



УДК 547.963.3

ОТКРЕПЛЕНИЕ ДНК ОТ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В ПЕРЕВЕДЕННЫХ В СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ДЖУНГАРСКОГО ХОМЯЧКА

Н. И. Сьякте, Т. Г. Сьякте

При исследовании ДНК-белковых взаимодействий в клетках с различным пролиферативным статусом методом нуклеопротеид-целит (НПЦ)-хроматографии были обнаружены резкие изменения в прочности связи ДНК и белков матрикса при переходе клеток в покой [1—3]. Недавно была предложена усовершенствованная модификация метода [3], применение которой позволяет тестировать одновременно взаимодействия ДНК с белками ядерного матрикса и хроматина. Настоящая работа посвящена исследованию этих типов связи ДНК — белок в покоящихся и делящихся клетках.

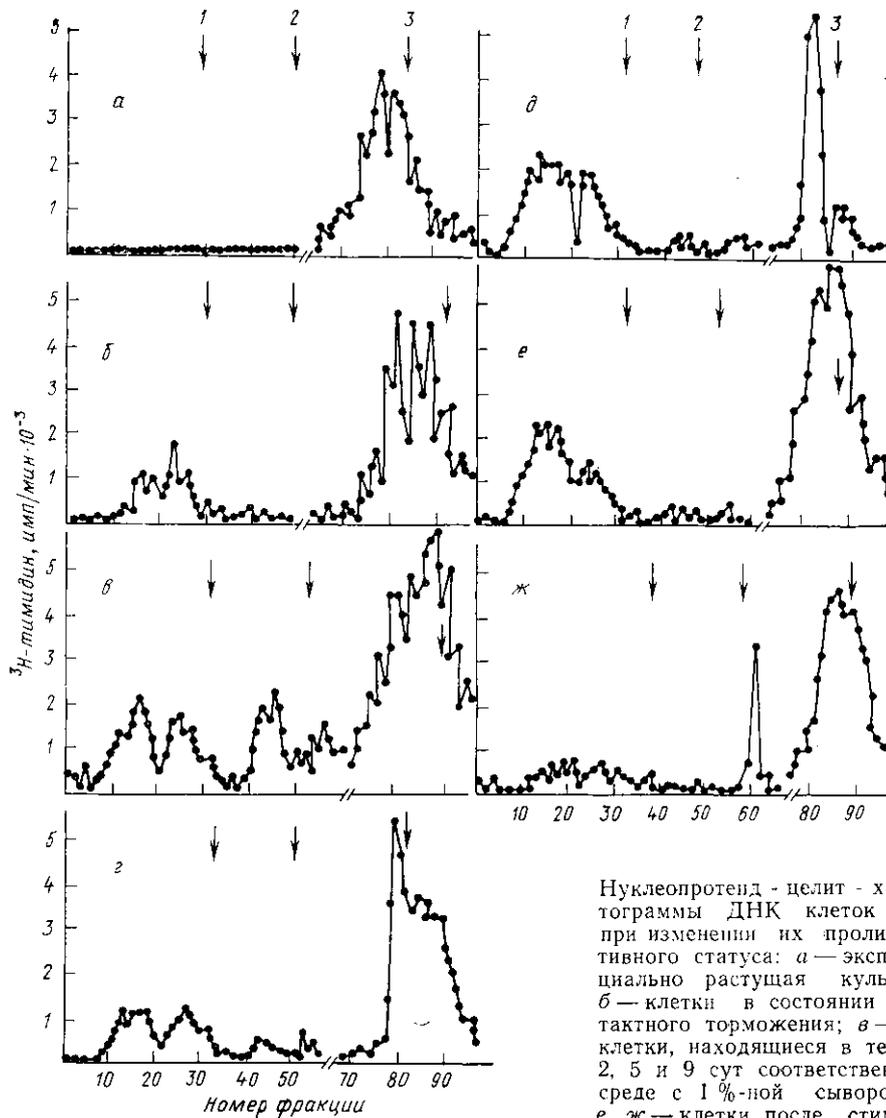
Материалы и методы. Трансформированные вирусом SV-40 фибробласты джунгарского хомячка линии 4/21 [4] выращивали в сосудах Карреля в питательной смеси, содержащей среду Игла, гидролизат лактальбумина и сыворотку крупного рогатого скота в соотношении 4,5:4,5:1 с добавлением пенициллина (250 ед/мл) и стрептомицина (0,5 мг/мл). На вторые сутки после посева в среду добавляли ³H-тимидин (0,2 МБк/мл). Клетки снимали со стекла скребком или 1 %-ным раствором тритона X-100 в буферном растворе (25 мМ трис-НСl, рН 7,6, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,1 %-ный диэтилпироксикарбонат). Как правило, чтобы повысить надежность результатов, из одного сосуда Карреля брали клетки для двух временных точек; первую порцию снимали скребком, вторую — лизисом.

