

Н. В. Белякова, Т. П. Кравецкая, С. Н. Вальтер,  
Е. В. Полевая, И. В. Шевелев, В. М. Крутяков

## ИНДУКЦИЯ ЭНДОГЕННОГО СИНТЕЗА ДНК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕМБРАНЫ ЯДЕР, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕДЕЛЯЮЩИХСЯ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ

*Установлено, что обработка тритоном X-100 ядер, выделенных из неделящихся гепатоцитов крысы, сопровождается удалением наружной ядерной мембраны и приводит к активации эндогенного синтеза ДНК в 20—30 раз. Результаты нескольких независимых методических подходов для анализа продуктов синтеза показывают, что индуцированный синтез не является следствием инициации репликации ДНК. По-видимому, наблюдается ускорение эндогенной элонгации ДНК, катализируемое ДНК-полимеразой  $\alpha$ . Обработанные тритоном X-100 ядра могут быть использованы как эффективная природная матричная система для измерения  $\alpha$ -полимеразного синтеза у млекопитающих, проницаемая для биополимеров.*

**Введение.** Для изучения молекулярных механизмов и регуляции биосинтеза ДНК у млекопитающих применяются бесклеточные системы, проницаемые для нуклеотидов и макромолекул. Наиболее нативной системой являются изолированные неочищенные клеточные ядра. Уровень эндогенного синтеза ДНК в таких ядрах, выделенных из неделящихся гепатоцитов, очень мал. Использование регенерирующей печени (S-период) позволяет увеличить скорость синтеза в 2—11 раз [1—3]. Плохая воспроизводимость ускорения элонгации ДНК в ядрах при переходе от  $G_0$  к S-периоду клеточного цикла, по-видимому, объясняется различной степенью поврежденности ядерной мембраны в процессе гомогенизации и обработки неионным детергентом. Действительно, самые различные способы повреждения мембраны ядер, выделенных из неделящихся ооцитов амфибий, ведут к повторной инициации репликации ДНК в изолированных ядрах [4].

В настоящей работе впервые показано, что повреждение мембраны ядер, выделенных из покоящихся гепатоцитов, приводит к резкой активации эндогенного синтеза ДНК. Изучена природа этого синтеза.

**Материалы и методы.** В опытах использовали самцов белых беспородных крыс весом 120—170 г (усыпляли эфиром).

Применяли сефарозу CL-6B («Pharmacia», Швеция), 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) («Loba Chemie», Австрия), нитроцеллюлозные фильтры («Синпор», ЧСФР), тритон X-100 и Хехст 33258 («Serva», ФРГ), N-этилmaleимид («Sigma», США), [ $^3H$ ]dNTP («Изотоп», СССР), dNTP, ДНК лосося, ДНК фага  $\lambda$  и ДНК-лигазу T4 (НИКТИ БАВ, Бердск). Дрожжевая тРНК предоставлена В. И. Махно, белок SSB из *Escherichia coli* — О. К. Кабоевым, диаденозинтетрафосфат ( $Ar_4A$ ) — Н. Б. Тарусовой.

Ядра получали при 4 °С. 3,5 г печени гомогенизировали в 40 мл среды (0,25 М сахароза, 3 мМ  $MgCl_2$ , 50 мМ буфер трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ 2-МЭ), в стеклянном гомогенизаторе Даунса (20 циклов). Гомогенат фильтровали через 8 слоев марли и центрифугировали при 6000 g 10 мин. Ядерный осадок ресуспендировали, добавив 1 мл раствора А (25 мМ буфер трис-HCl, pH 7,4, 25 мМ KCl, 5 мМ  $MgCl_2$ , 20 мМ 2-МЭ, 0,5 %-ный ПЭГ (6000), 20 %-ный глицерин), и использовали как препарат неочищенных ядер. К осадку неочищенных ядер добавляли 5 мл раствора А, содержавшего 1 %-ный тритон X-100 (тритоновая среда), гомогенизировали (15 циклов) и оставляли на 30 мин во льду для экстракции. Затем центрифугировали при 8000 g 30 мин, супернатант отбрасывали. Для отмывки ядер от детергента к осадку добавляли 5 мл раствора А, гомогенизировали (10 циклов) и центрифугировали в том же режиме. Осадок забирали,

ресуспендировали в 1 мл раствора А и использовали как препарат очищенных ядер.

