



УДК 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 линиях клеток нейробластомы и фибробластов мыши наблюдаются 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 исследованных линий согласуются с гипотезой образования «пробелов». Данные по синтезу ДНК в обход повреждений свидетельствуют о репарационной природе этого процесса, имеющего значение для жизнеспособности 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, ее генетического контроля и биологической значимости в клетках эукариот 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]. Еще 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 C-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 ($\lambda=254$ нм). Летальное действие УФ-света определяли по критерию образования колоний [14].

ЭРПД, ПРР и ОП исследовали методом седиментации ДНК в изокинетических градиентах сахарозы [15]. ЭРПД определяли с использованием УФ-эндонуклеазы из *M. luteus* [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 проницаемой 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 X-100). Обработку ферментом проводили в течение 30 мин. При исследовании ПРР клетки в логарифмической фазе роста облучали УФ и импульсно метили [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 γ -лучами в дозе 2 крад., центрифугировали на ультрацентрифуге L2-65 В («Beckman», США), ротор SW-65, V=32000 об/мин, 90 мин, 20° при исследовании ЭРПД и ротор SW-50.1, V=38 000 об/мин, 90 мин, 20° при исследовании ПРР и ОП. Градиенты фракционировали по времени на бумажные фильтры FN-12. Радиоактивность подсчитывали в стандартном толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Beckman IS-8100» (США). Константы седиментации рассчитывали по Noll [15], а величины M_r для каждой фракции—по Studier [18], средневесовую величину M_r определяли, используя формулу:

$$M_r = \sum f_i M_i / \sum f_i$$

где: f_i — радиоактивность i -фракции, M_i — M_r i -фракции.

Относительное снижение— μ - M_r ДНК клеток после УФ-облучения оценивали по формуле: $\mu = [(M_r)_k - (M_r)_0] / [(M_r)_k] \cdot 100\%$, где $(M_r)_k$ и $(M_r)_0$ —средневесовые значения M_r ДНК необлученных и поврежденных клеток.

Эффективность восстановления (Θ_B) рассчитывали по формуле:

$$\Theta_B = [(M_r)_B - (M_r)_0] / [(M_r)_k - (M_r)_0] \cdot 100\%$$

где $(M_r)_B$ — M_r ДНК поврежденных клеток после инкубации. Среднее число разрывов на единицу M_r ДНК: $\lambda = 2[1/(M_r)_0 - 1/(M_r)_k]$.

Результаты и обсуждение

Известно, что ЭРПД осуществляется путем последовательного фракционирования ряда ферментов [1, 2]. Первая стадия катализи-

руется УФ-эндонуклеазой, вызывающей инцизию со стороны 5'-конца от димера. На рис. 1 представлены седиментограммы образцов ДНК из УФ-облученных (10 Дж/м^2) клеток N-2a и L₉₂₉, выдержанных в ростовой среде 0 ч, 6 ч, 18 ч и затем обработанных экзогенной УФ-эндонуклеазой [16]. При действии фермента непосредственно после облучения наблюдается снижение величин M_r ДНК: для N-2a $(M_r)_k = (70 \pm 5) \cdot 10^6 \text{ Д}$, а $(M_r)_{\text{обл.}} = (25 \pm 2) \cdot 10^6 \text{ Д}$. Расчет показал, что в этом случае образуется, в среднем, 5—6 эндонуклеолитических разрыв-

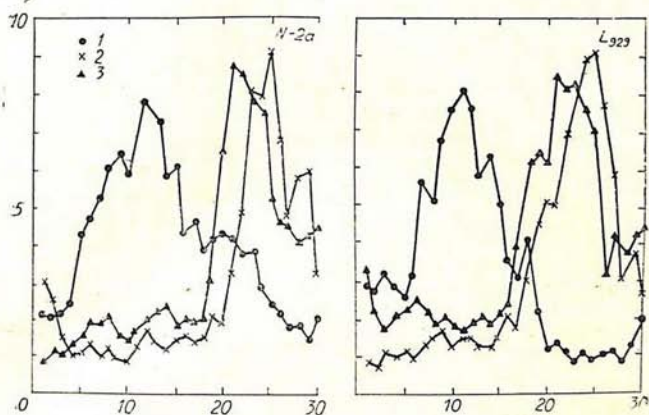


Рис. 1. Седиментация ДНК УФ-облученных (10 Дж/м^2) клеток при действии УФ-эндонуклеазы. По оси абсцисс—номера фракций от дна градиента; по оси ординат—радиоактивность, % от общей. 1—ДНК до обработки ферментом; 2, 3—ДНК после действия фермента через 0 и 6 ч (что практически совпадает) и 20 ч инкубации соответственно

