



УДК 616-006-018.15

Н. И. Сьякте, А. В. Будылин

НАКОПЛЕНИЕ РАЗРЫВОВ В СОДЕРЖАЩЕЙ ТРАНСКРИБИРУЕМЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФРАКЦИИ ДНК ПОКОЯЩИХСЯ И ГОЛОДАЮЩИХ КЛЕТОК

Методом фенольно-солевой экстракции ДНК клеток делили на фракции, содержащие транскрибируемые последовательности (ДНК I), нетранскрибируемые (ДНК II) и «потенциально активные» (ДНК III), и подвергали электрофорезу в нейтральных условиях. Тотальная ДНК покоящихся клеток P388 и 4/21 содержала значительное число коротких фрагментов, отсутствующих в пролиферирующих клетках. После фракционирования короткие фрагменты выявлялись во фракциях ДНК I. При «голодании» (инкубация в асцитной жидкости) клеток асцита Эрлиха также накапливаются разрывы ДНК, сосредоточенные во фракции ДНК I.

Введение. В литературе накапливаются данные о роли разрывов ДНК в регуляции активности генома. Рецептор эпидермального фактора роста осуществляет активацию группы генов путем внесения разрыва в ДНК [1]. Стероидные гормоны, напротив, вызывают репарацию существовавших в клетке разрывов [2]. Фрагментация ДНК сопутствует процессам дифференцировки, старения, перехода клеток в состояние покоя [3]. Значение внесения разрывов в ДНК при физиологических изменениях в клетке непонятно. Для выяснения механизма их регулирующей функции необходимо знать, в какие последовательности вносятся эти разрывы. Имеется много косвенных данных об их сайт-специфичности [3]. В качестве первого шага в этом направлении нами исследовано распределение фрагментов ДНК по размерам во фракциях, содержащих транскрибируемые и нетранскрибируемые последовательности, покоящихся трансформированных фибробластов джунгарского хомячка, покоящихся клеток лейкоза P388, голодающих клеток асцита Эрлиха.

Материалы и методы. Трансформированные вирусом SV40 фибробласты джунгарского хомячка 4/21 культивировали, как описано ранее [4]. В состоянии покоя клетки переводили, инкубируя их в течение 7–9 сут в среде с 1 %-ной сывороткой. Лейкоз мышей P388 пассировали на гибридах первого поколения мышей C57Bl/DBA, животным интубирующим вводили 0,2 мл шестикратно разведенной асцитной жидкости. Клетки брали в опыт на 3-е и 8-е сут после перевивки. Асцитную карциному Эрлиха, тетраэноидный штамм, пассировали на беспородных мышках, вводили по 0,5 мл асцитной жидкости. На 7-е сут животных забивали, для получения эффекта голодания к асциту добавляли гепарин (до 1 мг/мл) и инкубировали 4 ч при 37 °С [5]. ДНК из клеток выделяли экстракцией хлороформом. Транскрипционно активные и неактивные последовательности разделяли методом фенольно-солевой экстракции [6, 7]. Транскрипционно активную фракцию получали экстракцией 75 %-ным фенолом, pH 7,2, в 1 М NaCl (ДНК I), транскрипционно неактивную — 66 %-ным фенолом, pH 8,3, в 0,14 М NaCl (ДНК II); связанную с матриксом, обогащенную реплицирующимися последовательностями, «потенциально активную» фракцию (ДНК III) [8] получали обработкой перастворимой интерфазы после выделения ДНК II пропаной P, DS-Na и экстракцией хлороформом.

Электрофорез проводили в горизонтальных пластинах в 0,7 %-ном агарозном геле. Электродный буфер содержал 0,04 М трис-HCl, pH 7,9, 5 мМ CH₃COONa; 1 мМ

ЭДТА. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали через красный светофильтр в ультрафиолетовом свете на листовую негативную фотопленку (65 ед. ГОСТ) при помощи фотоувеличителя «Беларусь-2». Негативы сканировали на денситометре Chromoscan 200 («Joice-Loeb», Англия). Средневзвешенную молекулярную массу фрагментов ДНК определяли, сравнивая центр тяжести пика с положением стандартов (рестриктазы ДНК фага λ рестриктазами *EcoRI*, *PstI*). Число разрывов ДНК на тысячу пар оснований (т. п. о.) рассчитывали как разность чисел, обратных молекулярным массам (в т. п. о.) покоящегося (голодающего) и контрольного образцов [9]. Относительное содержание низкомолекулярных (менее 11,5 т. п. о.) и высокомолекулярных фрагментов ДНК рассчитывали как отношение площадей, заключенных под пиками.