**ДНК-полимеразная активность.** Инкубационная смесь в объеме 100 мкл содержала 5—10 мМ АТР; 150 мкМ СТР, ГТР, УТР; 150 мкМ dАТР, dСТР, dГТР; 30 мкМ [<sup>3</sup>H]ТТР (185—370 кБк); 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,5; 10 мМ 2-МЭ; 10—25 мкг ядер (по ДНК). Синтез при 37 °С останавливали добавлением 1 мл лизирующего раствора (0,1 М NaOH, 0,25 М NaCl, 10 мМ ЭДТА, 0,5 %-ный додецилсульфат Na (DS-Na), 1 %-ный пиррофосфат Na,

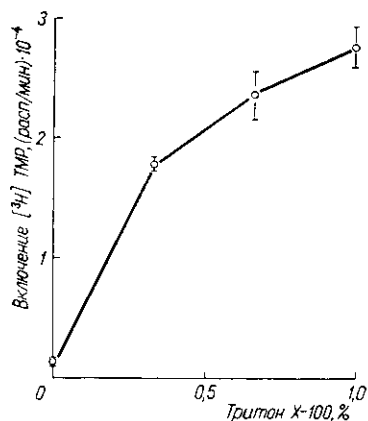


Рис. 1

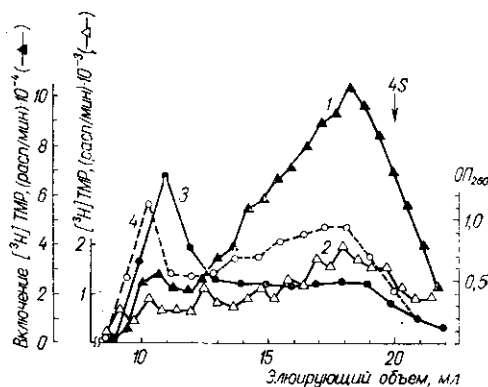


Рис. 2

0,2 мМ тимидин). После лизиса ядер прибавляли 2,5 мл 10 %-ной ТХУ, наносили на нитроцеллюлозный фильтр и отмывали от невключившегося [<sup>3</sup>H]ТТР.

Электронную микроскопию ультратонких срезов ядер проводили по методу, описанному в работе [5].

Концентрацию ДНК определяли по Шмидту и Тангаузеру [6] и с дифениламином [7].

**Результаты и обсуждение.** Скорость эндогенного синтеза ДНК в очищенных ядрах возрастает в 20—30 раз по сравнению с неочищенными (рис. 1: уровень синтеза ДНК за 30 мин инкубации в ядрах, обработанных средой с различным содержанием тритора X-100; рис. 2: гель-фильтрация лизированных ядер на колонке с сефарозой CL-6В. Состав элюирующего раствора: 0,25 %-ный DS-Na, 0,1 М NaOH, 0,25 М NaCl (или без него), 10 мМ ЭДТА, рН 12,5. Объем колонки 30 мл. Наносили 1 мл, содержащий ~400 мкг ДНК: 1 — включение [<sup>3</sup>H]ТМР в кислотонерастворимую ДНК очищенных ядер; 2 — то же для неочищенных ядер; 3 — распределение ОП<sub>260</sub> для очищенных ядер; 4 — то же для неочищенных ядер). Скорость включения [<sup>3</sup>H]ТМР линейно зависит от концентрации ДНК ядер в диапазоне 0—400 мкг/мл. Варьирование концентрации ТТР (1—30 мкМ) существенно не изменяет величины ускорения синтеза, т. е. ускорение не объясняется увеличением проникновения dNTP в очищенные ядра. Синтез ДНК в очищенных ядрах в первые 10 мин инкубации в присутствии 150 мкМ СТР, ГТР, УТР в 1,5—1,7 раза выше, чем без них, даже в отсутствие АТР. Синтез в неочищенных ядрах в отсутствие АТР прекращается в первые минуты инкубации, поскольку в ядрах и хроматине содержится высокоактивная нуклеозидтрифосфатаза, расщепляющая все dNTP и NTP [8, 9]. Повторное добавление всех нуклеотидов, указанных в составе инкубационной среды, через 20 мин инкубации неочищенных ядер позволяет продлить приблизительно линейный период синтеза до 40 мин. Если то же самое сделать через 1 ч инкубации очищенных ядер, то синтез продлится до 2 ч; дальнейшие добавки нуклеотидов не сопровождаются увеличением синтеза, а через 4 ч после начала опыта на-