вов на 10^8 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 $(M_r)_6 = (24 \pm 2) \cdot 10^6$. Увеличение времени инкубации до 18—20 ч приводит к небольшому сдвигу седиментограмм в сторону тяжелых фракций: для N-2a $(M_r)_{20} = (28 \pm 3) \cdot 10^6$. Следовательно, при 18—20 ч инкубации клеток происходит лишь незначительное—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 резистент-

ными к действию УФ-радиации 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, пиримидиновые димеры создают блок репликации [6, 7], согласно другой—приводят к образованию в дочерней ДНК пробелов, не препятствующих продвижению вилки репликации [8, 21]. Пробелы впоследствии заполняются синтезом *de novo*, что и составляет суть ПРР. Подавление общего синтеза ДНК в этом случае, по-видимому, связано с блоком инициации репликации ДНК [10]. В ряде работ показано, что вновь синтезированная ДНК в УФ-облученных клетках эукариот характеризуется меньшей величиной M_r [6—10]. По нашим данным, в УФ-облученных 10, 20 и 40 Дж/м² клетках дочерняя ДНК также синтезировалась с меньшей M_r (табл. 1). При этом относительное снижение величины M_r ДНК- μ —прямо пропорционально 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.

Таблица 1

Относительное снижение (μ), эффективность восстановления (Ξ_B) M_r ДНК и среднее число пробелов (λ на 10⁹ Д ДНК) в клетках нейробластомы N-2a и фибробластов L₉₂₉ мыши.

Клон	Доза УФ (Дж/м ²)	μ (%)	Ξ_B (%)		λ		
			Время инкубации (ч)		Время после УФ (ч)		
			1	3	1	2	4
N-2a	10	13	91	—	8,0	0,5	—
	20	27	78	111	12,0	2,0	-0,8
	40	46	—	13	26,4	—	20,6
L ₉₂₉	10	23	57	107	9,4	6,8	-0,6
	20	38	38	79	20,4	10,0	2,8
	40	48	—	7	30,0	—	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 (рис. 3). Из данных, приведенных в табл. 1, очевидно, что линии клеток различаются и по эффективности восстановления. Таким образом, изучение кинетики ПРР ДНК в клетках нейробластомы и фибробластов мыши показало, что эффективность ПРР ДНК в N-2a выше, чем в L₉₂₉.

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

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

$$\lambda = \lambda_0 e^{-\mu t},$$

где λ —среднее число пробелов на единицу M_r ДНК; λ_0 —среднее число пробелов ДНК, синтезированной непосредственно после облучения; μ —показатель интенсивности заполнения пробелов; t —время после УФ. Расчеты показали, что процесс ПРР ДНК в каждом из клонов в полудогарифмической системе координат хорошо аппроксимируется прямыми (табл. 1, рис. 4). Обоснованность такой аппроксимации подтверждается

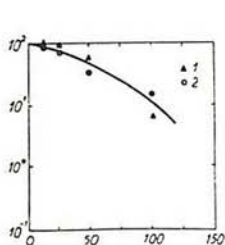


Рис. 2. Выживаемость клеток нейробластомы (1) и фибробластов (2) мыши при УФ-облучении. По оси абсцисс—доза УФ (эрг/мм²); по оси ординат—выживаемость, %.

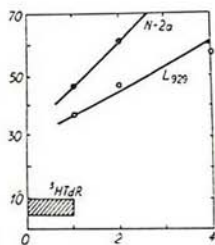


Рис. 3. Нарастание величины M_r дочерней ДНК клеток, облученных УФ (20 Дж/м²). По оси абсцисс—время после УФ; по оси ординат— $M_r \cdot 10^5$.