Методика НПЦ-хроматографии подробно описана в [1, 3, 5]. Лизат клеток в 1 %-ном растворе тритона X-100 смешивали с целитом 545. При этом нуклеопротеиды белковой частью необратимо сорбировались на целите. Нуклеиновые кислоты постепенно высвобождались из связи с белками последовательной элюцией градиентами NaCl (0—3 М; 100 мл), LiCl-мочевины (0—4 М, 8 М; 60 мл) при 8—10 °С и градиентом температуры (50—100 °С). Таким образом, нуклеиновые кислоты фракционировали на основе прочности их связи с белками. В отличие от предыдущих работ [1—3, 5] обязательно проводили элюцию градиентом NaCl, градиент температуры начинали с 50 °С. Осажденные этанолом нуклеиновые кислоты растворяли в дистиллированной воде, радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе Брея.

Результаты и обсуждение. На рисунке, *а* представлена НПЦ-хроматограмма ДНК клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста (по истечении 3 сут после посева и 2 сут после введения метки). На хроматограмме имеется всего один пик, элюируемый при температуре около 90 °С, что свидетельствует о прочном связывании ДНК с белками матрикса, характерном для пролиферирующих клеток [1—3]. После того как клетки образовали монослой (7-й день после посева), характер НПЦ-хроматограммы изменился (рисунок, *б*). Часть ДНК (около 25 %) элюировалась градиентом NaCl, следовательно, эта фракция ДНК связана лишь с белками хроматина, а не ядерного матрикса, так как связь ДНК — матрикс устойчива к высоким концентрациям соли [6]. Для того чтобы вызвать более полный переход в состояние покоя, клетки, образовавшие монослой, переводили в среду с пониженным до 1 % содержанием сыворотки. По мере инкубации в такой среде наблюдали постепенное увеличение доли несвязанной с матриксом ДНК (рисунок, *в—д*), на 9-й день инкубации она составила 51 % всей ДНК. Наряду с прочно связанной и несвязанной с матриксом ДНК в отдельных препаратах (рисунок, *в, г*) имелась фракция ДНК, слабо связанная с ядерным матрик-

сом и элюируемая градиентом LiCl-мочевины, что характерно для покоящихся клеток [1, 2].

Чтобы убедиться в том, что наблюдаемое открепление ДНК от матрикса обусловлено изменением пролиферативного статуса клетки, а не клеточной гибелью, вызывали обратный переход клеток от состояния покоя к делению. Для этого клеткам, инкубиро-



Нуклеопротенд - целит - хроматограммы ДНК клеток 4/21 при изменении их пролиферативного статуса: *а* — экспоненциально растущая культура; *б* — клетки в состоянии контактного торможения; *в* — *г* — клетки, находящиеся в течение 2, 5 и 9 сут соответственно в среде с 1%-ной сывороткой; *е*, *ж* — клетки после стимуляции к росту полноценной средой в течение 1 и 2 сут соответственно. Стрелки обозначают: 1 — конец градиента NaCl; 2 — конец градиента LiCl-мочевины; 3 — точка 90 °С.

дой в течение 1 и 2 сут соответственно. Стрелки обозначают: 1 — конец градиента NaCl; 2 — конец градиента LiCl-мочевины; 3 — точка 90 °С.

Nucleoprotein-celite-chromatograms of DNA of 4/21 cells of different proliferative status: *a* — exponentially growing culture; *б* — contact-inhibited cells; *в*, *г*, *д* — cells incubated in medium supplemented with 1% serum for 2, 5, 9 days, respectively; *е*, *ж* — cells restimulated to growth by complete medium for 1 and 2 days, respectively. Arrows indicate: 1 — the end of NaCl gradient, 2 — the end of LiCl-urea gradient, 3 — 90 °C point.

ванным в течение 9 дней в среде с низким содержанием сыворотки, заменили среду на полноценную. Эффект стимуляции можно проследить на рисунке, *д* — *ж*. Если до стимуляции более 50% ДНК было связано только с белками хроматина (*д*), то через сутки после стимуляции содержание такой ДНК снизилось до 30% (*е*), а через двое суток — до 16% (*ж*). Соответственно возрастала доля прочно связанной с матриксом ДНК. Следовательно, открепление ДНК от матрикса в покоящихся клетках — обратим-

мый процесс, не связанный с клеточной гибелью. После стимуляции клеток к пролиферации происходит реассоциация ДНК с белками ядерного матрикса.