чинается гидролиз вновь синтезированной ДНК (рис. 3: кинетика эндогенного синтеза ДНК в очищенных ядрах гепатоцитов: 1 — синтез при стандартном составе инкубационной среды; 2 — синтез при добавлении АТР и всех dNTP в концентрациях, приведенных в составе инкубационной среды; стрелками указано время добавок).

В обоих препаратах ядер синтез подавляется на 95 % в присутствии 10 мМ N-этилмалеимида, т. е. синтез катализируется ДНК-полимеразой  $\alpha$ , а не  $\beta$ . При переходе гепатоцитов от  $G_0$  к S-периоду синтез ДНК в неочищенных ядрах возрастает в 1,5—2 раза, тогда как в очищенных — в 2—3,5 раза (характерно для экспрессии  $\alpha$ -полимеразы).

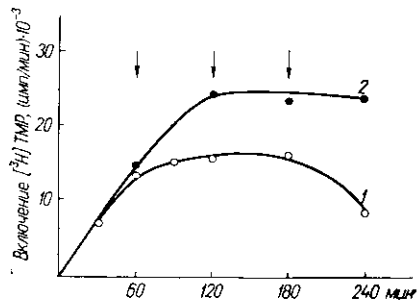


Рис. 3

Добавление 1 %-ного тритона X-100 не влияет на активность ДНК-полимеразы  $\alpha$ , экстрагированной раствором А из неочищенных ядер, в присутствии экзогенной ДНК-матрицы. Обработка тритоновой средой приводит к вымыванию из ядер 50 % связанной с ними ДНК-полимеразы  $\alpha$ . Однако удаление тритонového смыва или добавление цитозола существенно не влияют на величину активации эндогенной ДНК-полимеразной активности ядер.

Наличие в инкубационной смеси белка *SSB E. coli* (30—300 мкг/мл) или  $Ar_4A$  (10—30 мкМ) — возможного индуктора инициации репликации — не влияло на синтез ДНК в очищенных ядрах.

Световая микроскопия ядер, окрашенных по Романовскому, — Гимза или Хехст 33258, указывает на неизменность количества ядер в поле зрения до и после их обработки тритоновой средой. Данные, представленные на рис. 4 (электронная микроскопия срезов неочищенных (а) и очищенных (б) ядер ( $\times 24\ 000$ )), показывают, что эта обработка сопровождается удалением наружной ядерной мембраны и конденсацией хроматина. Лизис очищенных ядер по [10] существенно не влияет на эндогенный синтез ДНК, причем только 25 % его величины приходится на долю водонерастворимого хроматина, в котором преимущественно локализуется ДНК-полимераза  $\beta$ .

Индукцированный синтез ДНК может быть следствием инициации репликации или ускоренного заполнения однонитчатых пробелов в ДНК. Для решения этого вопроса проведен анализ продуктов синтеза. Если после синтеза ядра лизировать или выделить из них ДНК, а затем провести гель-фильтрацию в щелочных условиях, то наибольшая удельная радиоактивность ДНК обнаруживается в зоне приблизительно 4S, где локализуются фрагменты Оказаки и (или) продукты репаративного синтеза (см. рис. 2). Обработка тритоновой средой, как и процесс инкубации ядер, не приводит к деградации ядерной ДНК (см. рис. 2). Матричные свойства ДНК, выделенной из тритонového экстракта ядерной мембраны (примембранная ДНК), из очищенных и неочищенных ядер (общая ДНК), а также ДНК фага  $\lambda$  и лососевой ДНК существенно не различаются, если вести синтез ДНК-полимеразой  $\alpha$  из ядерной мембраны. Следовательно, обработка ядер тритоновой средой не сопровождается увеличением количества праймирующих 3'ОН-концов в ДНК.

