

ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ФОРМИРОВАНИЕ РАЗРЫВОВ В ДНК ПРОНИЦАЕМЫХ КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ

В. Г. Безлепкин, Р. А. Намвар, Т. А. Безлепкина, А. И. Газиев

Введение. Система проницаемых для нуклеотидов клеток эукариот широко используется при изучении репликативного и репаративного синтеза ДНК [1—4], а также АДФ-рибозилирования [2]. Результаты исследований на клетках, сделанных проницаемыми после воздействия ДНК-тропных повреждающих агентов, свидетельствуют о последовательном протекании этапов репарации ДНК, начиная от инцизии нитей ДНК вблизи сайтов повреждения и, по крайней мере, до этапа репаративного ресинтеза [3—5]. Следует, однако, отметить, что эффективность процессов заметно варьирует в зависимости от условий эксперимента [3, 5]. В связи с этим был поставлен вопрос о том, в какой мере процесс репарации, регистрируемый в проницаемых клетках, является отражением репарации, происходящей в интактных клетках [5]. В собственных исследованиях взаимосвязи репарации разрывов ДНК и поли(АДФ-рибозилирования) ядерных белков, проведенных на проницаемых клетках, мы обратили внимание на заметную деградацию ДНК при инкубации проницаемых клеток в реакционной смеси для регистрации ДНК-полимеразной реакции [6]. Аналогичные указания мы встретили и в других работах [5, 7].

В связи с этим целью настоящей работы было изучение взаимосвязи процессов нуклеазной деградации и синтеза ДНК в клетках гепатомы Зайделя, сделанных проницаемыми четырьмя разными способами.

Материалы и методы. Клетки асцитной гепатомы Зайделя отбирали в опыте на 5-й день после внутрибрюшинной перевивки белым беспородным крысам. Проницаемость клеточных мембран для нуклеотидов обеспечивалась обработкой тритоном X-100 [8], твином-80 [9], гипотоническим буфером (ГБ) [10] или дигитонином. В последнем случае клетки суспендировали (до 10^7 кл/мл) в том буфере, в котором проводилась обработка тритоном. Дигитонин добавлялся до 0,005 % из концентрированного раствора в диметилсульфоксиде. После 5 мин инкубации при 37 °С клетки быстро охлаждали, промывали и ресуспендировали в растворе для пермеабиллизации без дигитонина. Увеличение времени инкубации или концентрации дигитонина не приводило к существенному росту уровня синтеза ДНК, но, согласно данным [11], могло быть причиной деструктивных изменений в клетках.

Активность синтеза ДНК в проницаемых клетках ($2 \cdot 10^6$ клеток на пробу) определяли по включению [^3H]ТМФ в кислотонерастворимую фракцию при инкубации клеток в ДНК-полимеразной смеси с [^3H]ТТФ, как описано ранее [6]. В отдельных сериях экспериментов в раствор для получения проницаемых клеток добавляли спермин и спермидин до концентрации 0,15 и 0,5 мМ соответственно. При этом конечная концентрация полиаминов в ДНК-полимеразной смеси была в три раза ниже. Концентрация CaCl_2 и афидиколина составляла 1 мМ и 1 мкг/мл. Облучение клеток ультрафиолетом в дозе 60 Дж/м² проводили под лампой БУВ-30 (преимущественно 254 нм) при мощности дозы 2,3 Дж/м² за 1 с. Седиментационный анализ ДНК проницаемых клеток в градиентах концентрации щелочной сахарозы (ГКЩС, 5—20 %, 5 мл) выполнен по методу [12].

Предварительно клеточную ДНК метили введением крысам внутрибрюшинно [^3H]тимидина (0,56 ТБк/ммоль) в количестве 37 кБк на 1 г веса животных. Клетки лизировали на градиенте 18 ч при комнатной температуре и центрифугировали на роторе SW-50.1 в течение 5 ч при 20 °С и 22 000 об/мин.