Результаты и обсуждение. В многочисленных исследованиях показано, что метод фенольно-солевой экстракции позволяет разделить транскрипционно активные последовательности (ДНК I), неактивные (ДНК II) и «потенциально активные» (ДНК III) [8]. При переходе клеток в состояние покоя или при «голодании» в ДНК накапливаются одно- и двунитчатые разрывы [3, 5]. В некоторых случаях фрагментация ДНК настолько значительна, что может быть обнаружена электрофорезом в нейтральных условиях. На рис. 1, а, б, представлены денситограммы ДНК клеток лейкоза *P388* на 3-е и 8-е сут развития. К 8-м сут клетки этой опухоли начинают переходить в состояние покоя, на 2-е сут развития — активно пролиферируют. Видно, что ДНК на 8-е сут развития содержит значительное число коротких фрагментов, которых нет в пролиферирующих клетках, видна даже нуклеосомная периодичность части фрагментов. Средневзвешенная молекулярная масса снижается при этом от 25,5 до 7,4 т. п. о. После фенольно-солевой экстракции низкомолекулярные фрагменты концентрируются в ДНК I-фракции, содержащей транскрипционно активные гены (рис. 1, в — д).

При остановке деления клеток *4121* также наблюдается значительная фрагментация ДНК (рис. 2, а, б). Разделение ДНК фенольно-солевой экстракцией показывает, что в данном случае наиболее фрагментирована ДНК I. Низкомолекулярный компонент замечен даже на ДНК I из пролиферирующих клеток, ДНК I покоящихся клеток состоит в значительной мере из мелких фрагментов (рис. 2, в, г). ДНК II и ДНК III как из пролиферирующих, так и из покоящихся клеток имеют лишь высокомолекулярный компонент (молекулярная масса во всех случаях около 21 т. п. о., здесь не представлено). Таким образом, фракция ДНК I содержит больше разрывов и в пролиферирующих клетках, а при переходе в состояние покоя нарастание их числа идет также в транскрипционно активной фракции ДНК и не затрагивает ДНК II и ДНК III.

Искусственно вызванное «голодание» клеток асцита Эрлиха сопровождается накоплением разрывов ДНК на фоне активного синтеза поли-АДР-рибозы и на основании этих двух критериев может рассматриваться как модель клеточной дифференцировки [3, 5]. На рис. 3, а, б, приведены денситограммы тотальной ДНК контрольных и голодающих клеток асцита Эрлиха. Четырехчасовое «голодание» приводит к значительной фрагментации ДНК, кроме уже описанных однонитчатых разрывов, мы можем утверждать и о наличии двойных, так как электрофорез проводили в нейтральных условиях. Видна значительная фракция коротких фрагментов. По расчетам при голодании в тотальную ДНК вносится примерно 0,029—0,033 разрыва на т. п. о. При фенольно-солевой экстракции фракция коротких фрагментов оказывается в ДНК I, при сравнении размеров фрагментов ДНК I контрольных и голодающих клеток определяется 0,044—0,046 разрыва на т. п. о. (рис. 3, в, г). Во фракциях ДНК II и ДНК III молекулярная масса фрагментов ДНК из контрольных и голодающих клеток примерно одинакова (рис. 3, д—з). Таким образом, в «голодающих» клетках асцита Эрлиха накопление разрывов ДНК отмечается в транскрипционно активной фракции ДНК.

Разумеется, обнаруженная нами преимущественная фрагментация ДНК I еще не означает, что разрывы появляются именно в транскри-

обнаруженных генах. Однако в литературе имеются указания на то, что в экспоненциально растущих клетках фракция транскрибируемых генов, обнаруживаемая при помощи гибридизации с поли(А)⁺РНК, выходит в первых фракциях при щелочной элюции, что указывает на наличие эндогенных разрывов в транскрибируемых последовательностях [10].