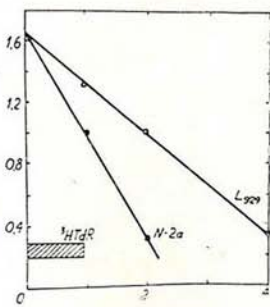


Рис. 4. Зависимость числа пробелов (λ) в ДНК от времени инкубации клеток, облученных УФ (20 Дж/м²). По оси абсцисс—время после УФ, ч; по оси ординат— $-\lg \lambda \cdot 10^{-9}$.

пересечением прямых в одной точке на оси абсцисс (при $t=0$), что означает одинаковое начальное число пробелов. Экспоненциальная зависимость, как известно, в большинстве случаев характерна 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 M_r 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 дочерняя ДНК в УФ-облученных клетках синтези-

руется с пробелами, а восстановление величины M_r ДНК осуществляется их ПРР.

Клетки млекопитающих с неудаленными пиримидиновыми 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

Таблица 2

Средние величины M_r ($M_r \cdot 10^6$ Д) ДНК клеток нейробластомы N-2a и фибробластов L₉₂₉ мыши, импульсно меченных сразу, через 3 и 18 ч после УФ-облучения

Клон	Доза УФ (Дж/м ²)	Контроль	УФ с последующей инкубацией (ч)		
			0	3	18
L 929	10	62,0±1,5	40,0±3	58±3	—
	20		34,0±1	45,0±0,5	
N-2a	10	65,0±2	48,0±2,5	50,0±1,5	—
	20		42,0±2,5	40±3	

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 после воздействия. Исследования через более длительный период инкубации (18 ч) показали, что в клетках обоих клонов синтезируется ДНК с той же величиной M_r , что и в контрольных клетках (табл. 2). Таким образом, принимая во внимание 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 алкилирующего канцерогена БМБА, не способны к ОП [9]. Согласно полученным данным, хотя в N-2a процесс ПРР осуществляется эффек-

тивнее, 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

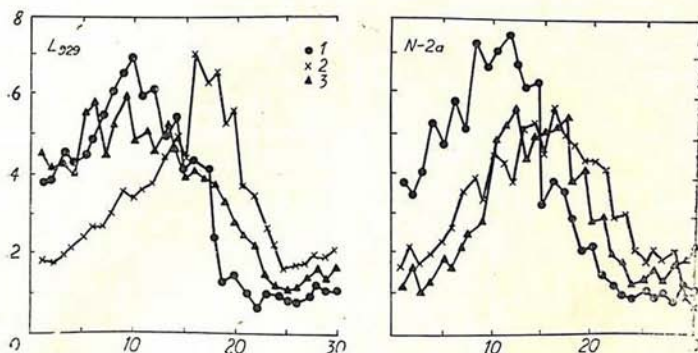


Рис. 5. Седиментация ДНК клеток, импульсно меченных через 3 ч после действия УФ (10 Дж/м²). По оси абсцисс—номера фракций от дна градиента, по оси ординат—радиосактивность, % от общей: 1—ДНК без УФ; 2, 3—УФ импульсное мечение 0 ч и 3 ч соответственно

величиной M_r [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 «раннего» 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 повреждений свидетельствуют о репарационной природе этого процесса, имеющего значение для жизнеспособности клеток.

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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л., Наука, 1979.
2. Михельсон В. М., Томилини И. В. Генетика человека, т. 4, с. 103—163, М., Наука, 1979.
3. 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. Баренфельд А. С., Виханская Ф. А. *Цитология*, т. 25, № 10, с. 1173—1177, 1983.
6. Edenberg H. *Biophys. J.*, v. 16, № 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. А. Автореферат канд. дисс. Л., Ин-т цитологии АН СССР, 1981.
10. Zhestianikov V. D. —In: *Progress in Mutat. Res.*, v. 4, p. 325—335, Elsevier Bi-med. 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. А., Куюян 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. 360—365, 1967.
16. Томилини И. 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., Hewitt R. *Biophys. J.*, v. 16, p. 1155—1164, 1976.
20. Ahmed F., Setlow R. *Biophys. J.*, v. 24, p. 665—675, 1978.
21. Баренфельд А. С. *Цитология*, т. 26, № 3, с. 343—348, 1984.
22. Яковлев В. А. *Кинетика 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. дисс. Л., Ин-т цитологии АН СССР, 1978.

Поступила 17. III 1987