

БИОСИНТЕЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ ДНК ПРИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ПЛАЗМАЦИТОМЫ МОРС-21

С. В. Комиссаренко, Д. И. Лукинов, Е. И. Черепенко

Введение. Проблема пролиферации клеток связана с проблемой репликации ДНК. Репликация ДНК у эукариот определяется организацией эукариотического генома и носит двухфазный характер, включающий фазу ранней и поздней репликации [1—4]. В настоящее время известно, что активно транскрибирующиеся гены реплицируются преимущественно в ранней фазе, а молчащие гены — в поздней [4]. Как достигается временной порядок репликации генов у эукариот? Недавно было показано, что принадлежность гена к рано- или позднореплицирующемуся определяется его локализацией в хромосоме, т. е., очевидно, близостью гена к каким-то сигнальным последовательностям репликации.

Изучение кинетических характеристик ДНК, реплицирующихся в ранние и поздние сроки, выявило семейства последовательностей умеренных повторов (MR ДНК), реплицирующихся либо в ранней, либо в поздней фазе репликации [4]. Это позволяет связать поиск предполагаемых сигнальных структур для ранней и поздней репликации с определенным кинетическим классом нуклеотидных последовательностей генома.

Итак, если в одном и том же кинетическом классе могут быть и рано- и поздно-реплицирующиеся последовательности, то можно ли на несинхронно растущих клетках заметить этот временной порядок репликации по уровню включения радиоактивного предшественника синтеза ДНК *in vivo* в данный кинетический класс последовательностей? Для ответа на этот вопрос необходимо было получить отдельные кинетические классы нуклеотидных последовательностей генома клеток мышинной плазмацитомы МОРС-21 и измерить удельную радиоактивность каждой из полученных фракций.

Материалы и методы. Клетки мышинной плазмацитомы МОРС-21 культивировали *in vivo* в виде внутрибрюшинной асцитной опухоли у мышей линии *BALB/C*. В фазе логарифмического роста клеток (на 6-е сут после перевивания) трем мышам вводили дважды с интервалом 12 ч по 1,85 МБк [³H]тимидина (ВО «Изотоп», Московское отделение, удельная радиоактивность $8,5 \cdot 10^5$ МБк/ммоль). Метку вводили внутрибрюшинно. Через 6 ч после повторного введения изотопа животных забивали и собирали асцитную жидкость. Клетки из асцита собирали центрифугированием (15 мин при 900 *g*), дважды промывали (рецентрифуруя) раствором 0,15 М NaCl и использовали для выделения ДНК.

Выделение [³H] ДНК из клеток плазмацитомы МОРС-21. При обработке выделенных плазмацитомных клеток раствором 1,5 %-ной лимонной кислоты получали ядра, которые ресуспендировали в 30-кратном объеме 0,01 М натрий-фосфатного буфера, рН 6,8, и лизировали DS-Na в конечной концентрации 0,5 %. ДНК экстрагировали из хроматина в присутствии 2,5 М NaCl при 4 °С после 3—5-кратного перемешивания суспензии в гомогенизаторе с притертым пестиком. После центрифугирования экстракта ДНК при 20000 *g* в течение 10 мин при 4 °С раствор разводили 0,16 М натрий-фосфатным буфером так, что концентрация NaCl снижалась до 2,0 М, и хроматографировали на колонке с оксиапатитом, промывая вначале 0,16 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 2 М NaCl, затем — 0,18 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,4 М NaCl до значения оптической плотности элюата $E_{260} = 0$. ДНК элюировали с колонки 0,48 М натрий-фосфатным буфером, осаждали с помощью цетавлона и переводили в натриевую соль так, как указано в работе [5]. Удельная радиоактивность препаратов ДНК, измеренная на фильтрах G/C («Whatman», Англия) в толуольном сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-40 («Inter-technique», Франция) была $(1,8—2,2) \cdot 10^4$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹. При этом не наблюдали различий в счете фильтров с соответствующими количествами ренатурированных и денатурированных препаратов фрагментированной ДНК. При определении удельной радиоактивности средних повторов и уникальной ДНК на фильтры наносили денатурированные молекулы так, чтобы при определении концентрации этих молекул учитывался гиперхромный эффект, составляющий соответственно 33 и 37 %.

