



УДК 576.312.6

СИНТЕЗ ДНК В ГИБРИДАХ МАКРОФАГОВ И РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОК С ОГРАНИЧЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К ПРОЛИФЕРАЦИИ

Е. Е. Егоров, Р. Р. Гуменюк, И. А. Прудовский, А. В. Зеленин

Введение. Причины и механизмы прекращения пролиферации клеток в процессе их конечной (терминальной) дифференцировки принадлежат к числу наименее изученных биологических проблем. Одним из подходов к исследованию этих проблем является слияние *in vitro* неделящихся дифференцированных клеток с активно пролиферирующими клетками культур. Харрис [1] показал, что в гетерокарионах, образованных опухолевыми (*HeLa*) и дифференцированными неделящимися (куриные эритроциты, лимфоциты, макрофаги) клетками, происходит реактивация синтеза ДНК в ядрах последних. Таким образом, была продемонстрирована обратимость прекращения синтеза ДНК, имеющего место при терминальной дифференцировке клеток (подробнее см. [2]). Нами было проведено слияние макрофагов из невоспаленной перитонеальной полости мыши с различными пролиферирующими клетками [3—5]. При этом выяснилось, что реактивация синтеза ДНК в гетерокарионах происходит только в случае использования в качестве партнеров макрофагов пролиферативно бессмертных клеток (культуры 3Т3, С3Н 10Т 1/2, SV3Т3). При использовании же для слияния клеток с ограниченной способностью к пролиферации (эмбриональные фибробласты мыши) реактивации синтеза ДНК в ядрах макрофагов в гетерокарионах не происходило. Было высказано предположение [6], что только иммортализованные клетки способны вызывать реактивацию синтеза ДНК в гетерокарионах. Это предположение нуждалось в проверке в опытах с другими клетками с ограниченной способностью к пролиферации, что и явилось главной целью данной работы.

В литературе имеются сведения о том, что на модели гетерокарионов удается обнаружить не только позитивное, но и негативное влияние на синтез ДНК в ядрах. При слиянии с клетками, находящимися в истощенном вызванном состоянии покоя [7—9] или с прекратившими пролиферацию диплоидными фибробластами поздних пассажей [7], вступление ядер пролиферирующих клеток в фазу синтеза ДНК угнетается. Можно было предположить, что и терминально дифференцированные клетки способны угнетать синтез ДНК в гетерокарионах. Однако в опытах по слиянию макрофагов с клетками 3Т3, С3Н 10Т 1/2 и с эмбриональными фибробластами мыши подавления репликации в активных ядрах не удалось обнаружить [4, 5]. Второй задачей настоящей работы являлась проверка способности макрофагов подавлять репликацию в новых типах клеток, включая их пролиферирующих предшественников — это клетки, относящиеся к тому же дифференцировочному ряду, что и макрофаги.

Материалы и методы. Культуральная среда. Во всех случаях, кроме особо указанных, использовали среду следующего состава: 60 % среды Игла с глутамином, 30 % гидролизата лактальбумина на растворе Хэнкса, 10 % сыворотки эмбрионов коров, по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина.

Культура фибробластов. Фибробласты крысы получали по методу [10] из 18—19-дневных эмбрионов. Для слияния с макрофагами использовали фибробласты на 3-м и 4-м пассажах. Продолжительность культивирования фибробластов не превышала 7—10 пассажей. Фибробласты эмбрионов человека были любезно предоставлены В. И. Кухаренко (Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва). Для слияния с макрофагами использовали фибробласты на 23—25-м пассажах. Максимальная продолжительность культивирования фибробластов человека составляла 40—50 пассажей.

Культура хондроцитов. Хондроциты взрослых белых беспородных крыс выделены из отростка грудины по методу [11]. Для слияния использовали хондроциты на 3-м и 4-м пассажах. Максимальная продолжительность культивирования хондроцитов не превышала 6—7 пассажей.

Культура макрофагов. Чистую культуру перитонеальных макрофагов мышей получали по методу [3]. Макрофаги, растущие на покровных стеклах и очищенные от других перитонеальных клеток, сливали с пролиферирующими клетками культуры через 2 сут после посадки.

