

И. М. Дашко, В. И. Прима

ИНДУЦИРОВАННЫЕ АНТИНОМИЦИНОМ Д КОЛЕБАНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ Р-388

Исследовали влияние актиномицина Д в различных концентрациях на интенсивность синтеза нуклеиновых кислот в клетках лейкемии Р-388. Установлено, что в зависимости от концентрации антибиотика меняется не только уровень торможения скорости синтеза РНК, но и кинетика самого процесса. При определенных концентрациях актиномицина Д наблюдаются циклические изменения скорости синтеза РНК и ДНК. Однако периоды торможения и активности синтеза РНК и ДНК во времени совпадают лишь частично: для РНК фаза ингибирования в 2 раза больше, чем для ДНК. Обнаруженные изменения, по-видимому, имеют отношение к механизму контроля транскрипции.

Введение. Течение многих биохимических реакций характеризуется периодическими изменениями активности ферментов и содержания метаболитов [1, 2]. Подобные циклические изменения можно индуцировать различными агентами. Наиболее полно изученной системой являются стабильные Sg-индуцированные автоколебания ионных потоков и объема митохондрий, которые *in vitro* могут функционировать в колебательном режиме [2, 3]. В ходе колебаний ионных потоков в митохондриях наблюдаются циклические изменения содержания АТФ, скорости потребления кислорода, а также величины мембранного потенциала [4]. Представляют интерес данные о периодических изменениях размеров единичных ядер клеток асцитного рака Эрлиха (на 20—30 %) при внесении в суспензию клеток ингибитора обмена ДНФ ($2 \cdot 10^{-4}$ М). Период пульсации размеров ядра составляет 60—90 мин [5]. Показано также, что при частичной блокаде транскрипции процесс синтеза нуклеиновых кислот в клетках асцитного рака Эрлиха приобретает колебательный характер [6].

В настоящей работе нами изучен синтез нуклеиновых кислот клетками лейкемии Р-388 при торможении транскрипции актиномицином Д.

Материалы и методы. В работе использовали клетки лейкемии Р-388. Клетки культивировали *in vivo* в виде перевиваемой асцитной опухоли на мышах линии ДБА/2. Перевивку осуществляли внутривентриально (10^6 клеток). Асцитные клетки использовали в эксперименте на экспоненциальной стадии роста опухоли (4-е сут после перевивки опухоли). За 3 ч до забора асцитных клеток животным внутривентриально инъецировали актиномицин Д в различных дозах. Клетки осаждали центрифугированием (5 мин при 1000 g) и дважды отмывали от асцитной плазмы раствором Рингера. Осадок суспендировали в среде следующего состава: (об. %) среда 199—40, сыворотка крупного рогатого скота — 20, физиологический раствор — 35, трис-НСl, рН 7,4, до концентрации 0,05 М. В суспензию клеток ($0,5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) вносили ^3H -тимидин (2 мкКи на 1 мл) и инкубировали при 37 °С в течение 3—5 ч.

Пробы (1 мл) отбирали через каждые 10 мин инкубации. Включение меченых предшественников останавливали, добавляя в пробы 10 мл охлажденного 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

После 5 мин инкубации на холоду клетки осаждали центрифугированием и трижды отмывали от невключившейся метки 5 %-м раствором ТХУ. Осадок суспендировали в 2 мл раствора ТХУ и инкубировали при 80 °С в течение 30 мин. В супернатанте, полученном после центрифугирования (20 мин при 5000 g), определяли количество включившейся метки. Радиоактивность измеряли в диоксановом сцинтиллаторе на