В случае инициации репликации фрагменты Оказаки появляются в начале синтеза, а затем объединяются в длинные цепи. Исследуя продукты синтеза за время инкубации от 0,5 до 120 мин, мы не заметили подобной закономерности. Добавление в момент синтеза экзогенной ДНК-лигазы Т4 (300 ед/мл) не изменяло картины. Более того, распределение по молекулярной массе меченых продуктов односубстратного синтеза (когда в среде присутствует только один из четырех dNTP, т. е. синтез длинных цепей невозможен) не отличается от опыта с полной субстратной средой.

При ультрацентрифугировании ДНК в нейтральном градиенте плотности CsCl не обнаружено утяжеления ядерной ДНК, если синтез вели, заменив dСТР на Hg<sup>+</sup>-dСТР.

Инициация репликации сопровождается выплыванием при 55 °С продуктов инициации из АТ-богатых участков начала репликации [11]. В попытке обнаружить инициацию репликации ядрам обеспечивали

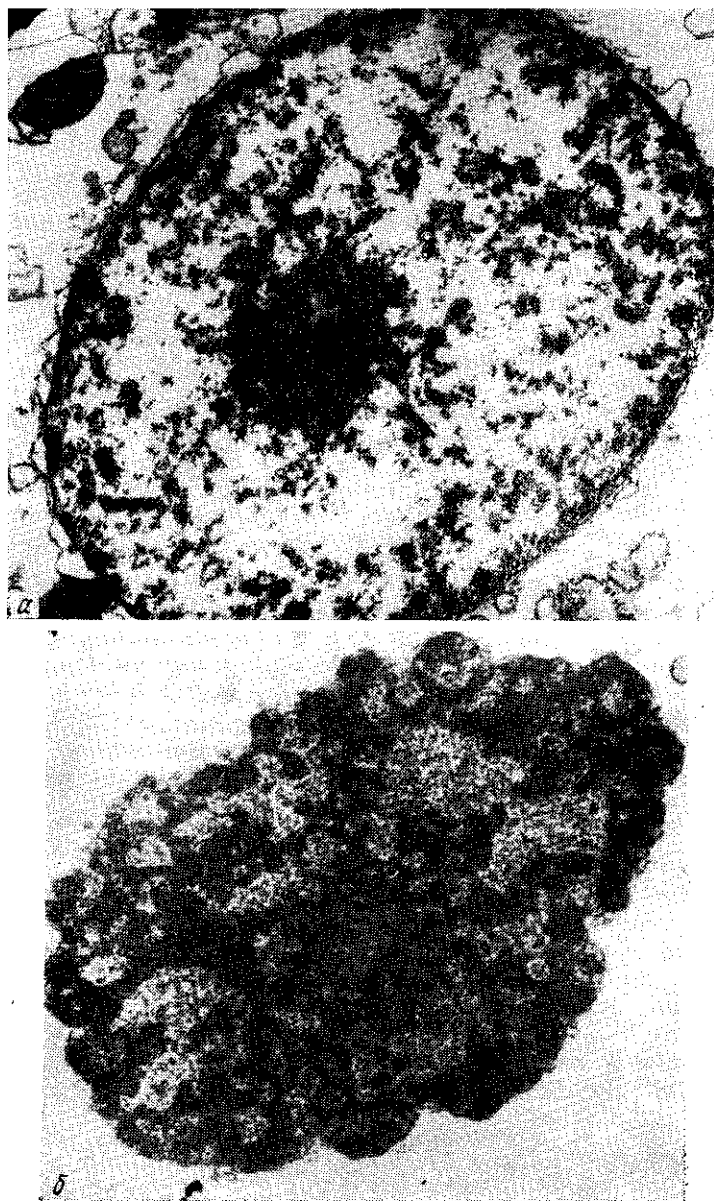


Рис. 4

возможность синтезировать ДНК в течение 1 или 120 мин в полной субстратной среде в присутствии [<sup>3</sup>H]ТТР. Затем из ядер выделяли ДНК и выдерживали ее в течение ночи при 55 или 4 °С в растворе 0,3 М NaCl, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ буфер трис-HCl, pH 7,4. После гель-филтрации такой ДНК на колонке с сфарозой CL-6В в этом же растворе при 20 °С не обнаруживается продукт инициации репликации ДНК.

Известно, что воздействие ионизирующим излучением приводит к подавлению инициации репликации ДНК [2]. Однако  $\gamma$ -облучение ядер <sup>60</sup>Со в дозе 10 крад не изменяло величины активации синтеза ДНК.

Итак, результаты целого ряда независимых методических подходов показывают, что эндогенный синтез ДНК, индуцированный тритоновой обработкой ядер, не является следствием инициации репликации ДНК. По-видимому, мы наблюдаем ускоренное заполнение однонитчатых пробелов в примембранной ДНК, катализируемое ДНК-полимеразой  $\alpha$ . Максимальный уровень синтеза ДНК, регистрируемый нами в очищенных ядрах, составляет 0,1 % от количества предсуществующей ядерной ДНК.

Некоторые фосфолипиды (в особенности кардиолипиды) являются сильными ингибиторами очищенной ДНК-полимеразы  $\alpha$ , причем ингибирование снимается в присутствии тритона X-100 [12]. Возможно, это одна из причин наблюдаемого нами резкого ускорения эндогенной элонгации ДНК в очищенных ядрах.

Таким образом, в работе показано, что обработанные тритоном X-100 ядра представляют собой эффективную систему для измерения  $\alpha$ -полимеразного синтеза на природной матрице у млекопитающих. С помощью этой системы можно изучать действие различных экзогенных препаратов  $\alpha$ -полимеразы и ее комплексов (если подавить собственную ДНК-полимеразу  $\alpha$ ) и других веществ, которые не могут проникать через клеточную и интактную ядерные мембраны.