Культура предшественников макрофагов. Делящиеся предшественники макрофагов получали из костного мозга мышей. Клетки костного мозга высевали в пенициллиновые пузырьки (1 млн клеток в 1 мл, 2 мл на пузырек). Инкубационную среду готовили на основе среды RPMI-1640 с добавлением 15%-ной сыворотки крови новорожденных телят, 25 мМ буфера HEPES, 7%-ной сыворотки крови лошадей, 10%-ной кондиционированной L-клетками среды, содержащей колониестимулирующий фактор (КСФ-1) [12], пенициллин и стрептомицин в концентрации 100 мг/мл, а также глутамин. В среде постоянно присутствовал ^{14}C -тимидин (0,9 кБк/мл). Через 96 ч после начала инкубации в среду добавляли дополнительно 10 % кондиционированной среды, а через 72 ч — еще 10 %. Через 96 ч препараты обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина (30 мин при 37 °С). В этот срок инкубации премакрофаги уже обладали высокой устойчивостью к трипсину (характерное свойство макрофагов). После промыва в препаратах оставались только премакрофаги. Затем в пузырьки добавляли среду того же состава, что и в момент посадки клеток. Слияние макрофагов с премакрофагами проводили через 96 ч после обработки трипсином. Пролиферация премакрофагов в культуре полностью прекращалась через 15—20 сут после их получения из костного мозга. В отдельных опытах для получения культуры предшественников макрофагов использовали метод Тушинского и др. [13], основанный на очистке премакрофагов до приобретения ими способности прикрепляться к твердому субстрату. В качестве источника КСФ-1 в культуру добавляли 10 % среды, кондиционированной L-клетками. Выход премакрофагов в этом случае был существенно меньше, чем при использовании вышеописанного метода.

Выделение макрофагов из смыва перитонеальной полости. Смыв перитонеальной полости белых беспородных мышей получали ранее описанным методом [3]. Макрофаги выделяли из смыва в градиенте плотности Перколла по методу [14].

Слияние клеток и идентификация гетерокарионов. Фибробласты и хондроциты высевали в пенициллиновые пузырьки, на дне которых находились покровные стекла с культурой макрофагов. В каждый пузырек при посадке вводили 300—400 тыс. пролиферирующих клеток. Слияние проводили через 2 ч по ранее описанной методике [3] с помощью полиэтиленгликоля. Перед слиянием ядра фибробластов в течение двух пассажей метили ^3H -тимидином (18,5 кБк/мл). После слияния в среде присутствовал ^{14}C -тимидин (0,9 кБк/мл). Препараты фиксировали через 24—72 ч 70%-ным спиртом и проводили их автордиографическую обработку, как в работе [3]. Ядра в гетерокарионах идентифицировали по наличию или отсутствию над ними мощной ^3H -метки. О наличии синтеза ДНК после слияния судили по наличию ^{14}C -метки вокруг ядра. В опытах с хондроцитами предварительного маркирования не использовали, так как ядра хондроцитов всегда гораздо крупнее ядер макрофагов, а идентификацию ядер проводили только по размерам. В этом случае после слияния в среду вводили ^3H -тимидин (37 кБк/мл).

Для получения гетерокарионов предшественников макрофагов и зрелых макрофагов на покровные стекла с предшественниками высевали по 1 млн макрофагов, выделенных в градиенте плотности Перколла. Слияние проводили через 2 ч после посадки макрофагов. Затем в культуральную среду (состав среды см. в разделе о получении культур премакрофагов) добавляли ^3H -тимидин (185 кБк/мл). Идентификацию ядер

в гетерокарионах проводили на основе наличия или отсутствия ^{14}C -метки. О синтезе ДНК после слияния судили по наличию в ядрах мощной ^3H -метки.