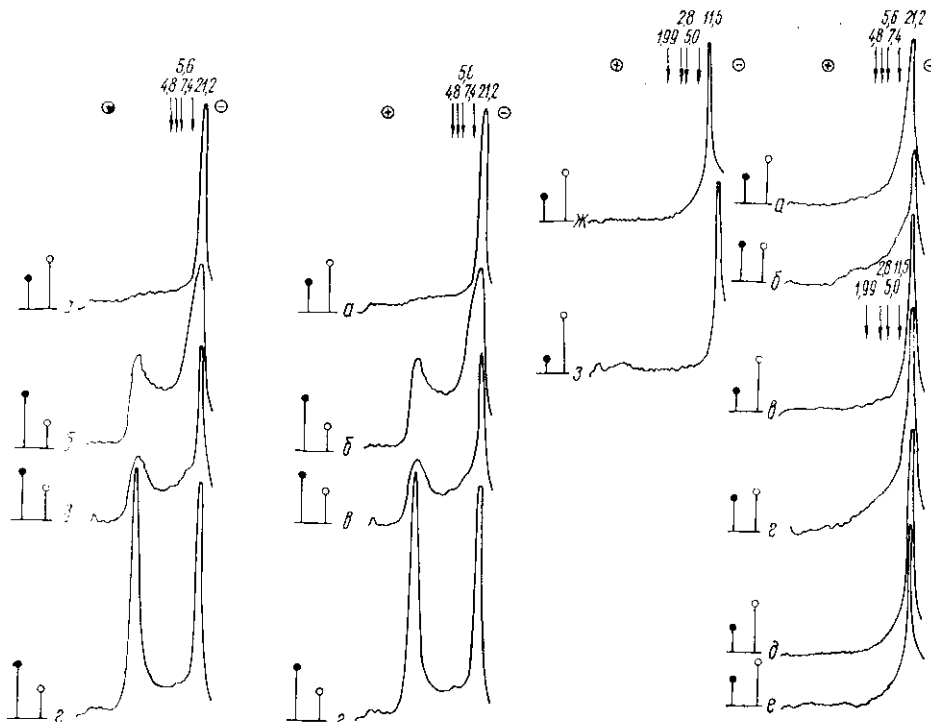


Рис. 1. Электрофоретическое распределение фрагментов ДНК, выделенных из клеток P388: а — клетки на 3-е сут развития лейкоза, totalная ДНК; б — 8-е сут развития, totalная ДНК; в — 8-е сут, ДНК I; г — 8-е сут, ДНК II; д — 8-е сут, ДНК III. Стрелки обозначают положение стандартов (т. п. о.). Столбик слева от кривых иллюстрируют относительное содержание ДНК с молекулярной массой менее 11,5 т. п. о. (с черными кружками) и с большей молекулярной массой (с белыми кружками)

Fig. 1. Electrophoretical distribution of DNA fragments isolated from P388 cells. а — the 3d day of tumour development, total DNA; б — the 8th day of tumour development, total DNA; в — the 8th day, DNA I; г — the 8th day, DNA II; д — the 8th day, DNA III. Arrows indicate the standard position (kbp). Columns on the left from the curves illustrate the ratio of DNA with molecular mass less than 11.5 kbp (column with a filled circle) and with a higher molecular mass (column with an opened circle)

Рис. 2. Электрофоретическое распределение фрагментов ДНК, выделенных из клеток 4/21: а, б — пролиферирующие и покоящиеся клетки соответственно, totalная ДНК; в, г — то же для ДНК I. Обозначения, как на рис. 1

Fig. 2. Electrophoretical distribution of DNA fragments isolated from 4/21 cells. а — proliferating cells, total DNA; б — quiescent cells, total DNA; в — proliferating cells, DNA I; г — quiescent cells, DNA I. Indications as in Fig. 1

Рис. 3. Электрофоретическое распределение фрагментов ДНК, выделенных из клеток асцит Эрлиха: а, б — нормальные и «голодающие» клетки соответственно, totalная ДНК; в, г — то же для ДНК I; д, е — для ДНК II; ж, з — для ДНК III. Обозначения, как на рис. 1

Fig. 3. Electrophoretical distribution of DNA fragments isolated from Ehrlich ascite cells: а — normal cells, total DNA; б — starving cells, total DNA; в — normal cells, DNA I; г — starving cells, DNA I; д — normal cells, DNA II; е — starving cells, DNA II; ж — normal cells, DNA III; з — starving cells, DNA III. Indications as in Fig. 1

Показано усиление чувствительности гена теплового шока к специфичным для однонитчатой ДНК нуклеазам после его активации [11]. Таким образом, сама по себе транскрипционная активность сопряжена с внесением разрывов в ДНК. Возможно, что перестройка генома в связи с переходом в состояние покоя или «голоданием» требует внесения до-

полнительных разрывов. Известно, что именно активный хроматин более чувствителен к действию эндогенных ДНКаз [12, 13], разрывы могут вноситься этими ферментами, на что указывает наличие двойных разрывов и нуклеосомной периодичности в некоторых препаратах. Не исключено, что определенную роль во фрагментации ДНК может играть и топоизомераза I. Этот фермент взаимодействует с транскрибируемыми последовательностями [14] и участвует в генерации так называемой детергент-растворимой ДНК — несвязанной с остальной массой хроматина фракции из коротких фрагментов [15], которая обогащена транскрибируемыми последовательностями [16].

Для окончательного выяснения роли разрывов ДНК в осуществлении перестроек генома необходимо перейти к анализу отдельных генов. Наши предварительные результаты указывают на большую фрагментированность последовательностей генов гистонов по сравнению с геном актина в покоящихся клетках *4/21* и голодающих клетках асцита Эрлиха. Детальное изучение этого явления составит предмет наших дальнейших исследований.