Фрагментация [³H] ДНК плазмацитомы МОРС-21. Фрагментацию полученных препаратов ДНК осуществляли с помощью ультразвуковой обработки на дезинтеграторе фирмы «MSE», Англия [6]. Чистое время обработки ультразвуком составляло 60 мин. Электронная микроскопия полученных препаратов выявила удельную однородность фрагментов по длине. Контур фрагмента в среднем соответствовал молекулярной массе порядка $1,98 \pm 0,97 \cdot 10^5$, что составляло примерно 300 пар нуклеотидов. Гиперхромный эффект препаратов ДНК, фрагментированных в опи-

санных условиях, составлял 30—33 %. Изменения в величине удельной радиоактивности препаратов ДНК после ультразвуковой обработки не наблюдали.

Фракционирование [³H] ДНК МОРС-21 по скорости реассоциации. Фракционирование фрагментированной ДНК по скорости реассоциации проводили на основе кинетики реассоциации [7] с учетом данных фракционирования на основе этого же показателя для нуклеотидных последовательностей генома крысы, полученных в работе [6]. На основании этих данных фракционирование различных кинетических классов последовательностей проводили при значениях C_0t (представленных произведением начальной концентрации реассоциирующих молекул на время реассоциации), соответствующих выражению

$$C_0t_{\text{фр}} = \sqrt{\bar{C}_0t_{1/2}^i \cdot C_0t_{1/2}^{i+1} + 1}, \quad (1)$$

где i и $i+1$ — два соседствующих на кинетической кривой класса последовательностей. При этом учитывали, что величина $C_0t_{\text{фр}}$ изменяется с изменением концентрации данной последовательности, согласно

$$C_0t^* = C_0t_{1/2} \cdot M/M^*, \quad (2)$$

где звездочкой отмечены параметры семейства после фракционирования, без звездочки — исходные параметры, M — доля семейства в геноме. На основании данных о структурной организации нуклеотидных последовательностей генома мыши [8], формул (1) и (2) рассчитана схема фракционирования частых (Ч), средних (С), редких повторов, содержащих часть уникальной ДНК (Р+У), и фракции уникальной ДНК. Данные фракции выделены бесколоночным методом фракционирования на оксипатите [9], и измерена удельная радиоактивность каждой выделенной фракции. На каждом этапе фракционирования анализировали кинетику реассоциации выделенных фракций для уточнения последующих C_0t фракционирования и проверки чистоты выделенных кинетических фракций генома мыши.

Результаты и обсуждение. При фракционировании генома мыши по скорости реассоциации с помощью бесколоночного метода на оксипатите средняя длина фрагментов ДНК не должна превышать 300 ± 50 пар оснований ($C_0t_{1/2}$ аналогичных фрагментов *E. coli* составил в данных условиях реассоциации величину, равную 5,45). Исходя из данных табл. 1 и того, что оптимальное фракционирование различных семейств последовательностей ДНК достигается при значениях $C_0t_{\text{фр}}$, вычисленных из формулы (1) [6], была рассчитана схема фракционирования генома мыши на составляющие классы последовательностей оснований. Правильность этой схемы фракционирования и ее коррекцию проверяли при определении $C_0t_{1/2}$ отдельных кинетических фракций генома мыши, выделенных согласно данной схеме фракционирования. Так, фракция частых повторов реассоциировала в данных условиях реассоциации практически мгновенно полностью. Что касается выделенной фракции средних повторов, то при $C_0t_{1/2} = 0,01$ количество ренатурированных молекул для трех проб составило 47, 51 и 54 % соответственно (по расчетным данным, 50 % реассоциации молекул данного класса достигается при $C_0t_{1/2} = 0,006$). Эти величины для фракции редких повторов при $C_0t_{1/2} = 3$ составили 39, 42 и 46 % соответственно (по расчетным данным, 50 % реассоциации молекул данного класса достигается при $C_0t_{1/2} = 2,7$). Фракцию уникальной ДНК не изу-

Таблица 1

Кинетические параметры различных нуклеотидных последовательностей, составляющих геном мыши, рассчитанные по данным работ [8, 11]

Kinetic characteristics of mouse genome different classes nucleotide sequences derived from reassociation data [8, 11]