Исследование синтеза ДНК в гетерокарионах. Изучали гетерокарионы, содержащие по одному ядру пролиферирующей клетки и макрофага (гетеродикарионы). Определяли следующие показатели:

- 1) процент синтезировавших ДНК ядер макрофагов в гетерокарионах с синтезировавшими ДНК ядрами активных клеток;
- 2) процент синтезировавших ДНК ядер макрофагов в гетерокарионах с ядрами активных клеток, не синтезировавшими ДНК;
- 3) процент ядер активных клеток, синтезировавших ДНК в гетерокарионах;
- 4) процент синтезировавших ДНК ядер неслившихся активных клеток.

Средние ошибки показателей определяли при $P \geq 0,95$. Показатели 1 и 2 позволяли судить об интенсивности реактивации синтеза ДНК и о зависимости этого процесса от репликации ДНК в ядрах клеток-партнеров. Сравнение показателей 3 и 4 давало ответ на вопрос, имеет ли место подавление синтеза ДНК в ядрах активных клеток в гетерокарионах. В каждом опыте исследовали обычно не менее 150 гетерокарионов.

Результаты. При изучении гетерокарионов макрофагов и эмбриональных фибробластов крысы (количество исследованных гетерокарионов 180, время после слияния 48 ч) не удалось обнаружить ни одного случая реактивации синтеза ДНК в ядрах макрофагов. Не было выявлено также и влияния макрофагов на синтез ДНК в ядрах фибробластов. Доли синтезировавших ДНК ядер фибробластов в гетерокарионах ($85,0 \pm 4,5\%$) и в неслившихся фибробластах ($86,8 \pm 2,8\%$) достоверно не различались.

Результаты, полученные на гетерокарионах макрофагов и хондроцитов крысы, были аналогичны предыдущим (табл. 1).

Таблица 1

Синтез ДНК в гетерокарионах макрофагов и хондроцитов крысы
DNA synthesis in the heterokaryons macrophage and rat chondrocyte

Время после слияния, ч	Количество изученных гетерокарионов	Меченые ядра макрофагов в гетерокарионах с мечеными ядрами хондроцитов, %	Меченые ядра макрофагов в гетерокарионах с немечеными ядрами хондроцитов, %	Меченые ядра хондроцитов в гетерокарионах, %	Меченые ядра неслившихся хондроцитов, %
24	200	0	0	$13,5 \pm 4,8$	$22,0 \pm 4,4$
72	200	0	0	$64,5 \pm 6,9$	$75,3 \pm 4,3$

Гетерокарионы макрофагов и эмбриональных фибробластов человека. К 48 ч после слияния доля ядер неслившихся фибробластов человека, синтезировавших ДНК, достигала 10—15%, что существенно меньше, чем в случае фибробластов крысы. Возможно, это объясняется повышенной чувствительностью фибробластов человека к полиэтиленгликолю. В связи с этим нам пришлось увеличить выборку исследованных гетерокарионов до 800—1000 (известно, что реактивация синтеза ДНК обычно происходит в том случае, если ядро активной клетки-партнера проходит S-период). Закономерности, обнаруженные на двух предыдущих типах гетерокарионов, были выявлены и в этом случае. (Синтез ДНК в ядрах фибробластов в гетерокарионах и неслившихся фибробластов составил на $10,5 \pm 1,3$ и $12,4 \pm 2,1\%$ соответственно).

Гетерокарионы макрофагов и предшественников макрофагов. В первых опытах по слиянию макрофагов с их предшественниками для получения культур предшественников использовали метод Тушинского и др. [13]. К сожалению, этот метод оказался малопродуктивным. Имея в качестве исходного материала костный мозг 10 мышей, получали всего два препарата культуры предшественников макрофагов, причем клеток в этих препаратах было довольно мало. Со-

ответственно и количество полученных гетерокарнионов было небольшим. В этих опытах были обнаружены те же закономерности, что и на гибридах макрофагов с фибробластами и хондроцитами: отсутствие реактивации и подавления синтеза ДНК (табл. 2). В дальнейшем для получения премакрофагов использовали более высокопродуктивный метод, благодаря которому в конечном счете удавалось резко повысить выход гетерокарнионов. И в этом случае анализ гетерокарнионов показал отсутствие реактивации синтеза ДНК в ядрах макрофагов и отсутствие подавления репликации в ядрах премакрофагов (табл. 2).

