

## О ВЫЩЕПЛЕНИИ УФ - ИНДУЦИРОВАННЫХ ПИРИМИДИНОВЫХ ДИМЕРОВ ИЗ ДНК КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ И ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ

З.М. МАНУКЯН, К.Л. МАНУКЯН, Г.Г. ЖАМГАРЯН, К.Г. КАРАГЕЗЯН

*Институт молекулярной биологии НАН РА, 375014, Ереван*

Методом седиментации в щелочных градиентах сахарозы при использовании УФ-эндонуклеазы из *Micrococcus luteus* исследовалось выщепление УФ-индуцированных пиримидиновых димеров из ДНК клеток нейробластомы (субклон N-2a опухоли C-1300) и фибробластов (линия L<sub>929</sub>) мыши. Показано, что в обеих клеточных линиях при действии УФ-света (10 Дж/м<sup>2</sup>) практически не происходит выщепления из ДНК основных летальных фотопродуктов - димеров пиримидиновых оснований.

Ուսումնասիրվել է ախարոզի ալկալիական գրադիենտներում *Micrococcus luteus*-ից ՈւՄ-էնդոնուկլեազի օգտագործմամբ սկզբնորի նեյրոբլաստոմայի (C-1300 ուռուցքի N-2a ենթակլոն) և ֆիբրոբլաստոմների (L<sub>929</sub> գիծ) բջիջների ՊՆԹ-ից ՈւՄ-ինդուցված պիրիմիդինային դիմերների արտանդումը: Ցույց է տրվել, որ երկու բջջային գծերում ՈւՄ-ճառագայթման (10 Ջ/մ<sup>2</sup>) ազդեցությամբ գործնականում ՊՆԹ-ից հիմնական մահացու ֆոտոնյութերի պիրիմիդինային հիմքերի դիմերների արտանդում տեղի չի ունենում:

The excision of UV-induced pyrimidine dimers from DNA of mouse neuroblastoma (subclone N-2a of tumor C-1300) and fibroblasts (line L<sub>929</sub>) cells was studied using the method of sedimentation in the sucrose alkaline gradients and the UV-endonuclease from *Micrococcus luteus*. It was shown, that in the cells investigated under the action of UV-light (10 J/m<sup>2</sup>) there was practically no excision from DNA the main lethal photo-products, the dimers of pyrimidine bases.

*Нейробластома - фибробласты - ДНК - пиримидиновые димеры - УФ-лучи -  
УФ-эндонуклеаза - выщепление*

Известно, что при УФ-облучении клеток млекопитающих основными биологически важными летальными повреждениями, образующимися в ДНК, являются циклобутановые пиримидиновые димеры (ПД) [3, 8, 14]. Кроме ПД, в ДНК клеток образуется множество других продуктов [1, 3, 7], биологическая роль которых пока неизвестна. Репарация ДНК, поврежденной воздействием УФ-радиации, осуществляется путем выщепления ПД и последующего ресинтеза, т.е. эксцизионной репарацией (ЭР) ДНК [1, 4, 8]. Клетки млекопитающих обладают неодинаковой способностью выщеплять ПД: если из ДНК клеток здоровых людей после УФ-облучения в умеренных дозах примерно за 20 ч удаляется 80-100% ПД, то из ДНК большинства клеточных линий грызунов - всего 5-10% [6, 9]. Особенностью клеток млекопитающих является низкая скорость выщепления ПД (в клетках здорового человека через 6 ч удаляется лишь 30-40% димеров) [1, 6], в то время как внеплановый синтез завершается относительно быстро (1-3 ч). Наличие внепланового синтеза не всегда коррелирует с выщеплением ПД из ДНК [15]. Это, по-видимому, связано с тем, что инцизионные разрывы

образуются не только в результате выщепления ПД, но и вследствие действия эндонуклеаз, активных по отношению к другим фотопродуктам. Следовательно, исследование внепланового синтеза является косвенным определителем выщепления ПД, которое отражает лишь стимулированное облучением включение нуклеотидов в однонитевые ДНК клеток. Непосредственное удаление ПД из ДНК позволяет определить метод, основанный на способности УФ-эндонуклеаз прокариот производить однонитевые разрывы около ПД. Эффективность ЭРПД зависит от таких факторов, как степень клеточной дифференциации или же наличие генетических дефектов в системе ЭР. В ряде работ показано, что высокодифференцированные клетки хуже репарируют ДНК [5].