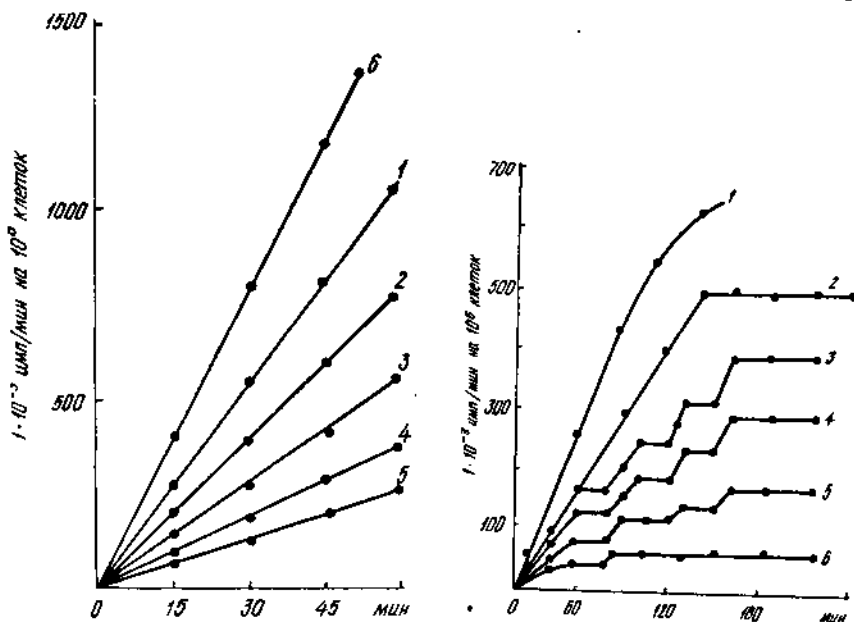


Рис. 1. Кинетика синтеза РНК клетками Р-388 после введения животным актиномицина Д (1 мкг на 1 г массы): 1—0,05; 2—0,1; 3—0,2; 4—0,4; 5—0,6; 6—клетки интактных животных

Рис. 2. Влияние различных концентраций актиномицина Д (1 мкг на 1 г массы) на включение ^3H -уридина в РНК клеток лейкемии Р-388: 1—контроль; 2—0,05; 3—0,05; 4—0,1; 5—0,2; 6—0,4

счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция). Скорость синтеза ДНК и РНК выражали в имп/мин на $1 \cdot 10^6$ клеток.

Интенсивность дыхания клеток определяли по изменению скорости поглощения кислорода в процессе инкубации клеток при 37 °С. Концентрацию кислорода измеряли на полярографе ОН-102 (Венгрия).

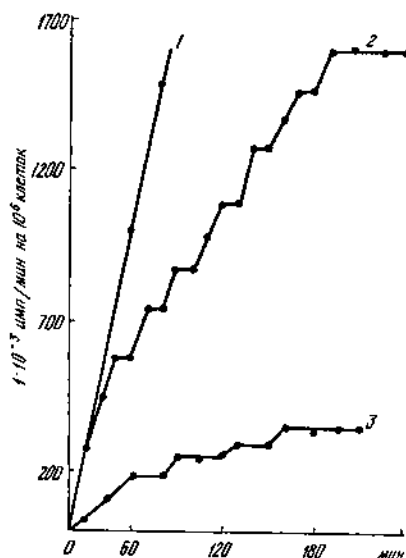
Число клеток подсчитывали в камере Горяева. Результаты опытов подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Известно, что ингибитор трансляции актиномицин Д при концентрации 40 нг/мл вызывает преимущественное торможение синтеза рРНК, в то время как в высоких дозах (2 мкг/мл) приводит к блокированию транскрипции всех видов РНК [7].

Однако при определенных дозах актиномицин Д не только тормозит синтез РНК, но и индуцирует циклические изменения скорости включения меченых предшественников в нуклеиновые кислоты клеток лейкемии Р-388. В интактных клетках включение ^3H -уридина в ново-синтезированную РНК происходит с высокой и постоянной скоростью на протяжении трех и более часов инкубации клеток при 37 °С.

После введения животным актиномицина Д и последующей инкубации опухолевых клеток *in vitro* с меченым предшественником происходит снижение скорости включения ^3H -уридина в РНК пропорционально увеличению дозы актиномицина Д (рис. 1). При концентрации антибиотика 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,6 мкг на 1 г массы величина торможения скорости синтеза РНК составляет 31,3; 50,2; 63,7; 76,2 и 85% соответственно.