Последовательности	Параметры				
	$C_0t_{1/2}^i$	$C_0t_{1/2}$	G-пар нуклеотидов	M_i в долях	N_i
ДНК <i>E. coli</i>	5,45	5,45	$4,2 \cdot 10^6$	1	1
ДНК мыши	—	—	$3,3 \cdot 10^9$	—	—
Уникальная ДНК	4362	2530	$1,96 \cdot 10^9$	0,58	1
Редкие повторы	18	2,7	$2,12 \cdot 10^6$	0,15	250
Средние повторы	0,04	0,006	$4,5 \cdot 10^3$	0,16	13000
Частые повторы	0,008	0,0009	$6,8 \cdot 10^2$	0,11	$5,6 \cdot 10^5$

Примечание. $C_0t_{1/2}^i$ — период полуреассоциации последовательностей в составе тотальной ДНК; $C_0t_{1/2}$ — то же в составе фракции; M_i — доля генома, составляемая данным семейством последовательности; N_i — частота повторения последовательности в геноме.

чали. Полученные показатели реассоциации молекул ДНК отдельных фракций генома мыши оказались достаточно близкими к расчетным данным. На рисунке представлена использованная для фракционирования генома мыши на отдельные кинетические классы окончательная схема, где показаны значения C_0t и доли (%) исходного количества разделенных на оксиапатите одноцепочечных (стрелки) и двухцепочечных (двойные стрелки) молекул.

Согласно схеме фракционирования препарата ДНК ядер клеток мышинной плазматомы МОРС-21, меченных в логарифмической фазе роста на протяжении 18 ч

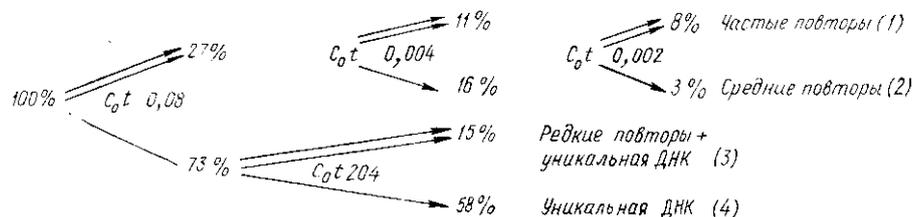


Схема фракционирования ДНК мыши по скорости реассоциации. 1—4 использованы для определения удельной радиоактивности.

Mouse genome fractionation into different kinetic classes of nucleotide sequences

$[^3H]$ тимидином, выделены фракции повторов: 1 — частых, 2 — средних, 3 — редких, содержащих часть уникальной ДНК, а также фракция 4 — уникальной ДНК. Определены удельные радиоактивности каждой из этих фракций. Величины удельных радиоактивностей различных фракций трех фракционирований из одного исходного препарата изучаемой ДНК показаны в табл. 2. Из этих данных следует, что для различных кинетических классов последовательностей ДНК наблюдаются разные значения удельных радиоактивностей.

Такая неравномерность включения радиоактивного предшественника в различные фракции ДНК клеток МОРС-21 может прежде всего отражать различия этих фракций по содержанию GC-пар. Действительно, известно, что при равновесном центрифугировании в ДНК генома мыши выявляются пики основной и сателлитной ДНК, представляющие молекулы, различающимися по содержанию GC-пар [10]. Также известно, что пик сателлитной ДНК, обогащенной AT-парами, представлен высокоповторяющейся ДНК. Таким образом, повышенное включение $[^3H]$ тимидина во фракцию частых повторов ДНК мыши может быть связано с повышенным содержанием аденина в этой фракции. Однако обнаруженное значение удельной радиоактивности данной фракции превышает это значение, ожидаемое на основании известной степени обогащенности ее AT-парами. Это превышение (в среднем на 5%) может отражать либо различия в точности измерения содержания GC-пар описываемой фракции с помощью аналитического центрифугирования и по включению радиоактивного предшественника, либо частичную амплификацию этой фракции при размножении изучаемых клеток.

