и М. А. ПРЕСНОВ

**К ВОПРОСУ О ДЕЙСТВИИ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЖИВЫЕ
И УБИТЫЕ КЛЕТКИ В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРАХ**

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 8 V 1954)

При исследовании действия ионизирующего излучения на клетки в тканевых культурах обнаруживаются серьезные изменения ядерного вещества. Это выражается, в частности, в обособлении той его части, которая окрашивается фуксин-сернистой кислотой по Фейльгену. Процесс отмешивания приводит к тому, что все вещество, красящееся по Фейльгену, оказывается сконцентрированным в небольшом количестве капель или глыбок, располагающихся сначала внутри ядра; позднее, после исчезновения ядерной оболочки, эти капли лежат свободно вне ядер.

Для понимания тех процессов, которые разыгрываются в клетке в результате действия ионизирующего излучения, представлялось интересным выяснить природу этих капель: состоят ли они из полимерной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), освобождающейся при разрушении нуклеопротейда, или из нуклеопротейда, выделившегося из общего комплекса ядерных белков. Для решения этого вопроса удобно было воспользоваться энзимологической методикой с применением гистохимического теста. Действительно, если указанные капли состоят из полимерной ДНК, то они должны исчезнуть после действия специфического фермента, разрушающего ее полимерную структуру, — дезоксирибонуклеодеполимеразы. Если же эти капли представляют собой скопление нуклеопротейда, то только часть (около 40%) ДНК, входящей в его состав, подвергается действию фермента ⁽¹⁾. В этом случае мы должны ожидать лишь некоторое ослабление окраски капель по Фейльгену.

Такова была основная задача нашего исследования, когда мы к нему приступили. Однако, прежде чем подойти к ее решению, нам пришлось заняться рядом вопросов, непосредственно связанных с применением ферментативного метода в опытах на тканевых культурах.

Методика

Деполимераза ДНК была получена по Мак-Карти из поджелудочной железы крупного рогатого скота и обладала высокой специфической активностью, тогда как протеолитические свойства препарата проявлялись лишь при 0,1% концентрации его в растворе. В наших опытах были использованы две концентрации фермента: 40 и 80 γ сухого вещества на 1 мл раствора, в котором инкубировались тканевые культуры. Этими растворами являлись рингеровская жидкость, 0,2 М боратный или М/40 вероналовый буфер, содержащие 0,003 М MgSO₄ в качестве активатора и 0,01% желатины для стабилизации фермента. рН раствора равнялся 7,2. Сроки инкубации были 1, 3 и 20 час.; температура 37°. Кон-

трольные культуры находились в течение того же срока в тех же растворах, но без фермента. По окончании инкубации культуры фиксировались 10% нейтральным формалином и красились по Фейльгену. Опыты ставились на 3-суточных культурах спонтанной аденокарциномы молочной железы мыши и фибробластов сердца куриного эмбриона. Культивирование производилось в камерах Максимова. Средой служила смесь куриной плазмы и куриного эмбрионального экстракта (1:1).

Полученные результаты

Прежде всего оказалось, что даже длительное (15 час.) пребывание живых культур в рингеровской жидкости, содержащей 40 γ фермента в 1 мл, не приводит к изменению интенсивности окраски ядер по Фейльгену по сравнению с контролем. Иным оказался результат действия фермента при инкубации в буферной среде: в этом случае окраска ядер оказалась резко ослабленной. Интенсивность этого ферментативного эффекта находилась в прямой зависимости от концентрации фермента и срока инкубации. Отметив, что буферная среда вызывает резкое необратимое повреждение клеток, тогда как сам фермент в рингеровской жидкости, повидимому, вредным действием не обладает (данные ультрафиолетовой микроскопии и витальной окраски), мы предположили, что и эффективность энзима в буферных средах по сравнению с рингеровской жидкостью связана с их губительным действием на культуры. Предпринятые опыты подтвердили наше предположение. Культуры, предварительно убитые действием рингеровской жидкости, нагретой до 60—100°, либо раствором $n/50$ HCl, либо охлажденным спиртом, либо, наконец, самой буферной средой, обнаруживали ослабление окраски по Фейльгену после инкубации с деполимеразой на рингеровской жидкости. Одновременно выяснилось, что действие фермента выявляется значительно сильнее на культурах, убитых соляной кислотой или высокой температурой, чем на культурах, необратимо поврежденных действием буферной среды. Культуры, убитые спиртом, занимают в этом отношении промежуточное положение.