Результаты и обсуждение. Кривые, представленные на рис. 1, демонстрируют существенно отличающийся уровень синтеза ДНК, реги-

стрируемый *in vitro* по включению $[^3\text{H}]$ ТМФ в кислотонерастворимый материал проницаемых клеток, полученных разными способами. Для сравнения на рисунке приведена кривая, иллюстрирующая включение метки (или ее прочную адсорбцию) в ДНК клеток, выдержанных перед проведением ДНК-полимеразной реакции в растворе Хенкса, содержащем 20 мМ НЕРЕС-буфер (рН 7,6) в течение 30 мин при 20 °С.

Учитывая результаты опубликованных ранее исследований [1, 2], следует считать, что регистрируемый в проницаемых клетках синтез

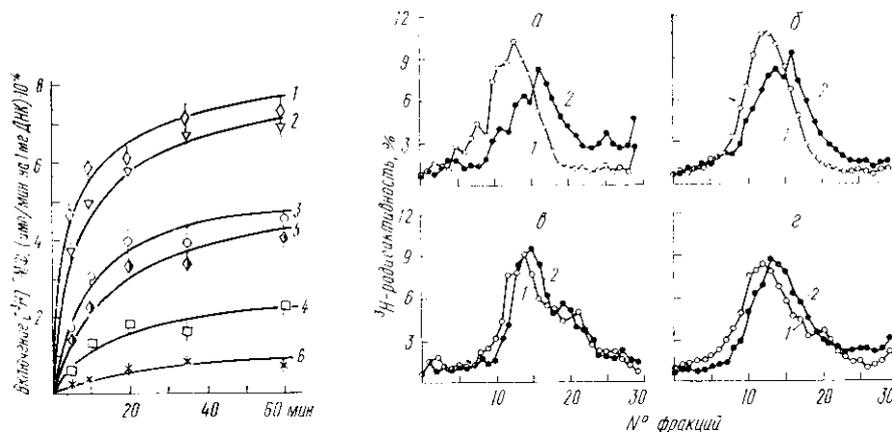


Рис. 1. Включение $[^3\text{H}]$ ТМФ в ДНК клеток асцитной гепатомы Зайделя, сделанных проницаемыми различными способами. Для пермеабилзации клеток были использованы тритон X-100 (1), твин-80 (2), ГБ (3), дигитонин (4), тритон X-100+полиамины (5), раствор Хенкса (6)

Fig. 1. Kinetics of $[^3\text{H}]$ TMP incorporation into DNA of Zajdela hepatoma cells permeabilized by different methods. Triton X-100 (1), Tween-80 (2), hypotonic buffer (3), digitonin (4), Triton X-100+polyamines (5), Hanks solution (6), were used to make the cells permeable for nucleotides

Рис. 2. Седиментация в ГКШС (справа налево) ДНК лизатов клеток гепатомы Зайделя сразу после пермеабилзации (1) и после инкубации в течение 60 мин (2) в ДНК-полимеразной смеси. Проницаемость обеспечивалась обработкой клеток тритоном X-100 (а), твином-80 (б), дигитонином (в) или ГБ (г)

Fig. 2. Alkaline sucrose density gradient sedimentation (from right to left) of DNA from Zajdela hepatoma cells lysed just after permeabilization (1) and after 60 min incubation in the DNA polymerase mixture (2). Cells were permeabilized by the treatment with Triton X-100 (a), Tween-80 (б), digitonin (в) or hypotonic buffer (г)

ДНК отражает без существенных качественных искажений характер синтеза ДНК в интактных клетках. Наблюдаемые различия уровня синтеза ДНК возможно объяснить разной степенью проницаемости мембран для предшественников синтеза ДНК. С другой стороны, в работах с использованием тритона X-100 отмечено, что этот детергент действует не только на клеточную и ядерную мембраны, но и на структуру хроматина и ассоциированные с ним ферментативные активности. Это приводит к высвобождению во внеклеточную среду РНК [13] и белковых факторов [3], а также обуславливает, вероятно, возможность для частичной нуклеазной деградации (инцизии) хромосомной ДНК [7].