Таблица 2

Синтез ДНК в гетерокарнионах макрофагов и премакрофагов
DNA synthesis in the heterokaryons macrophage and premacrophage

Время после слияния, ч	Количество изученных гетерокарнионов	Меченые ядра макрофагов в гетерокарнионах с мечеными ядрами премакрофагов, %	Меченые ядра макрофагов в гетерокарнионах с немечеными ядрами премакрофагов, %	Меченые ядра премакрофагов в гетерокарнионах, %	Меченые ядра неслившихся премакрофагов, %
24*	124	0	0	17,3±5,4	13,2±2,0
24	250	0	0	7,7±3,4	9,0±2,9
48	370	0	0	20,3±4,1	19,0±2,1

* В этих опытах премакрофаги получали по методу [13], в остальных—по собственному методу.

Обсуждение. Как было обнаружено, клетки культур с ограниченной способностью к пролиферации не вызывают реактивации синтеза ДНК в ядрах терминально дифференцированных клеток при слиянии с последними. Эти данные подтверждают [6] предположение о том, что для реактивации синтеза ДНК в гетерокарнионах необходимо, чтобы активно пролиферирующие клетки-партнеры по слиянию прошли, по крайней мере, первый этап злокачественной трансформации — иммортализацию. С этим заключением согласуются результаты работы [15], недавно проведенной с использованием фибробластов, трансформированных *ts*-мутантным вирусом SV40. Было показано, что реактивация синтеза ДНК в ядрах макрофагов в гетерокарнионах с этими клетками наступает только при перmissive температуре, т. е. в условиях, при которых происходит нормальный синтез онкобелков этого вируса (Т-антигена).

Данные об отсутствии ингибирующего влияния ядер макрофагов на ядра пролиферирующих клеток в гетерокарнионах позволяют думать, что прекращение пролиферации при дифференцировке не связано с наличием в них ингибиторов (негативных регуляторов) пролиферации, способных подавлять синтез ДНК (или подготовку к нему) в активно делящихся клетках. Представляет особый интерес то, что изложенное относится не только к гибридам макрофагов с пролиферирующими клетками других линий дифференцировки (фибробласты и хондроциты), но и к гетерокарнионам макрофагов с их пролиферирующими предшественниками. Действительно, можно было думать, что действие негативных регуляторов пролиферации ограничивается клетками одного дифференцировочного ряда, поэтому корректное решение вопроса о наличии или отсутствии негативных регуляторов могло быть получено лишь в опытах по гибридизации клеток одной линии дифференцировки.

Полученные данные позволяют заключить, что для поддержания макрофагов в неделящемся состоянии не требуется постоянной выработки негативных регуляторов пролиферации. По-видимому, в ядрах терминально дифференцированных клеток происходят столь существенные изменения, что они не могут быть компенсированы активностью ядер делящихся клеток с ограниченной способностью к пролиферации. Вероятно, для восстановления в ядрах терминально дифференцированных клеток способности к синтезу ДНК необходима активность клеточ-

ных онкогенов, скорее всего онкогенов-иммортализаторов (см. обзор [16]). В связи с этим интересно отметить, что белок — продукт наиболее изученного онкогена-иммортализатора *myc* — имеет четкую ядерную локализацию [17].

DNA SYNTHESIS IN THE HYBRIDS OF MACROPHAGES AND VARIOUS CELLS WITH LIMITED PROLIFERATIVE POTENTIAL

Ye. E. Yegorov, R. R. Gumeniuk, I. A. Prudovsky, A. V. Zelenin
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Macrophages from mouse peritoneal cavities were fused with various cells with the limited capacity to proliferate: human and rat embryo fibroblasts, rat chondrocytes, mouse macrophage precursors. DNA synthesis was studied radioautographically. In any case DNA synthesis was not detected in the macrophage nucleus in heterokaryons. This result and some previous data gave a reason to believe that only proliferatively immortal cells are able to reactivate DNA synthesis after fusion with non-dividing differentiated cells. It is possible that this ability is determined by the activity of immortalising oncogenes. No inhibition of DNA synthesis in the nuclei of active cells in heterokaryons was observed. This suggests that the maintenance of macrophages in non-proliferating state is not connected with the production of intracellular negative regulators of proliferation.

