

нейрохимия.

т. 7, № 1, 1988

YAK 576.3:612.8.015.577.391

РЕПАРАЦИЯ ДНК В УФ-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

МАНУКЯН К. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что в УФ-облученных линнях клеток нейребластамы и фибробластои мышы наблюдлются некоторые различия в способности к репарации дочерней нити ДНК в клетках нейробластомы эффективность пострепликативной репарации (ПРР) ДНК выше, но они, в отличие от фибробластов, не способны к беспрепятственному синтезу ДНК на поврежденной матрице через некоторое время после действия УФ.

Результаты по ПРР ДНК в каждой из исследеванных линий согласуются с гипотезой образования «пробелов». Данные по синтезу ДНК в обход повреждений свидетельствуют о ренарациозной придоде этого процесса, имеющего значение для жазнеспособности клеток.

Установлено, что с нарушением процессов репарации и репликации ДНК в клетках человека связано возникновение тяжёлых наследственных заболеваний, спонтанный и индуцированный канцерогенез и. возможно, старение организма [1-3]. В настоящее время доказано, что эффективность эксцизионной репарации пиримидиновых димеров (ЭРПД) определяет резистентность клеток человека к УФ-свету. Клетки млекопитающих обладают неодинаковой способностью выщеплять пиримидиновые димеры [1, 4, 5]. Выявлены линии клеток грызунов, в которых этот механизм практически не функционирует. Уровень УФ-резистентности этих клеток определяется вкладом другого процесса ПРР ДНК. Вопрос о молекулярных механизмах ПРР ДНК, се генетического контроля и биологической значимости в клетках зукариот не решен окончательно [6-10]. Не ясна также природа феномена беспрепятственного синтеза ДНК на поврежденной матрице через некоторое время после воздействия ДНК-тропными агентами или обхода повреждений (ОП) [11, 12]. Еше менее изучена репарация ДНК в дифференцированных клетках [1, 2, 13].

Целью данной работы было исследование состояния систем репарации ДНК в УФ-облученных клетках нейробластомы в сравнении с фибробластами и сопоставление полученных результатов с данными по летальному действию УФ-света на эти клетки. Работу проводили на культурах клеток нейробластомы (субклон N-2a опухоли С-1300) и фибробластов (линия L₉₂₉) мыши. Клетки культивировали на среде Игла с 10%-ной сывороткой крови крупного рогатого скота. УФ-облучение проводили в монослое в кварцевых флаконах с помощью лампы БУФ-60 (2.=254 нм). Летальное действие УФ-света определяли по критерию образования колоний [14].

ЭРПА. ПРР и ОП исследовали методом седиментации ДНК в изокинетических градиентах сахарозы [15]. ЭРПД определяли с использованием УФ-эндонуклеазы из M. luleus [16]. Клетки, меченные в течение 2 суток [³H]тимидином (10 мкКи/мл), облучали УФ и далее инкубировали при 37°. Снятые со стекла клетки ресуспензировали в пронииаемой смеси (0,1 н. NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 7,6; 1%-ный саркозил, 0,1 мг/мл проназы К, 0,05%-ный тритон Х-100). Обработку ферментом проводили в течение 30 мнн. При исследовании ПРР клетки в логарифмической фазе роста облучали УФ и импульснометили [³H]тимидином (15 мкКи/мл, 60 мин), инкубировали при 37° с добавлением немеченого тимидина (5 мг/мл). При ОП импульсную метку вводили через 3 и 18 ч после УФ облучения. Лизис клеток продолжался 60-90 мин [17]. Во избежание аномалий седиментации ДНК лизаты клеток облучали у-лучами в дозе 2 крад., центрифугировали на L2-65 B («Beckman», CIIIA), ротор ультрацентрифуге SW-65. V=32000 об/мин. 90 мин. 20° при исследовании ЭРПД и ротор SW-50.1. V=38000 об/мин, 90 мин, 20° при исследовании ПРР и ОП. Градиситы фракционировали по времени на бумажные фильтры FN-12. Радноактивность подсчитывали в стандартном толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Beckman IS-8100» (США). Константы седиментации рассчитывали по Noll [15], а величины М, для каждой фракции-по Studier [18], средневесовую величину М, определяли, используя фор-MVAV:

$$M_r = \Sigma f_i M_i / \Sigma f_i$$

где: fi — радиоактивность i-фракции, Мi-М, i-фракции.