В таком случае можно предположить, что в обработанных детергентами клетках инцизия хроматина может быть причиной образования «затравочных» концов в ДНК, пригодных для функционирования ДНК-полимераз, и таким образом повышает уровень регистрируемого синтеза ДНК. Этот добавочный синтез ДНК, по-видимому, следует считать внеплановым, протекающим на одной из комплементарных цепей, в отличие от репликативного синтеза ДНК. Уровень внепланового синтеза, вероятно, будет определяться агентом, использованным для повышения проницаемости мембран, точнее — характером его воздей-

ствия на хроматин. Сходная ситуация ранее была описана для синтеза ДНК, регистрируемого в ядрах гепатоцитов, изолированных в сахарозных растворах в присутствии Ca^{2+} или Mg^{2+} [14]. Для проверки предположения о возможной роли неспецифической нуклеазной инцизии, определяемой свойствами мембранотропных агентов в повышении исходного уровня внепланового синтеза ДНК, мы сравнили характер седиментации в ГКЩС ДНК проницаемых клеток сразу после их получения и после проведения ДНК-полимеразной реакции в течение 60 мин (рис. 2). Видно, что за 60 мин инкубации происходит заметный сдвиг пика седиментационного профиля к вершине градиента в случае клеток, обработанных тритоном X-100 или твином-80. В ДНК клеток, обработанных тритоном, регистрируется появление медленно седиментирующих продуктов деградации в верхней части градиента. Меньше эффект снижения скорости седиментации ДНК в ГКЩС после 60 мин инкубации в ДНК-полимеразной смеси выражен для проницаемых клеток, полученных обработкой низкосолевым буфером или дигитонином. Как раз в этих случаях уровень синтеза ДНК в проницаемых клетках заметно ниже, чем при обработке детергентами. Известно, что дигитонин обеспечивает проницаемость мембран, элиминируя из них комплексы [15], с которыми образует прочные комплексы [15]. При этом характер действия дигитонина на хроматин, вероятно, таков, что в проницаемых клетках не происходит формирования участков повышенной доступности для нуклеаз, которые в процессе инкубации в ДНК-полимеразной смеси реализуются в «затравочные» концы для инициации синтеза ДНК. Можно думать, что исходный уровень повреждений хромосомной ДНК обусловлен в этом случае в основном гидродинамическим фактором.

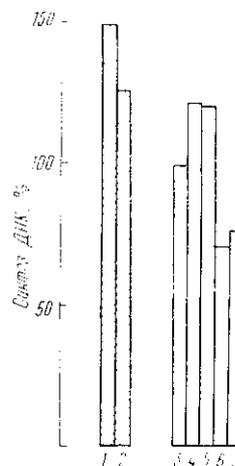
Таким образом, результаты проведенных экспериментов демонстрируют зависимость уровня синтеза ДНК от степени фрагментации хромосомальной ДНК. Это дает основание полагать, что разные методы получения проницаемых клеток по-разному сказываются на состоянии хроматина и, в частности, на доступности для эндогенных нуклеаз в процессе инкубации в условиях, обеспечивающих синтез ДНК. Это положение подтверждается еще двумя фактами. Во-первых, если пермеабиллизировать клетки тритоном X-100 в присутствии спермина и спермидина и добавлять эти полиамины в ДНК-полимеразную реакционную смесь, то уровень регистрируемого синтеза снижается в 1,5—1,7 раза (рис. 1). Полагают, что полиамины прочно связываются с фосфатными группами в ДНК [16], стабилизируя ее структуру и, вероятно, защищают ее от нуклеазной деградации. Поэтому наблюдаемый эффект понижения уровня синтеза ДНК можно рассматривать как иллюстрацию защиты полиаминами определенных участков в ДНК, которые были доступны нуклеазной атаке в клетках, обработанных тритоном X-100. Во-вторых, добавление в ДНК-полимеразную смесь Ca^{2+} до концентрации 1 мМ существенно повышает уровень синтеза ДНК в клетках, обработанных тритоном X-100, но не ГБ (рис. 3). Это можно интерпретировать как наличие в клетках, обработанных детергентом, значительного количества сайтов, которые доступны инцизии Ca^{2+} -зависимой нуклеазой. Образующиеся концы могут служить затравкой для функционирования ДНК-полимеразы. Полиамины, добавленные в среду пермеабиллизации с тритоном, частично защищают ДНК от действия Ca^{2+} -зависимых нуклеаз, уменьшая прирост Ca^{2+} -стимулируемого синтеза примерно на половину (149 ± 6 и 126 ± 8 % соответственно, различия достоверны при $P=0,05$). В клетках, обработанных низкосолевым буфером, таких нуклеазочувствительных мест при добавлении Ca^{2+} практически не обнаруживается (рис. 3).