Авторы благодарны З. Ф. Карабановой, А. Н. Логуновой и Ю. В. Попову за помощь в экспериментах.

#### Резюме

Встановлено, що обробка тритоном X-100 ядер, виділених із гепатоцитів криси, які не діляться, супроводжується видаленням зовнішньої мембрани та приводить до активації ендогенного синтезу ДНК в 20—30 разів. Результати декількох незалежних методичних підходів до аналізу продуктів синтезу показують, що індукований синтез не є наслідком ініціації реплікації ДНК. Можливо, спостерігається прискорення ендогенної елонгації ДНК, що каталізується ДНК-полімеразою  $\alpha$ . Оброблені тритоном X-100 ядра можуть бути використані як ефективна природна матрична система, крізь яку проникають біополімери, для вимірювання  $\alpha$ -полімеразного синтезу ссавців.

#### Суммагу

Triton X-100 treatment of nuclei isolated from rat hepatocytes is shown to remove outer nuclear membrane and leads to the activation 20—30-fold of endogenous DNA synthesis. Results of a number of independent approaches in the analysis of products of the synthesis prove that induced synthesis is not the consequence of the initiation of DNA replication. Perhaps, we observe the acceleration of endogenous DNA elongation catalyzed by DNA polymerase  $\alpha$ . Nuclei treated with triton X-100 can be used as effective natural template system (permeable for biopolymers) for the measurement of mammalian DNA synthesis catalysed by DNA polymerase  $\alpha$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lynch W. E., Surrey S., Lieberman I. Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver // J. Biol. Chem.— 1975.— 250, N 20.— P. 8179—8183.
2. Synthesis of deoxyribonucleic acid by isolated liver nuclei / W. E. Lynch, R. F. Brown, T. Umeda et al. // Ibid.— 1970.— 245, N 15.— P. 3911—3916.
3. Lynch W. E., Lieberman I. A DNA polymerase in liver nuclei whose activity rises with DNA synthesis after partial hepatectomy // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1973.— 52, N 3.— P. 843—849.
4. Blow J. J., Laskey R. A. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle // Nature.— 1988.— 332, N 6164.— P. 546—548.
5. Бульдяева Т. В., Кузьмина С. Н., Збарский И. Б. Белковый состав матрикса и остаточного белка ядер печени и гепатомы-27 крысы. // Докл. АН СССР.— 1978.— 241, № 6.— С. 1461—1464.
6. Schmidt G., Trannhauser I. J. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues // J. Biol. Chem.— 1945.— 161, N 1.— P. 83—89.