Относительное снижение—µ-М, ДНК клеток после УФ-облучения оценивали по формуле: µ=[(M_r)_k--(M_r)_a]/[(M_r)_k] 100%, где (M_r)_k и (M_r)_a--средневесовые значения M, ДНК необлученных и поврежденных клеток.

Эффективность восстановления (Эв) рассчитывали по формуле:

$$\Im_{B} = [(M_{r})_{B} - (M_{r})_{u}] [(M_{r})_{k} - (M_{r})_{u}] \cdot 100\%,$$

где $(M_r)_B - M_r$ ДНК поврежденных клеток после инкубации. Среднее число разрывов на единицу M_r ДНК: $\lambda = 2[1 (M_r)_r - 1 (M_r)_k]$.

Результаты и обсуждение

Известно, что ЭРПД осуществляется путем последовательного функционирования ряда ферментов [1. 2] Первая стадия катализи-54 руется УФ-эндонуклеазой, вызывающей инцизию со стороны 5'-конца от димера. На рис. 1 представлены седиментограммы образцов ДНК из УФ-облученных (10 Дж, м²) клеток N-2a и L₉₂₉, выдержанных в ростовой среде 0 ч, 6 ч, 18 ч и затем обработанных экзогенной УФ-эндонуклсазой [16]. При действии фермента непосредственно после облучения наблюдается снижение величин M_r ДНК: для N-2a (M_r)_к = (70±5)·10⁶ Д. а (M_r) обл. = (25±2)·10⁶ Д. Расчет показал, что в этом случае образуется, в средием, 5—6 эндонуклеолитических разры-





вов на 10⁸ ДНК, что согласуется с данными других авторов [19, 20]. При обработке ферментом после 6 ч инкубации величина M_r ДНК такая же, что и непосредственно после облучения: для N-2a (M_r)6= (24±2)·10⁶. Увеличение времени инкубации до 18—20 ч приводит к небольшому сдвигу седиментограмм в сторону тяжелых фракций: для N-2a (M_r)20=(28±3)·10⁶. Следовательно, при 18—20 ч инкубации клеток происходит лишь незначительнос—10%-ное удаление пиримидиновых димеров из ДНК. Очевидно, что в исследованных линиях клеток практически не функционирует механизм ЭРПД.

Установлено, что резистентность клеток к ДНК-тропным агентам определяется способностью репарировать соответствующие повреждения ДНК [1]. В большинстве случаев зависимость гибели устойчивых к радиации клеток млекопитающих от дозы повреждающего воздействия характеризуется S-образной кривой [14]. На рис. 2 представлены кривые выживаемости исследованных нами линий. Очевидно, что невыщепляющие пиримидиновые димеры клетки обеих линий являются резистентными к действию УФ-раднации и не различаются между собой по критерию выживаемости.

Продолжительность клеточного цикла в этих линиях составляет, в зависимости от условий культивирования, 20-22 ч. Следовательно, новый цикл репликации начинается на ДНК с повреждениями. Известно. что УФ-облучение тормозит общую скорость репликативного синтеза ДНК [6, 7]. Согласно одной точке зрения, ширимидиновые димеры создают блок репликации [6. 7], согласно другой-приводят к образованию в дочерней ДНК пробелов, не препятствующих продвижению вилок репликации [8, 21]. Пробелы впоследствии заполияются синтезом de почо, что и составляет суть ПРР. Подавление общего синтеза ДНК в этом случае, по-видимому, связано с блоком инициации репликации ДНК [10]. В ряле работ показано, что вновь синтезированная ДНК в УФ-облученных клетках эукариот характеризуется меньшей величнной Mr [6-10]. По нашим данным, в УФ-облученных 10, 20 и 40 Дж/м² клетках дочерняя ДНК также синтезировалась с меньшей Мг (табл. 1). При этом относительное снижение величины Мг ДНК-ипрямо пропоринонально зависит от дозы УФ в данном клоне, а в N-2a меньше, чем в L929 при каждой дозе УФ. После импульсного мечения наиболее короткие фрагменты ДНК образуются в фибробластах.