Следует, вероятно, думать, что Ca^{2+} -зависимая активация синтеза ДНК отражает в основном неспецифическую нуклеазную инцизию. Мы пытались обнаружить синтез ДНК, стимулируемый УФ-излучением, для активации которого необходима работа специфических эндонуклеаз [4]. В экспериментах, где проницаемые клетки получены с помощью

ГБ, через 10 мин инкубации при 37 °С после УФ-облучения в дозе 60 Дж/м² (рис. 3) прирост синтеза по сравнению с контрольными клетками составлял 21±5 % (различия достоверны при P=0,1). Добавка Ca²⁺ практически не влияла на эту величину. В наших экспериментах прирост синтеза ДНК в клетках, пермеабилizованных низкосолевым буфером после УФ-облучения, практически полностью подавлялся афидиколном. Это согласуется с представлениями о существенной роли

Рис. 3. Влияние различных факторов на уровень синтеза ДНК в клетках асцитной гепатомы Зайделя, сделанных проицаемыми обработкой тритоном X-100 или ГБ: 1 — тритон X-100+Ca²⁺; 2 — (тритон X-100+полиамины)+Ca²⁺; 3 — ГБ+Ca²⁺; 4 — УФ+ГБ; 5 — УФ+ГБ+Ca²⁺; 6 — ГБ+афидиколлин; 7 — УФ+ГБ+афидиколлин. За 100 % принят уровень синтеза ДНК в контрольных проицаемых клетках (без облучения и без дополнительных добавок), полученных обработкой тритоном X-100 или ГБ соответственно

Fig. 3. Effects of different factors on the DNA synthesis level in Zajdela hepatoma cells made permeable by the treatment with Triton X-100 or hypotonic buffer (HB): 1 — Triton X-100+Ca²⁺; 2 — (Triton X-100+polyamines)+Ca²⁺; 3 — HB+Ca²⁺; 4 — UV+HB; 5 — UV+HB+Ca²⁺; 6 — HB+aphidicolin; 7 — UV+HB+aphidicolin. The DNA synthesis level in control permeable cells (without irradiation and without any additions), prepared by the treatment with Triton X-100 or hypotonic buffer, respectively, is taken as 100 %



ДНК-полимеразы α в обеспечении УФ-индуцированного синтеза ДНК [4]. Низкий уровень УФ-стимулируемого внепланового синтеза ДНК по сравнению с описанным на проицаемых клетках человека, возможно, обусловлен дефицитом УФ-специфических эндонуклеаз в клетках грызунов [7]. Не исключено, однако, что регистрация внепланового синтеза затруднена вследствие относительно высокого уровня синтеза ДНК, обусловленного повреждением хроматина неспецифическими нуклеазами.

Таким образом, основным итогом настоящей работы является демонстрация зависимости уровня синтеза ДНК в проицаемых клетках асцитной гепатомы Зайделя от степени поврежденности хромосомальной ДНК, которая определяется в существенной мере способом пермеабилизации клеток. Это обстоятельство может быть определяющим при выборе метода получения проицаемых клеток, особенно в экспериментах, имеющих целью регистрацию внепланового синтеза ДНК и изучение его особенностей, а также исследование репарации повреждений ДНК, протекающих с участием инцизионных нуклеаз. Предпочтительным в этом случае следует считать методы пермеабилизации клеток без применения детергентов, действующих на липопротеидный комплекс хроматина.

THE DNA POLYMERASE ACTIVITY AND FORMATION OF STRAND BREAKS IN DNA OF ZAJDELA ASCITES HEPATOMA CELLS PERMEABILIZED BY DIFFERENT METHODS

V. G. Bezlepkin, R. A. Namvar, T. A. Bezlepkina, A. I. Gaziev

Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

Zajdela hepatoma cells were permeabilized for nucleotides by the treatment with digitonin, hypotonic buffer, Tween-80 or Triton X-100. The dependence of the DNA breakage amount and the level of [³H]TMP-incorporation into the cell DNA on the type of the

used membrane damaging agent was shown when incubating the permeable cells in the DNA polymerase mixture. There is reason to believe that various agents providing permeability of cell wall produce a different effect on chromatin increasing availability of DNA for attacks of endogenous nucleases. The formed DNA breaks induce the unscheduled DNA synthesis and increase the total level of the DNA polymerase activity in permeable cells. Thus, to investigate the DNA repair on the permeable cells the methods of cell permeabilization providing the minimal initial level of chromatin damage should be used.