В зависимости от концентрации актиномицина Д меняется не только степень торможения скорости синтеза РНК, но и кинетика самого процесса. На рис. 2 представлены графики кинетических закономерностей синтеза РНК в присутствии антибиотика. Отчетливо видны различия в кинетике включения ^3H -уридина в РНК в зависимости от дозы антибиотика. При инкубации клеток лейкемии Р-388 в течение 30 мин включение ^3H -уридина в РНК постепенно возрастает, хотя и с различной скоростью. Однако при более продолжительной инкубации опухолевых клеток кинетические особенности включения метки в РНК и характерные для них графики приобретают совершенно иной характер. После накопления в клетках определенного количества меченого



предшественника скорость включения ^3H -уридина замедляется (кинетическая кривая выходит на плато), а через некоторое время синтез РНК возобновляется с прежней скоростью. Период блокирования синтеза РНК занимает 20 мин. Циклы «торможение — активация», характерные для синтеза РНК, периодически повторяются на протяжении 3-ч инкубации клеток. График зависимости скорости синтеза РНК от концентрации актиномицина Д представляет собой прямую

Рис. 3. Динамика включения ^3H -тимидина в ДНК клеток лейкемии Р-388 в контроле (1) и после экспозиции с актиномицином Д (0,2 мкг на 1 г массы) (2). Включение ^3H -уридина в РНК (3) при той же концентрации антибиотика

с периодически повторяющимися промежуточными плато, а процесс приобретает характер пульсаций. Так, при концентрации актиномицина Д 0,1 мкг на 1 г массы, когда уровень ингибирования синтеза РНК составляет 50,2 %, на графике кинетической зависимости наблюдаются четко выраженные циклические изменения скорости включения ^3H -уридина. Зафиксированы четыре промежуточных плато и последующих подъема; полный период колебания занимает 30 мин. Амплитуда колебаний непостоянна и зависит от концентрации актиномицина Д, коррелируя с величиной торможения синтеза РНК.

С увеличением дозы актиномицина Д (от 0,05 мкг на 1 г массы и выше) амплитуда колебаний снижается примерно в 2 раза. При концентрации актиномицина Д, превышающей 0,4 мкг на 1 г массы, когда величина торможения синтеза РНК достигает 85 %, циклических изменений в синтезе РНК не наблюдается, и скорость включения меченого предшественника в РНК становится постоянной. Колебательный характер синтеза РНК не проявляется также при воздействии незначительных доз актиномицина Д (при уровне торможения менее 10 %). Следовательно, актиномицин Д в определенных дозах способен индуцировать циклические изменения скорости синтеза РНК в клетках лейкемии Р-388.

Актономицин Д оказывает также специфическое влияние на кинетику синтеза ДНК в клетках лейкемии Р-388. График кинетических особенностей включения ^3H -тимидина интактными клетками представляет собой прямую линию, причем скорость включения метки постоянна на протяжении длительного периода инкубации клеток (рис. 3). Включение меченого предшественника в ДНК в ходе индуцированных актиномицином Д колебаний скорости синтеза РНК претерпевает существенные изменения (доза актиномицина Д — 0,2 мкг на 1 г мас-

сы, уровень торможения синтеза РНК — 63,7 %). В течение первых 30—40 мин инкубации клеток скорость включения метки одинакова как для интактных, так и подвергшихся воздействию актиномицина Д клеток. Спустя 50 мин от начала инкубации скорость включения меченого предшественника в клетки, обработанные актиномицином Д, снижается и остается постоянной в течение 10 мин, после чего синтез ДНК опять активизируется и включение метки возобновляется. Периоды активации и торможения синтеза ДНК периодически чередуются; на графике кинетического процесса наблюдаются изломы. Один полный период колебания равняется 20 мин. При более продолжительной инкубации клеток колебания затухают, и кривая кинетического процесса выходит на плато.

Таким образом, при торможении синтеза РНК небольшими дозами актиномицина Д процесс синтеза ДНК также приобретает автоколебательный характер.

Анализ результатов, полученных при изучении влияния актиномицина Д на синтез РНК и ДНК, показал, что скорость включения меченых предшественников снижается в обоих случаях, хотя скорость синтеза ДНК падает не столь значительно. Периоды торможения и активации синтеза РНК и ДНК во времени совпадают лишь частично. Период блокирования синтеза РНК в 2 раза дольше, чем синтеза ДНК.