Tabinung 1

Относительное са	нижение (п).	ψψ	скливность восстановлен	ня (Э _В)	Mr AHK	н	cpegnee
число	пробелов (Л.	лa	107 Д ДНК) в клетка	ах нейро	бластомы		
	N-2a	н	фибробластов Loso мы				
		_	529				

			Э. (%) Время инкубации (ч)		7.			
Клон	Доза УФ (Дж.м [.])	(%)			Время после УФ (ч)			
			1	3	L	2	4	
N-2a	10 20 40	13 27 46	91 78		8.0 12,0 26,4	0,6	-0,8 20.6	
$L_{\rm b10}$	10 20 40	23 38 48	57 38	107 79 7	9,4 20,4 30,0	6,8 10,0	-0.6 2,8 26,6	

Последующая инкубация клеток приводит к увеличению величины M_r дочерней ДНК до уровня M_r ДНК необлученных клеток. Однако нарастание величины M_r в УФ-облученных клетках двух линий происходит с неодинаковой скоростью (онс. 3). Из данных, приведенных в табл. 1, очевидно, что линии клеток различаются и по эффективности восстановления. Таким образом, изучение кинетики ПРР ДНК в клетках непробластомы и фибробластов мыши показало, что эффективность ПРР ДНК в N-2a выше, чем в L

Анализ полученного экспериментального материала с точки зрения гипотезы образования «пробелов» [8] показал, что процесс ПРР в двух

56

клонах посит экспоненциальный характер, и зависимость восполнения пробелов от времени инкубации клеток может быть выражена формулой:

ì.=ì.e^{−nd}.

где λ—среднее число пробелов на единицу М_г ДНК: λ₀—среднее число пробелов ДНК, синтезированной испосредственно после облучения; 111—показатель интенсивности заполнения пробелов: 1—время после УФ. Расчеты показали, что процесс ПРР ДНК в каждом из клонов в полулогарифмической системе координат хорошо апроксимируется прямыми (табл. 1, рис. 4). Обоснованность такой апроксимации подтверждается



Рис. 2. Выживаемость клеток нейробластомы (1) и фибробластов (2) мыши при УФ-облучении. По оси абсцисс-дора УФ (эрг/мм²): по оси ординат-выживаемость. %

Рис. 3. Нарастание величники М_г дочерней ДНК клетох, облученных УФ (20 Дж/м²). По оси абсинес-время после УФ: по оси ординат--М_г, 10⁶

Рис. 4. Зависимость числа пробелов (), в ДНК от времяни инкубания клеток, облученных УФ (20 Дж/м²). По оси абсцисс-время несле УФ, ч. по оси ординат-lg), 10-9

пересечением прямых в одной точке на осн абсцисс (при t=0), что означает одинаковое начальное число пробелов. Экспоненциальная зависимость, как известно, в большинстве случаев характериа для процессов, включающих несколько составляющих [22], скорости которых различаются и определяются углом наклона касательных. В начале процесса доминируют быстрые компоненты, действие которых, однако, вскоре заканчивается. По-видимому, именно этим определяются различия в снижении величины Мr ДНК после импульсного мечения в двух линиях (табл. 1). Можно предположить, что N-2a обладают быстрым, за время импульсного мечения, механизмом восстановления вторичных повреждений ДНК. Таким образом, приведенные в настоящей работе результаты по исследованию ПРР ДНК в клетках, различающихся по степени клеточной дифференциации, более всего объяснимы моделью [8]. согласно которой дочерияя ДНК в УФ-облученных клетках синтезируется с пробелами, а восстановление величины Mr ДНК осуществляется их ПРР.