1. Seki S., Oda T. DNA synthesis in detergent-treated mouse ascites sarcoma cells // *Biochim. et biophys. acta.*—1977.—476, N 1.—P. 24—31.
2. Berger N. A., Weber G., Kaichi A. S. Characterization and comparison of poly(adenosine diphosphoribose) synthesis and DNA synthesis in nucleotide permeable cells // *Ibid.*—1978.—519, N 1.—P. 87—104.
3. Patel P., Myers C. A., Miller M. R. Identification of mammalian DNA repair factors using a reconstituted subcellular system. Partial characterization and subcellular location of DNA-repair-stimulating protein in hamster cells // *Exp. Cell Res.*—1983.—149, N 2.—P. 347—358.
4. Dresler S. Z. Comparative enzymology of ultraviolet-induced DNA repair synthesis and semiconservative DNA replication in permeable diploid human fibroblasts // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 22.—P. 13947—13952.
5. Kaufmann W. K. DNA synthesis *in vitro* in human fibroblast preparations // *Biochim. et biophys. acta.*—1983.—740, N 3.—P. 223—230.
6. Намвар Р. А., Безлекин В. Г., Газиев А. И. Исследование взаимосвязи поли(АДФ-рибозилирования) белков с формированием и репарацией односторонних разрывов ДНК в γ -облученных прощиваемых клетках гепатомы Зайделя // *Радиобиология.*—1986.—26, № 5.—С. 664—668.
7. Yarosh D. B., Setlow R. B. Permeabilization of ultraviolet-irradiated Chinese hamster cells with polyethylene glycol and introduction of ultraviolet endonuclease from *Micrococcus luteus* // *Mol. and Cell. Biol.*—1981.—1, N 3.—P. 237—244.
8. Berger N. A., Johnson E. S. DNA synthesis in permeabilized mouse L-cells // *Biochim. et biophys. acta.*—1976.—425, N 1.—P. 1—17.
9. Billen D., Olson A. C. DNA replication in Chinese hamster ovary cells made permeable to nucleotides by tween-80 treatment // *J. Cell. Biol.*—1976.—69, N 3.—P. 732—736.
10. Edwards M. J., Kaufmann W. K. Replicative DNA synthesis in permeable fibroblasts from normal individuals and ataxia-teleangiectasia patients // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—721, N 2.—P. 223—225.
11. Structural changes of isolated hepatocytes during treatment with digitonin / G. A. Cook, V. H. Gattone, A. P. Evan, R. A. Harris // *Ibid.*—1983.—763, N 3.—P. 356—367.
12. McGrath R. A., Williams R. W. Reconstruction *in vivo* of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid: the rejoining of broken pieces // *Nature.*—1966.—212, N 5061.—P. 534—535.
13. Thelestam M., Mölby R. Effects of bacterial phospholipases on cell membranes // *Infect. and Immun.*—1973.—12, N 2.—P. 225—232.
14. Burgoyne Z. A., Hewish D. R. The regular substructure of mammalian nuclei and nuclear Ca-Mg endonuclease // *Cell nucleus. Chromatin.*—New York et al.: Plenum press, 1978.—Vol. 4, pt A.—P. 47—74.
15. Scallen T. J., Dieterl S. E. The quantitative retention of cholesterol in mouse liver prepared for electron microscopy by fixation in a digitonin-containing aldehyde solution // *J. Cell. Biol.*—1969.—40, N 3.—P. 802—813.
16. Sakai T. T., Colne S. S. Effects of polyamines on the structure and reactivity of tRNA // *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1976.—17.—P. 15—42.

Ин-т биол. физики АН СССР, Пушкино

Получено 08.10.86