Целью настоящей работы является сравнительное исследование выщепления ПД из ДНК УФ-облученных клеток нейробластомы и фибробластов мыши.

**Материал и методика.** Работу проводили на асинхронных культурах клеток нейробластомы (субклон N-2а опухоли C-1300) и фибробластов (линия L<sub>929</sub>) мыши, культивируемых на среде Игла с 10%-ной сывороткой крови крупного рогатого скота в кварцевых флаконах Карреля. В логарифмической фазе роста клетки метили <sup>3</sup>H-тимидином (10 мкКю/мл) в течение 2 сут. Меченую среду заменяли свежей, монослой клеток (без среды) облучали УФ-светом (λ = 254 нм) в дозе 10 Дж/м<sup>2</sup> с помощью лампы БУВ-60 и продолжали инкубацию в ростовой среде 6-20 ч при 37°. Клетки (~2·10<sup>6</sup>) снимали со стекла с помощью 0,02% версена и выделяли из них ДНК фенольным методом в модификации [10], затем осаждали, ресуспендировали в 0,5 мл проницаемой смеси (0,1 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М Трис - HCl, pH 7,6; 1% саркозил; 0,1 мг/мл протеиназы К; 0,05% тритон X - 100) и инкубировали 2 ч при 37°. Лизат встряхивали с равным объемом фенола, насыщенного 0,1 М Трис-HCl буфером, pH 7,6. Водный слой диализовали против 2 смен 0,01 М фосфатного буфера с 0,001 М ЭДТА, pH 7,5.

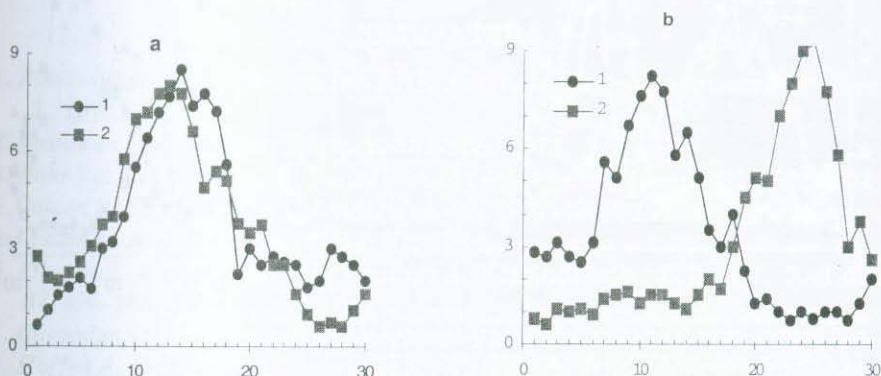
УФ-эндонуклеазу (фракция II) выделяли из *Micrococcus luteus* методом [2]. 100 мкл фермента или буфера добавляли к 100 мкл ДНК и инкубировали 30 мин при 38°. Затем к смеси добавляли 100 мкл раствора, содержащего 0,5 М NaCl и 0,02 М ЭДТА и наслаивали на изокинетический градиент сахарозы (5-29,6%). Градиенты центрифугировали на ультрацентрифуге L2-65B *Beckmann*, ротор SW. 65. со скоростью 32 000 об/мин, 90 мин при 20°, фракционировали по времени на бумажные фильтры FN-12 и промывали стандартным способом. Радиоактивность подсчитывали в толуоловом сцинтиляторе на счетчике *Beckmann LS 8100*. Молекулярный вес (M<sub>w</sub>) вычисляли по методу [14]. Количество ПД определяли как сайты, специфичные к УФ-эндонуклеазе, по формуле:

$$\lambda = 2 \left[ \frac{1}{(M_w)_1} - \frac{1}{(M_w)_2} \right],$$

где (M<sub>w</sub>)<sub>1</sub>-M<sub>w</sub> - ДНК после инкубации с УФ-эндонуклеазой, (M<sub>w</sub>)<sub>2</sub>-M<sub>w</sub> - ДНК до инкубации с ферментом.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1а представлены седиментограммы образцов ДНК из необлученных клеток N-2а, инкубированных с УФ-эндонуклеазой. Профиль седиментации ДНК из необлученных клеток после обработки ферментом практически совпадает с профилем седиментации ДНК, не обработанной УФ-эндонуклеазой. Следовательно, использованный препарат свободен от эндонуклеолитических активностей по отношению к ДНК