Клетки млекопитающих с неудаленными пиримидлиовыми димерами через некоторое время после повреждающего воздействия приобретают способность синтезировать ДНК без пробелов [11, 12]. Механизм такого синтеза в обход неудаленных повреждений пока не выяснен [23]. Одно из объяснений предполагает возможность конформационного «исправления» повреждения, при котором некодирующее повреждение каким-либо образом трансформируется в кодирующее [11]. Имеющиеся экспериментальные данные не позволяют пока однозначно решить вопрос о репарационной природе этого механизма [24]. Способность клеток к ОП исследовали через 3 и 18 ч после УФ-облучения (табл. 2, рис. 5). В N-2a, через 3 ч после облучения в дозах 10 и 20 Дж/м² наличие пиримидиновых димеров в родительской ДНК препятствует элонгации дочерних нитей ДНК. В L929 профили седиментации фрагментов ДНК, синтезированных через 3 ч после действия УФ 10 Дж/м², мало *1 аб ише 2*

Средние величины	Mr. (Mr. 106	д) днк	клэток нейр	робласто	мы
N-2a и фибробластов	в Loop мыния.	amiyabene	меченных	сразу,	через
3	и 18 ч после	УФ-облу	чения		

Клон	Доза УФ (Дж.м-)		УФ с последующей имкубацией (ч)				
		Контроль	0	3	18		
L 929	10 20	62,0 <u>+</u> 1,5	40.0+3 34.0±1	58±3 42,0±0.5	63 <u>±</u> 3		
N-2a	10 20	65,0±2	48.0+2.5 42.0+2.5	50.0±1.5 40±3	60.0±0,5		

отличаются от контрольных; при дозе УФ 20 Дж/м², имеющиеся в родительских нитях повреждения ДНК преодолеваются частично. Следовательно, в отличие от клеток нейробластомы, фибробласты мыши способны к беспрепятственному синтезу ДНК через 3 ч песле воздействия. Исследования через более длительный периол инкубации (18 ч) показали, что в клетках обоих клонов синтезируется ДНК с той же величиной Мг, что и в контрольных клетках (табл. 2). Таким образом, принимая во виимание приведенные выше результаты по ЭРПД, можно заключить, что клетки нейробластомы проявляют дефект способности к ОП через некоторое время после действия УФ-радиации.

Беспрепятственный синтез ДНК вносит свой вклад в чувствительность клеток, хотя данных по этому вопросу немного [11, 25]. Дефект ОП у ряда невыщепляющих мутантов *M. luteus* определяет их повышенную УФ-чувствительность [25]. Ранее нами было обнаружено, что клетки CHS-2, проявляющие повышенную чувствительность к летальному действию алкирующего канцерогена БМБА, не способны к ОП [9]. Согласно полученным данным, хотя в N-2a процесс ПРР осуществляется эффекэнвнее, однако они, в отличие от L₉₂₉, не способны к ОП. По-видимому, равная выживаемость клеток исследованных линий обусловлена взаимной компенсацией двух различных механизмов репарации дочерней нити ДНК.

Механизм ОП в настоящее время не ясен. Наряду с предположением о конформационном исправлении некодирующего повреждения [12] существует также и гипотеза репликативного преодоления блока репликации, благодаря которому дочерняя ДНК характеризуется нормальной



Рис. 5. Седиментация ДНК клеток, импульено меченных черта 3 ч после действия УФ (10 Дж:/м²). По оти абщите--номера фрахций от для гралиента, по оти ординат--радисактивность, % от общей: 1-ДНК бел УФ: 2, 3-УФ, "импульеное мечение 0 ч и 3 ч соответственно

величиной М_г [24]. Исходя из этой гипотезы, следует допустить, что ПРР и ОП по сути это один и тот же процесс. Однако такому объяснению противоречат приведенные выше результаты. С выводом о различных механизмах ПРР и ОП согласуются также данные о механизмах «раниего» и «позднего» способов репарации дочерней ДНК в УФ-облученных клетках сирийского хомячка [23]. Можно предположить, что существует особая ветвь репарационной системы, ответственная за исправление дефектов в нитях ДНК, синтезируемых на поврежденных матрицах.