Таким образом, открепление ДНК от матрикса является характерным признаком трансформированных вирусом SV-40 фибробластов 4/21, находящихся в состоянии покоя. Качественные структурные перестройки клеточного ядра покоящихся клеток указывают на то, что клетки находятся в специфической фазе покоя — G_0 , хотя до сих пор считалось, что клетки, трансформированные ДНК-содержащими вирусами, в неблагоприятных для пролиферации условиях продолжают медленно проходить клеточный цикл [7].

Согласно полученным в этом исследовании данным открепление ДНК от матрикса — основной тип изменений ДНК-белковых взаимодействий при переходе клеток в состояние покоя, по крайней мере, в изученных клетках 4/21. Другой тип изменений — замена прочных взаимодействий ДНК — матрикс слабыми [1—3], также имеет место, но доля слабо связанной с матриксом ДНК невелика. Открепление ДНК от ядерного матрикса может происходить вследствие образования двойных разрывов в ДНК или в результате деградации связывающих ДНК белков матрикса.

Следует отметить, что белки хроматина гетерогенны по прочности их связи с ДНК. В градиенте NaCl четко различимы два переходящих друг в друга пика ДНК. Первый элюируется 1,5 М NaCl, второй — содержит ДНК, связанную с белками более прочно, для элюции которой необходима концентрация NaCl более 2 М. По мере углубления покоя увеличивается содержание ДНК, менее прочно связанной с белками хроматина (рисунок, б, д, е).

DETACHMENT OF DNA FROM THE NUCLEAR MATRIX IN GROWTH-ARRESTED TRANSFORMED CHINESE HAMSTER FIBROBLASTS

N. I. Sjakste, T. G. Sjakste

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

Summary

SV-40 transformed Chinese hamster fibroblasts were growth-arrested by incubation in the medium with lowered serum content. DNA-protein interactions in the cells were studied by the nucleoprotein-celite-chromatography method. Detachment of the DNA from the nuclear matrix was revealed in quiescent cells. After the cells were restimulated to proliferate the reassociation of DNA and nuclear matrix was observed. The weakening of the bonds of a part of DNA with nuclear matrix proteins was also observed in quiescent fibroblasts.

1. Анализ клеточных нуклеопротеидов методом нуклеопротеид-целит-хроматографии. I. Изменения структуры хроматина, сопряженные с клеточным переходом покой — деление / Н. И. Сьякте, М. М. Забойкин, А. В. Лихтенштейн, В. С. Шапот // Молекуляр. биология. — 1981. — 15, № 6. — С. 1321—1329.
2. *Rearrangements* of DNA — protein interactions in animal cells coupled with cellular growth-quiescence transitions / A. V. Lichtenstein, N. I. Sjakste, M. M. Zabaykin, V. S. Shapot // Nucl. Acids Res. — 1982. — 10, N 3. — P. 1127—1145.
3. Два типа взаимодействия ДНК с ядерным матриксом / Н. И. Сьякте, Е. А. Эренпрейса, М. М. Забойкин и др. // Молекуляр. биология. — 1985. — 19, № 5. — С. 1231—1241.
4. Какпакова Е. С., Сокова О. И., Левина Н. В. Биологическая и кариологическая характеристика линий клеток джунгарского хомячка, трансформированных вирусом SV-40 // Цитология. — 1972. — 14, № 8. — С. 1019—1026.
5. Градиентная диссоциация тотальных клеточных нуклеопротеидов как принцип разделения и анализа функционально различных типов нуклеиновых кислот / А. В. Лихтенштейн, М. М. Забойкин, В. Л. Мойсеев, В. С. Шапот // Докл. АН СССР. — 1979. — 245, № 4. — С. 1005—1009.
6. Збарский И. Б. Структурная организация и функциональная роль ядерного матрикса // Структурно-функциональные аспекты репликации и репарации ДНК. — Пушкино, 1983. — С. 3—21.
7. Dubrow R., Riddle V., Pardee A. Different responses to drugs and serum of cells transformed by various means // Cancer Res. — 1979. — 39, N 5. — P. 2718—2726.

Латв. НИИ эксперим. и клин. медицины МЗ ЛатвССР,
Рига

Получено 10.04.85