7. Химия и биохимия нуклеиновых кислот.— Л.: Медицина, 1968.— 430 с.
8. Белякова Н. В., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Механизм активирующего действия АТР на репаративный синтез ДНК в хроматине // Молекуляр. биология.— 1980.— 14, № 3.— С. 586—594.
9. Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Неспецифическая кислая нуклеозидтрифосфатаза цитозоля и хроматина печени крысы: частичная очистка и основные свойства // Биохимия.— 1982.— 47, № 4.— С. 569—574.
10. Крутяков В. М., Кравецкая Т. П. Эндогенный синтез ДНК в выделенном хроматине // Молекуляр. биология.— 1978.— 12, № 3.— С. 654—662.
11. Zannis-Hadjopoulos M., Chepelinsky A. B., Martin R. G. Mapping of the 3'-end positions of SV nascent strands // J. Mol. Biol.— 1983.— 165, N 4.— P. 599—607.
12. Yoshida S., Tamiya-Koizumi K., Kojima K. Interaction of DNA polymerases with phospholipids // Biochim. et biophys. acta.— 1989.— 1007, N 1.— P. 61—66.

Ленинград. ин-т ядер. физики  
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 11.02.91

УДК 575.155:575.224.46

С. М. Ландау, А. В. Тихонов, И. С. Варзанова, Л. Г. Жарова

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПЛИКАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ РАЙОН ВИРУСА SV40, В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Предложен метод выявления функциональной активности эукариотического регуляторного района вируса SV40 в составе рекомбинантных плазмид, который может быть применен при тестировании плазмид, используемых в генной терапии. Показано, что исследованные рекомбинантные плазмиды реплицируются в культурах клеток CV1 и, следовательно, содержат функционально активный эукариотический регуляторный район вируса SV40.*

**Введение.** Одной из основных задач генной терапии является конструирование векторов и изучение их биологической активности (репликации и экспрессии) в культурах клеток млекопитающих до их использования в модельных опытах на животных. В связи с этим представляет интерес исследование репликативной активности рекомбинантных плазмид, содержащих эукариотический регуляторный район, в частности, регуляторный район вакуолизирующего вируса SV40. Анализ репликации таких рекомбинантных плазмид дает возможность сделать заключение о функциональной активности регуляторного района этого эукариотического вектора. Кроме того, известно, что реплицирующиеся ДНК являются преимущественной матрицей для транскрипции. Таким образом, оптимизируя условия репликации плазмид, содержащих ориджин SV40, можно, по-видимому, оптимизировать и экспрессию генов, находящихся под промотором SV40.

Известно, что рекомбинантные плазмиды, содержащие в качестве ориджина репликации регуляторный район SV40, не могут самостоятельно реплицироваться в перmissive для SV40 культурах обезьяньих клеток ввиду отсутствия Т-антигена (за исключением COS клеток, в которых Т-антиген синтезируется). В то же время даже наличие гена А-белка (Т-антигена SV40) в *цис*-положении в составе рекомбинантных плазмид также не приводит к их репликации из-за наличия «ядовитых последовательностей» [1].

Ранее нами было показано, что рекомбинантные плазмиды, в состав которых входили один и два полных генома вируса SV40, реплицируются в культурах перmissive клеток CV1 в присутствии вируса

© С. М. ЛАНДАУ, А. В. ТИХОНОВ, И. С. ВАРЗАНОВА, Л. Г. ЖАРОВА, 1991