Что касается средних повторов ДНК мыши, то при равновесном центрифугировании они составляют один и тот же пик с молекулами ДНК уникальной фракции [10—12] и, следовательно, тотальные различия в содержании GC-пар молекул ДНК этих фракций не должны быть существенными. Вместе с тем величина удельной радиоактивности фракции средних повторов генома мыши в условиях описанных опытов

Таблица 2

Сравнение удельной радиоактивности различных фракций нуклеотидных последовательностей генома мыши

Comparison of specific radioactivity of every kinetic class of nucleotide sequences fractionated from mouse genome

№ фракционирования	Удельная радиоактивность ДНК, имп·мин ⁻¹ ·мкг ⁻¹				
	Исходная ДНК	Частые повторы	Средние повторы	Редкие повторы	Уникальная ДНК
1	21112	27082	13937	18300	20058
2	—	26742	12914	19700	19083
3	—	27146	13840	18825	19328

всегда была ниже этой величины для фракции уникальной ДНК (в среднем на 35—40 %). Одно из возможных объяснений этого факта таково, что в части клонков несинхронной популяции какое-то количество позднореплицирующихся средних повторов оказывается недореплицированным, и это становится заметным при измерении удельной радиоактивности этого класса последовательностей, выделенных из тотальной ДНК ядра клеток.

Обнаруженный в настоящей работе факт пониженного включения радиоактивного предшественника синтеза ДНК во фракцию средних повторов, не отличающуюся существенно по содержанию GC-пар от основной массы ДНК ядра клеток мыши, представляет интерес в связи с попытками клонирования и изучения участков эукариотического генома, проявляющих функциональную активность в процессах репликации ДНК клетки *in vivo* и *in vitro*.

BIOSYNTHESIS OF DIFFERENT KINETIC CLASSES OF NUCLEOTIDE SEQUENCES IN PROLIFERATING MOUSE PLASMACYTOMA MOPC-21 CELLS

S. V. Komissarenko, D. I. Lukinov, E. I. Cherepenko

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

MOPC-21 mouse plasmacytoma DNA was labelled *in vivo* during one and a half of cell-cycle period with [³H]-thymidine. This DNA was purified from cell nuclei, sonicated and fractionated on hydroxyapatite on the basis of the reassociation rate. Four kinetic classes of DNA fragments which are highly repetitive, middle repetitive, rare and unique sequences were obtained. All these sequences differed in their specific radioactivity. Highly repetitive sequences had the highest radioactivity as compared to that of the rare and unique sequences. Middle repetitive fragments had the lowest specific radioactivity. Possible reasons for the different level of radioactive thymidine incorporation are discussed.

1. Edenberg H., Huberman J. Eucaryotic chromosome replication // *Ann. Rev. Genet.*—1975.—9.—P. 245—284.
2. Hand R. Eucaryotic DNA organization of the genome for replication // *Cell.*—1978.—15, N 3.—P. 317—325.
3. Changes in gene position are accompanied by a change in time of replication / R. Calza, L. Eckhardt, Th. DelGiudice et al. // *Ibid.*—1984.—36, N 3.—P. 689—696.
4. Replication timing of genes and middle repetitive sequences / M. Goldman, G. Holmquist, M. Gray et al. // *Science.*—1984.—224, N 4650.—P. 686—692.
5. Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона / В. И. Нактинис, И. Е. Малеева, Д. Ф. Санько и др. // *Биохимия.*—1977.—42, № 10.—С. 1783—1789.
6. Прима В. И., Платонов О. М., Газарян К. Г. Анализ реассоциации фракций ДНК крысы // Там же.—1980.—45, № 3.—С. 498—506.
7. Britten R. J., Graham D. E., Neufeld V. N. Analysis of repeating DNA by reassociation // *Meth. Enzymol.*—1974.—29.—P. 363—418.
8. Тарантул В. З., Гольцов В. А., Кузнецова Е. Д. Структурная организация генома эукариот // *Молекуляр. биология.*—М.: ВИНТИ, 1981.—С. 7—83.—(Итоги науки и техники; Т. 19).
9. Черепенко Е. И., Лебедев В. Р. Характеристика ядерной ДНК чешуекрылого насекомого — большой вошчинной моли *Galleria mellonella* с помощью кинетики реассоциации // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 3.—С. 629—635.
10. Bostok C. J., Summer A. T. The eucaryotic chromosome.—Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1980.—525 p.
11. Cech T. R., Hearst J. E. Organization of highly repeated sequences in mouse main-band DNA // *J. Mol. Biol.*—1976.—100, N 3.—P. 227—256.
12. Yamamoto M. Constitutive heterochromatin // Тампакусцу какусан кото.—*Protein, Nucl. Acid Enzyme.*—1981.—26, N 5.—P. 694—712.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 24.07.85