1. *Harris H.* Behaviour of differentiated nuclei in heterokaryons of animal cells from different species // *Nature*.— 1965.— **206**, N 4984.— P. 583—588.
2. *Рингерц П., Сэвидж Р.* Гибридные клетки.— М.: Мир, 1979.— 415 с.
3. *Егоров Е. Е., Прудовский И. А., Зеленин А. В.* Синтез ДНК в гибридах макрофагов и клеток культур с различной пролиферативной активностью // Докл. АН СССР.— 1984.— **276**, № 4.— С. 961—965.
4. *Прудовский И. А., Егоров Е. Е., Зеленин А. В.* Регуляция синтеза ДНК в гибридах дифференцированных неделящихся клеток и клеток с различной пролиферативной способностью // Материалы IV симпозиума СССР — Италия «Макромолекулы в функционирующей клетке».— Киев: Наук. думка, 1984.— С. 95.
5. *Егоров Е. Е., Прудовский И. А., Зеленин А. В.* Макрофаги не тормозят вступления в синтез ДНК ядер незлокачественных пролиферирующих клеток в гетерокарионах // Докл. АН СССР.— 1985.— **280**, № 4.— С. 1016—1020.
6. *Prudovsky I. A., Yegorov Ye. E., Zelenin A. V.* DNA synthesis in the heterokaryons of non-dividing differentiated cells and culture cells with various proliferative potentials // *Cell Differ.*— 1985.— **17**, N 4.— P. 239—246.
7. *Rabinovich P. S., Norwood T. H.* Comparative heterokaryon study of cellular senescence and the serum-deprived state // *Exp. Cell Res.*— 1980.— **130**, N 1.— P. 101—109.
8. *Polynovsky V. A., Setkov N. A., Epifanova O. I.* Onset of DNA replication in nuclei of proliferating and resting NIH3T3 fibroblasts following fusion // *Ibid.*— 1983.— **146**, N 2.— P. 377—383.
9. *Stein G. H., Yanishevsky R. M.* Quiescent human diploid cells can inhibit entry into S-phase in replicative nuclei in heterokaryons // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1981.— **78**, N 5.— P. 3025—3029.
10. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— 293 с.
11. *Deht P., Prockop D. J.* Biosynthesis of cartilage procollagen // *Eur. J. Biochem.*— 1973.— **35**, N 1.— P. 159—160.
12. *Lin H.-S., Stewart C. C.* Peritoneal exudate cells. Growth requirements of cells capable of forming colonies in soft agar // *J. Cell. Physiol.*— 1974.— **83**, N 3.— P. 369—378.
13. *Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy* / R. J. Tushinski, I. T. Oliver, L. J. Guilbert et al. // *Cell.*— 1982.— **28**, N 1.— P. 71—81.
14. *An improved method of unit gravity sedimentation separation for murine peritoneal macrophage populations* / R. A. De Weger, J. M. A. Verbakel, R. Oskam et al. // *J. Immunol. Meth.*— 1983.— **61**, N 1.— P. 117—123.
15. *The capacity of cultured animal cells to induce the reactivation of DNA synthesis in dormant nuclei in heterokaryons and its dependence on culture proliferative potential* / I. A. Prudovsky, Ye. E. Yegorov, R. R. Gumeniuk, A. V. Zelenin / *Acta Biol. Acad. Sci. hung.*— 1986.— **37**, suppl.— P. 11
16. *Зеленин А. В., Прудовский И. А.* Регуляция репликации ДНК в гетерокарионах и ее возможная связь с работой онкогенов // *Успехи соврем. биологии.*— 1985.— **100**, № 6.— С. 340—356.
17. *Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogene* / A. Kari, R. Yary, J. M. Bishop et al. // *Nature.*— 1983.— **306**, N 5940.— P. 274—277.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 22.10.86