Возможные механизмы репарации ДНК продолжают обсуждаться в литературе. Результаты настоящей работы на клетках с разной степенью дифференциации показали, что при равной выживаемости этих клеток, практически неспособных к ЭРПД, наблюдаются различия в процессе репарации вторичных повреждений ДНК: клетки нейробластомы обладают быстрым механизмом ПРР: эффективность ПРР в них выше: клетки нейробластомы, в отличие от фибробластов, не способны к ОП. Результаты по ПРР ДНК в каждой из исследованных линий согласуются с гипотезой образования «пробелов». Данные по синтезу ДНК в обход новреждений свидетельствуют о репарационной природе "того процесса, имеющего значение для жизнеспособности клеток.

59

DNA REPAIR IN UV-IRRADIATED CELLS OF MOUSE NEUROBLASTOME

MANUKIAN K. L.

Institute of Experimental Biology, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

A difference in the ability of mouse neuroblastome and fibroblast cells to repair daughter strand of DNA is detected: in neuroblastome cells postreplication repair (PRR) of DNA is more effective, but they are incapable of free synthesis of DNA on a damaged matrix some time after UV—irradiation.

Results from PRR DNA agree with the hypothesis of formation of "gaps". Data on the synthesis of DNA by means of by-passing the damages testify, that this so far obscure mechanism has a reparation nature and is of importance for the viability of the cells.

ΛΗΤΕΡΑΤΥΡΑ

- 1. Жестяников В. Л. Репарация ДНК и се биологическое значение, А., Наука, 1979.
- 2. Михельсон В. М., Томилин II. В. Генетика челевска, т. 4, с. 103-163, М., Наука, 1979.
- Barenfeld L., Pleskach N., Bildin V., Prokofjeva V., Mikhelson V., Mutat. Res. v. 165, p. 159-164, 1986.
- 4. Thompson L., Rubin J., Cleaver J. Somat. Cell Genet., v. 6, p. 391-405, 1980.
- 5. Барсифельд Л. С., Виханская (Д. Л. Цитология. т. 25. No. 10, с. 1173-1177. 1983.
- 6. Edenberg H. Biophys. J., v. 16, Nº 8, p. 849-859, 1976.
- 7. Park S., Cleaver J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 76, p. 3927-3931, 1979.
- 8. Lehmann A. Nucl. Acids Research, v. 7, p. 1901-1912, 1979.
- 9. Манукян К. Л. Автореферат канд. дис., А., Ин-т цитологии АН СССР. 1981.
- Zhestianikov V. D. -In: Progress in Mutat. Res., v. 4. p. 325-335, Elsevier Bimed. Press; Amsterdam, Oxford, New York; 1982.
- 11. Buhl. S., Setlow R., Regan J. Biophys. J., v. 13, p. 1253-1275, 1973.
- 12. Buhl S., Setlow R., Regan J. Biophys. J., v. 14, p. 791-803, 1974.
- 13. Манукян К. Л., Киоян Ж. А. Нейрохимия. т. 4. № 1. с. 105, 1985.
- 14. Duncan M., Brooks P. Mut. Res., v. 21, p. 107-118, 1983.
- 15. Noll H. Nature, v. 215, p. 350-365, 1967.
- 16. Томилин Н. В. Молекуляр. биол., т. 8. № 4. с. 557-568, 1974.
- 17. Korner J., Malz W. Studia Biophys., v. 41, p. 11-20, 1973.
- 18. Studier F. J. Mol. Biol., v. 11, p. 375-379, 1965.
- 19. Clarkson J., Hewill R. Biophys. 1., v. 16. p. 1155-1164, 1976.
- 20. Ahmed F., Setlow R. Biophys. J., v. 24, p. 665-675, 1978.
- 21. Баренфельд Л. С. Цитология. т. 26. № 3. с. 343-348, 1984.
- 22. Яковлев В. А. Кинстика ферментативного катализа, М., Наука, 1975.
- 23. Rosenstein B., Setlow R. Biophys. J., v. 31, p. 196-206, 1980.
- 24. Doniger J., DiPaolo A. Biophys. J., v. 31. p. 247-254, 1980.
- 25. Жеребцов С. В. Автореферат канд. дис., Л., Ин-т цитологии АН СССР, 1978.

Поступила 17. 111 1987