Таким образом, обнаружилось, что для действия фермента не безразлично, каким способом вызвана гибель клетки. Отсюда можно было предполагать, что для того, чтобы субстрат стал доступен действию фермента, важна не столько гибель клетки, сколько денатурационные изменения клеточных белков, вызванные действием повреждающего агента. Разные агенты вызывают качественно различные денатурационные изменения белков, нуклеопротеидов в частности. Это и объясняет различную доступность ДНК для действия специфического фермента при разных способах повреждения клетки. Исходя из этого, можно было предполагать, что агенты, убивающие клетку и не производящие денатурации клеточных белков, не способствуют последующему действию деполимеразы ДНК. Одним из агентов, убивающих клетку без денатурации ее белков, является формалин (2). И действительно, оказалось, что культуры, убитые 10% формалином и тщательно отмытые после этого, совершенно не подвержены действию фермента. Наряду с этим было испробовано действие фиксатора «суза», состоящего из смеси сильно денатурирующих агентов (трихлоруксусная кислота, сулема, уксусная кислота). Оказалось, что после такой фиксации тщательно отмытые культуры в высокой степени подвержены действию деполимеразы, и после 3 час. инкубации на препаратах удается обнаружить лишь единичные ядра, в которых еще отмечаются следы окрашивающегося вещества. Д. Н. Насоновым и В. Я. Александровым было обнаружено, что белки мышц, обработанные формалином, могут быть денатурированы последующим действием различных денатурирующих агентов. В соответствии с этим и мы попробовали подействовать на культуры, убитые формали-

ном, $n/50$ HCl в течение 30 мин. Оказалось, что в этом случае результатом не отличается от того, что наблюдалось при действии деполимеразы на культуры, убитые одной лишь кислотой. Следовательно, действительно, не гибель клеток, а денатурационное изменение клеточных белков, ядерных нуклеопротеидов в частности, необходимо для того, чтобы сделать ДНК доступной действию специфического фермента. Наряду с этим, как уже указывалось, выявляется специфика действия различных денатурирующих агентов.

После этих опытов мы приступили к изучению действия фермента на культуры, облученные радоном. Культуры подвергались действию одновременно как γ -, так и β -лучей радона. Облучение производилось в течение 3 час. и приводило к гибели культуры. Доза колебалась от 0,24 до 0,55 mcd (измерение по γ -активности). По окончании облучения культуры помещались в буферную среду с ферментом (опыт) или без него (контроль) и инкубировались в ней в течение 3 час. В дальнейшем культуры фиксировались и окрашивались по Фейльгену. В результате этого было установлено некоторое ослабление окраски ядер в опыте по сравнению с контролем. Однако оно не превышало ослабления, вызываемого действием фермента в буферной среде независимо от облучения. Таким образом, оказалось, что красящееся фуксин-сернистой кислотой ядерное вещество, обособляющееся при действии лучистой энергии, не подвергается действию деполимеразы ДНК. Следовательно, оно не представляет собой полимерной ДНК, а, повидимому, является нуклеопротеидом. Однако, в отличие от нуклеогистона, с которым работала В. Л. Немчинская, наш нуклеопротеид на основании гистохимических данных совершенно не подвержен действию фермента. Это различие может быть объяснено тем, что в нашем случае был нуклеопротеид, в котором связь между ДНК и белком прочнее, чем в нуклеогистоне. Таким нуклеопротеидом является «прочно связанный» нуклеопротеид (^{3, 4}). Непрочно связанный нуклеопротеид, возможно, расщепляется на более ранних стадиях лучевого воздействия, нуклеиновая кислота его подвергается действию деполимеразы и вымывается из клетки. Это явление наблюдалось при действии других агентов (⁵). Если мы, действительно, имели дело с прочно связанным нуклеопротеидом, то можно было ожидать, что в ходе аутолиза этот нуклеопротеид распадется на белок и ДНК, которая в этом случае должна подвергаться действию деполимеразы. Опыт подтвердил наше предположение. Убитые действием ионизирующего излучения культуры выдерживались в термостате 19 час. (в закрытых камерах Максимова) и затем помещались в буферную среду с ферментом (опыт) или без него (контроль). Оказалось, что в этих условиях облученные и подвергшиеся действию фермента культуры полностью утрачивают вещество, красящееся фуксин-сернистой кислотой. В контроле же наблюдается интенсивная окраска резко измененных ядер и многочисленных глыбок ядерного вещества.

В ы в о д ы

1. Деполимераза ДНК в условиях наших опытов оказывала свое специфическое действие на полимерную ДНК ядерных нуклеопротеидов только в случае их денатурации.

2. Было обнаружено, что для последующего действия фермента не безразлично, каким способом вызвана денатурация клеточных белков. В этом авторы видят одно из проявлений специфики действия различных агентов и своеобразия вызванных ими денатурационных изменений.

3. В отличие от ряда исследованных денатурирующих агентов (тепловое воздействие, соляная кислота, буферная среда, фиксатор «суза», этиловый спирт), ионизирующее излучение радона, вызывая денатура-

цию клеточных белков и, в частности, ядерного нуклеопротеида, не нарушает в последнем прочную связь между белком и ДНК.

4. Нарушение этой связи происходит лишь в ходе аутолиза под влиянием протеолитических ферментов.

Центральный рентгенологический,
радиологический и раковый
институт

Поступило
30 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Немчинская, Биохимия, 15, в. 6, 478 (1950). ² Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, Усп. совр. биол., 17, в. 1, 1 (1944). ³ А. Н. Белозерский, Л. А. Черномордикова, Биохимия, 5, в. 2, 133 (1940). ⁴ С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов, О. Н. Сеткина, Биохимия, 13, в. 4, 337 (1948). ⁵ С. Н. Александров, С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов, ДАН, 83, № 5, 725 (1952).