Необходимо отметить, что после 3-ч инкубации клеток, предварительно обработанных актиномицином Д, включение меченых предшественников в нуклеиновые кислоты замедляется, причем дальнейшей активации синтеза не происходит. Это не связано с гибелью клеток, поскольку интенсивность дыхания в течение инкубации изменяется незначительно. Скорость поглощения кислорода клетками, подвергавшимися воздействию высоких доз актиномицина Д, и интактными клетками составляет $5,1 \pm 1,5$ и $6,58 \pm 0,68$ натом O_2 /мин на 10^6 клеток соответственно.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности актиномицина Д в определенных дозах не только тормозить транскрипцию в клетках лейкемии Р-388, но и индуцировать циклические изменения скорости синтеза нуклеиновых кислот. Обнаруженные изменения, по-видимому, имеют непосредственное отношение к механизму контроля транскрипции. Установлено, что процесс торможения актиномицином Д (0,01—0,25 мкг/мл) синтеза и процессинга РНК тесно связан с подавлением клеточного роста и обратной транслокацией белка В23 [8], а также с замедлением инициации синтеза ДНК в клетках рака Эрлиха [9]. При блокировании одного из ключевых звеньев регуляторной системы процессы синтеза нуклеиновых кислот приобретают автоколебательный характер.

І. М. Данко, В. І. Прима

ИНДУКОВАНІ АКТИНОМІЦИНОМ Д КОЛИВАННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ СИНТЕЗУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ В КЛІТИНАХ ЛЕЙКЕМІЇ Р-388

Резюме

Досліджено вплив різних доз антиноміцину Д на інтенсивність синтезу нуклеїнових кислот в клітинах лейкемії Р-388. Встановлено, що в залежності від концентрації антибіотика змінюється не тільки ступінь гальмування швидкості синтезу РНК, але й кінетика самого процесу. При певних концентраціях актиноміцину Д спостерігаються циклічні зміни швидкості синтезу РНК та ДНК. Але періоди гальмування і активації синтезу РНК і ДНК в часі збігаються лише частково: для РНК фаза гальмування в 2 рази більша, ніж для ДНК. Виявлені зміни, можливо, мають безпосереднє відношення до механізмів регуляції транскрипції.

ACTINOMYCIN D-INDUCED OSCILLATIONS IN THE INTENSITY
OF NUCLEIC ACIDS SYNTHESIS IN LEUKEMIA CELLS P-388

Summary

The effect of actinomycin D on the intensity of nucleic acids synthesis has been studied on leukemia cells P-388. It was found, that not only changes in degree of inhibition of RNA synthesis rate are related to the antibiotic concentration, but also kinetics of the process itself. Certain actinomycin D doses are found to cause cyclical variations in the DNA and RNA synthesis rate. But inhibition and activation periods alternating during the DNA and RNA synthesis coincide in time only partially and inhibition phase for RNA is two times the corresponding phase for DNA. Changes detected seem to have direct relationship with transcription regulation mechanisms.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hess B., Brand K. Continuous oscillation in A cell-free extract of *S. carlsbergensis* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1966.—23, N 1.—P. 102—108.
2. Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. Колебательный характер выхода H^+ из митохондрий при аккумуляции стронция // Биофизика.—1970.—15, № 3.—С. 443—446.
3. Gooch V. D., Packer L. Oscillatory systems in mitochondria // Biochim. et biophys. acta.—1974.—348, N 3—4.—P. 245—260.
4. Холмухамедов Э. Л., Зинченко В. П., Евтодиенко Ю. В. Автоколебания потоков ионов и редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий // Биофизика.—1980.—25, № 1.—С. 124—128.
5. Митюшин В. М., Литинская Л. Л., Каяшир Л. Б. О сократительной способности клеточных ядер // Там же.—1967.—12, № 1.—С. 89—96.
6. Казьмин С. Д. Автоколебания при синтезе нуклеиновых кислот в клетках карциномы Эрлиха // Докл. АН СССР.—1991.—318, № 2.—С. 487—490.
7. Perry R. P., Kelly D. E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species // J. Cell. Physiol.—1970.—76, N 1.—P. 127—140.
8. Yung B. Y. M., Bor A. M. S., Chan P. K. Short exposure to actinomycin D induces «reversible» translocation of protein B 23 as well as «reversible» inhibition of cell growth and RNA synthesis in HeLa cells // Cancer Res.—1990.—50, N 18.—P. 5987—5991.
9. Baserga R., Estensen R. D., Petersen R. O. Inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites cells by actinomycin D. The presynthetic block in the cell cycle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1965.—54, N 4.—P. 1141—1148.

Ин-т эксперим. патологии, онкологии
и радиобиологии НАН Украины, Киев

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 02.02.95