необлученных клеток. При обработке ферментом ДНК из облученных ( $10 \text{ Дж/м}^2$ ) клеток наблюдается снижение его  $M_w$ . Для клеток N-2a:  $(M_w)_k = 70 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^6$  дальтон,  $(M_w)_{0ч} = 25 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$  дальтон. Это свидетельствует об образовании эндонуклеолитических разрывов, рис. 1б. Расчеты показывают, что в клетках, облученных УФ-светом в дозе  $10 \text{ Дж/м}^2$ , обработка УФ-эндонуклеазой вызывает в среднем 5-6 разрывов ДНК на  $10^8$  дальтон.

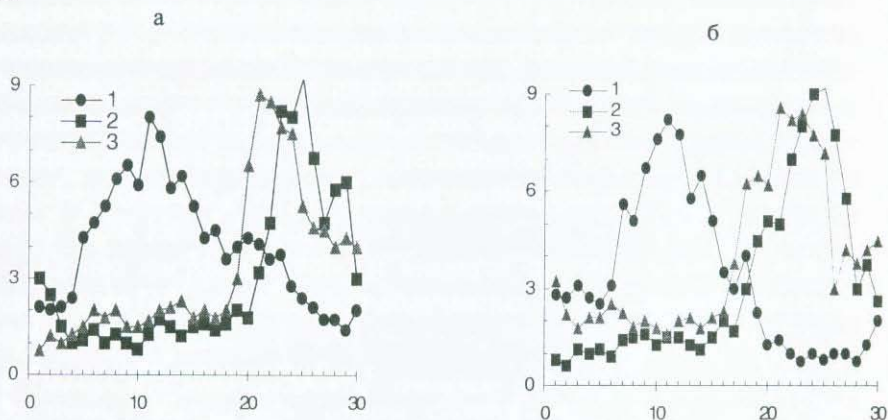


**Рис. 1.** Седиментация ДНК клеток N-2a: необлученных (а) и УФ-облученных -  $10 \text{ Дж/м}^2$  (б). По оси абсцисс - номера фракций (от дна), по оси ординат - радиоактивность, % от общей. 1,2 - ДНК до и после инкубации с УФ-эндонуклеазой соответственно.

Эффективность элиминации ПД из ДНК клеток млекопитающих находится в обратной зависимости от дозы облучения [1, 7, 9, 10]. Согласно литературным данным, при облучении УФ-светом ( $\lambda = 254 \text{ нм}$ ) в дозе  $10 \text{ Дж/м}^2$  примерно 0,05% пиримидиновых оснований ДНК переходит в димеры. При этом в гаплоидном геноме клеток эукариот ( $3 \cdot 10^{12}$  дальтон) образуется  $\sim 4 \cdot 10^5$  ПД. Количество эндонуклеазочувствительных сайтов при дозе облучения  $5 \text{ Дж/м}^2$  составляет  $4 \cdot 10^8$  и  $9 \cdot 10^8$  при дозе облучения  $10 \text{ Дж/м}^2$ .

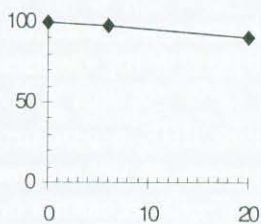
Для исследования элиминации ПД из ДНК УФ-облученные клетки инкубировали в ростовой среде и затем с помощью фермента определяли наличие сайтов, чувствительных к УФ-эндонуклеазе. На рис. 2 представлены седиментограммы ДНК из клеток клонов N-2a и L<sub>929</sub>, облученных в дозе  $10 \text{ Дж/м}^2$  и затем выдержанных в ростовой среде при  $37^\circ$  в течение 6 и 20 ч. Профили седиментации ДНК клонов клеток N-2a и L<sub>929</sub>, обработанных ферментом через 0 ч и 6 ч после облучения, практически совпадают. Для N-2a:  $(M_w)_{6ч} = 24 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$  дальтон. Через 6 ч после действия УФ не происходит выщепления ПД из ДНК. При увеличении времени инкубации УФ-облученных клеток до 18-20 ч (рис. 2) наблюдается небольшой сдвиг седиментограмм ДНК в сторону тяжелых фракций. То есть происходит незначительное уменьшение эндонуклеазочувствительных участков в ДНК клеток обеих исследованных линий. Для N-2a:  $(M_w)_{18ч} = 25 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$  и  $2(M_w)_{20ч} = 28 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^6$  и составляет 4,4 разрыва на  $10^8$  дальтон. Таким

образом, при 18-20 - часовой инкубации клеток N-2a и L<sub>929</sub>, облученных в дозе 10 Дж/м<sup>2</sup>, происходит лишь незначительное (10-15%) удаление ПД из ДНК, и в общем виде кривые выщепления димеров из ДНК клеток N-2a и L<sub>929</sub> совпадают, рис. 3.