ACCUMULATION OF STRAND BREAKS IN DNA FRACTION CONTAINING TRANSCRIBED SEQUENCES IN QUIESCENT AND STARVING CELLS

N. I. Sjakste, A. V. Budylin

Latvian Research Institute of Experimental and Clinical Medicine,
Ministry of Public Health of the Latvian SSR

Summary

Cellular DNA was separated in fractions containing transcribed sequences (DNAI), untranscribed sequences (DNAII) and «potentially active» sequences (DNAIII) by means of phenol-salt extraction and was subjected to electrophoresis under neutral conditions. Total DNA of quiescent *P388* and *4/21* cells contained the great number of short fragments absent in DNA of proliferating cells. After fractionation the short fragments were revealed in DNAI. DNA strand breaks concentrated in DNAI fraction accumulate also in the starving (incubated in ascitic liquid) Ehrlich ascites cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carpenter G.* Properties of the receptor for epidermal growth factor // *Cell*.— 1984.— 37, N 2.— P. 357—358.
2. *Ранние изменения структуры ДНК-матрицы после введения глюкокортикоидов / В. В. Адлер, М. А. Красильников, Г. Ю. Бочкарев, В. С. Шапот // Биохимия.*— 1982.— 47, № 6.— С. 915—920.
3. *Сьякте Н. И.* Роль разрывов ДНК в регуляции процессов клеточной пролиферации, дифференцировки и старения // *Онтогенез.*— 1987.— 18, № 3.— С. 229—238.
4. *Сьякте Н. И., Сьякте Т. Г.* Открепление ДНК от ядерного матрикса в переведенных в состояние покоя трансформированных фибробластах джунгарского хомячка // *Биополимеры и клетка.*— 1986.— 2, № 1.— С. 50—52.
5. *Stimulation of poly(ADP-ribosyl)-ation during Ehrlich ascites tumor cell «starvation» and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide / K. Wielckens, E. George, T. Pless, H. Hilz // J. Biol. Chem.*— 1983.— 258, N 7.— P. 4098—4104.
6. *Стражевская Н. Б., Стручков В. А.* О различном структурно-функциональном состоянии ДНК в животной клетке в норме и после облучения // *Радиобиология.*— 1971.— 11, № 5.— С. 649—655.
7. *Дашкевич В. С., Аршинова Т. В.* Выделение фракции реплицирующейся ДНК регенерирующей печени крыс бездетергентным фенольным методом // *Изв. Сиб. отд. АН СССР.*— 1973.— 15, № 3.— С. 133—135.
8. *Переход глобиновых генов из транскрипционно-активной фракции ДНК во фракцию потенциально активной ДНК при дифференцировке ретикулоцитов в эритроцитах у птиц / В. С. Дашкевич, А. П. Кузьменко, Н. А. Скобелева и др. // Докл. АН СССР.*— 1983.— 270, № 5.— С. 1236—1238.
9. *Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single-strand breaks in non-radioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: application to pyrimidine dimers / S. F. Freeman, A. D. Blackett, D. C. Monteleone et al. // Anal. Biochem.*— 1986.— 158, N 1.— P. 119—129.
10. *Induction of DNA strand breaks in transcriptionally active DNA sequences of mouse cells by low doses of ionizing radiation / R. L. Warters, B. W. Lyons, S.-M. Chiu, N. L. Oleinick // Mutat. Res.*— 1987.— 180, N 1.— P. 21—29.

11. Han S., Udvardy A., Schedl P. Transcriptionally active chromatin is sensitive to *Neurospora crassa* and S₁ nucleases // J. Mol. Biol.—1984.—179, N 3.— P. 469—496.
12. Вотрин И. И., Ходарев Н. Н., Баснакьян А. Г. Эндонуклеазы как инструмент исследования структурно-функциональной организации хроматина // Вестник АМН СССР.— 1983.— № 3.— С. 88—95.
13. Распределение транскрипционно-активных последовательностей ДНК в хроматине печени крыс при фрагментации эндогенными нуклеазами / Г. И. Чихирджина, В. В. Бубякина, А. Л. Шварцман, В. С. Гайцхоки // Молекуляр. биология.— 1987.— 21, № 1.— С. 125—131.
14. Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells / D. S. Gilmore, G. Pilugfelder, J. C. Wang, J. T. Lis // Cell.— 1986.—44, N 3.— P. 401—407.
15. Role for topoisomerases in the release of DNA into the detergent-soluble fraction of eukaryotic cells / L. H. Zhang, S. C. Mui, J. C. Todt, P. R. Strauss // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.—83, N 16.— P. 5871—5874.
16. Strauss P. R. Detergent soluble DNA is enriched in sequences being actively transcribed // J. Cell. Biol.—1987.—105, N 4, pt. 2.— P. 69a.

Латв. ПИИ экперим. и клин. медицины,
Рига

Получено 22.02.89