**Рис. 2.** Седиментация ДНК УФ-облученных (10 Дж/м<sup>2</sup>) клеток N-2a и L<sub>929</sub>.  
По осям – то же, что и на рис. 1.

- 1 - ДНК до инкубации с УФ-эндонуклеазой;  
2 - ДНК после инкубации с ферментом, 0 ч, 6 ч (практически совпадают);  
3 - ДНК после инкубации с ферментом, 20 ч.



**Рис. 3.** Удаление УФ-эндонуклеазочувствительных сайтов из ДНК УФ-облученных (10 Дж/м<sup>2</sup>) клеток N-2a в процессе пострадиационной инкубации.

По оси абсцисс – время инкубации, ч.  
По оси ординат – сайты, специфичные к эндонуклеазе, %.

Очевидно, что в клетках нейробластомы N-2a равно как и в фибробластах L<sub>929</sub> при действии УФ-света практически не происходит удаления из ДНК основных летальных фотопродуктов - димеров пиримидиновых оснований. И следовательно, новый цикл репликации начинается на ДНК с повреждениями. Это позволяет предположить, что для обеспечения жизнеспособности клеток недостаточность эксцизионного пути репарации в исследованных нами клетках должна быть компенсирована высокоэффективными механизмами пост-репликативной и (или) репликативной репарации ДНК.

Пониженный уровень выщепления ПД в исследованных клетках может быть обусловлен как недостатком УФ-эндонуклеазы, так и ее ингибированием (например, при хронической вирусной инфекции [12]). При исследовании репарации в УФ-облученных первичных перевиваемых эмбриональных клетках хомячков и мышей было выявлено, что по мере пассирования клеток наблюдается снижение способности к вырезанию димеров. Такого рода данные дали авторам основание сделать предположение о наличии в клетках грызунов процесса ЭР, который, по-видимому, в перевиваемых линиях этих животных

репрессирован. Вопрос об "отсутствии" ЭРПД в клетках грызунов продолжает широко обсуждаться в литературе.

Таким образом, исследованные линии клеток N-2a и L<sub>929</sub>, проявляющие низкий уровень ЭРПД, могут служить удобной моделью для изучения пострепликативных (репликативных) механизмов репарации ДНК в клетках различного уровня дифференциации при действии ДНК-тропных факторов УФ-типа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.
2. Томилин Н.В. Молек. Биол. 8, 557-568, 1974.
3. Bohr V.A. DNA Adducts: Identif. And Biol. Signif., Lyon, 361-369, 1994.
4. Calson P., Salles B. Nucl. Acids. Res. 22, 4937-4942, 1994.
5. Compston A. J. Neurology, 242, S1, 1994.
6. Filon A.R., Kampinga H.H., Konings A.W., Mullenders L. Int. J. Rad. Biol., 67, 495-501, 1995.
7. Gurzadyan G.G., Corner H. Photochem. Photobiol, 63, 143-153, 1996.
8. Hoffen A., Balajee A.S., Bouayadi K., Natarajan A., Zeeland A., Mullenders L. J. Cell Biochem. (Suppl.), 12C, 105, 1994.
9. Lehmann A.R. J. Molec. Biol., 66, 319 - 337, 1972.
10. Lehmann A.R., Kirk-Bell S. Photobiol., 27, 297-307, 1978.
11. O'Donnell R., Boorstein R., Cunningham R., Teebor G. Biochem., 33, 9875-9880, 1994.
12. Ruven H., Seelen C., Maud J., Lohman P., Kranen H., Zeeland A., Mullenders L. Oncogene, 9, 3427-3432, 1994.
13. Sage E. Photochem. Photobiol, 57, 163-174, 1993.
14. Studier A. J. Mol. Biol., 11, 373-390, 1965.
15. Teebor G., Goldstein M. J. Supramol. Struct., Suppl. 2, 11, 1978.

Поступила 09.IX.1998