



УДК 577.2:575

Г. Д. Телегеев, И. В. Зозуля, С. С. Малюта

## ЭКЦИЗИЯ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА КЛЕТОК HeLa КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ МИНИКОЛЬЦЕВЫХ ДНК

С помощью проклонированных молекул миникольцевых ДНК (мкДНК) изучали копийность этих структур в геноме клеток HeLa. Показано, что оба мк-зонда имеют гомологию к хромосомной ДНК и представлены в ней множеством копий (800—900). Обработка культуры циклогексимидом, а также старение клеток *in vitro* приводят к 0,2—2-кратному уменьшению копийности исследуемых мкДНК в геноме с одновременным увеличением их содержания в экстрахромосомной фракции. Наиболее вероятным механизмом для объяснения этого процесса является рекомбинация повторов с последующей их эксцизией в кольцевой форме.

**Введение.** Клетки животных наряду с ядерной и митохондриальной ДНК содержат полидисперсные мкДНК [1—3], имеющие размер от нескольких сотен до десятков тысяч пар оснований и представленные в клетках единичными или множественными копиями. Все исследованные до настоящего времени мкДНК гомологичны хромосомной ДНК и гибридизуются преимущественно с повторами разных классов [4—6]. Показано, что число копий мкДНК может меняться в процессе развития [7], при старении [1], у межвидовых гибридов [9], в результате трансформации [8], после обработки циклогексимидом (ЦГИ) [1—3] и т. д. Природа подобных изменений пока не известна.

В данной работе, используя проклонированные мкДНК из клеток HeLa [13], предпринята попытка выяснить возможные механизмы количественных изменений мкДНК в этих клетках в процессе старения и при блоке ЦГИ.

**Материалы и методы.** Перевиваемую культуру клеток HeLa выращивали на питательной смеси, содержащей среду Игла с глутамином, среду 199 и сыворотку крупного рогатого скота в соотношениях 1:2:1. В среду добавляли по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина.

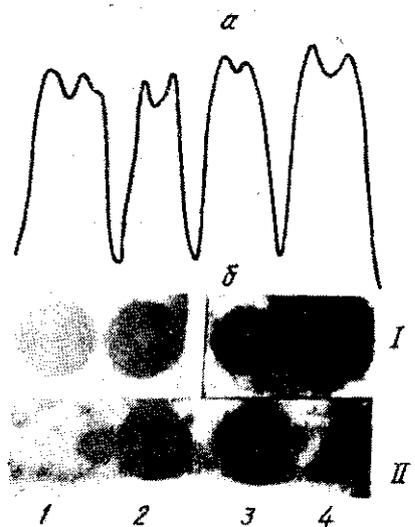
Высокомолекулярную ДНК выделяли из ядер HeLa с протеиназой K [10]. Клетки обрабатывали ЦГИ в концентрации 50 мкг в 1 мл культуральной среды за 16 ч до выделения ДНК. Дот-гибридизацию проводили на нитроцеллюлозном фильтре Nybond по общепринятой методике [11]. В качестве молекулярных зондов использовали меченные <sup>32</sup>P с помощью ник-трансляции [12] мкДНК, полученные из культуры клеток HeLa и клонированные в HindIII-сайт плазмиды pBR322 [13]. Результаты автордиографии обрабатывали на приборе Ultrosan XL фирмы «LKB» (Швеция).

**Результаты и обсуждение.** Равное количество хромосомной ДНК, выделенной из обработанных и не обработанных ЦГИ клеток HeLa, наносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали с фрагментом клонированной мкДНК клона pMTH1 [13]. Параллельно на тот же фильтр наносили внехромосомную цитоплазматическую ДНК (рис. 1). Сигналы, полученные при гибридизации ядерной ДНК с зондом, свидетельствуют о том, что мкДНК представлена в геноме клеток HeLa в виде множества копий. Сопоставление сигналов обнаруживает большую копийность клонированного фрагмента мкДНК в клетках, не обрабо-

танных ЦГИ. Копийность повторов определяли сравнением интенсивности сигналов геномной ДНК по их отношению к разведениям зондов (положительный контроль), как описано в работе [21]. По результатам денситометрии (рис. 1, а), число копий фрагмента из клона *pMTH1* в ядерном геноме клеток, не обработанных ЦГИ, составило примерно

Рис. 1. Результаты дот-гибридизации ДНК клеток *HeLa* с  $^{32}\text{P}$ -меченной вставкой клона *pMTH1* (б) и денситограмма одного из разведений (а). I — ДНК ядер клеток *HeLa* до (1) и после (2) обработки ЦГИ (6,25 мкг); ДНК цитоплазмы клеток *HeLa* до (3) и после (4) обработки ЦГИ (6,25 мкг); II — ДНК фага  $\lambda$  (2 мкг), разведение зонда  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  мкг

Fig. 1. Dot-hybridization of *HeLa* genomic DNA with  $^{32}\text{P}$ -labelled probe *pMTH1* (б) and peaks of corresponding autoradiograms (а) I — genomic DNA before cycloheximide treatment, 6.25  $\mu\text{g}$  (1); genomic DNA after cycloheximide treatment, 6.25  $\mu\text{g}$  (2); cytoplasmic DNA before cycloheximide treatment, 16.25  $\mu\text{g}$  (3); cytoplasmic DNA after cycloheximide treatment, 16.25  $\mu\text{g}$  (4); II —  $\lambda$ , 2  $\mu\text{g}$ , probes dilution ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$   $\mu\text{g}$ )



800, в то время как после обработки их количество уменьшилось на 80—100. Одновременно наблюдается увеличение числа копий в экстрахромосомной фракции клеточной ДНК (рис. 1, 4).

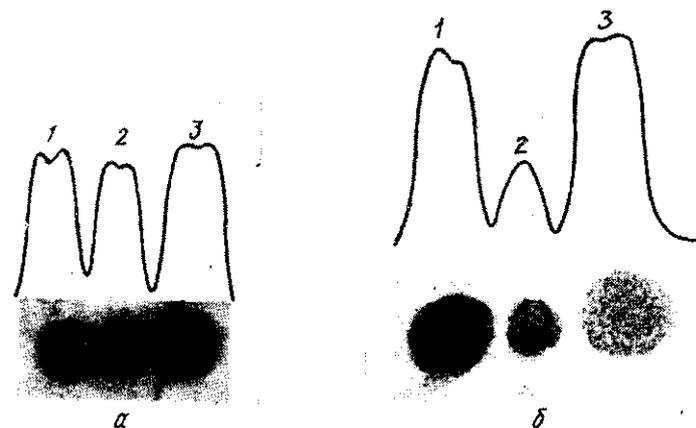


Рис. 2. Результаты дот-гибридизации ДНК ядер клеток *HeLa* с  $^{32}\text{P}$ -меченными мк-вставками клонов *pMTH1* (а) и *pMTH9* (б): I — ДНК клеток в стадии экспоненциального роста, 2,5 мкг; 2 — то же в поздней стационарной фазе роста, 2,5 мкг; 3 — ДНК зонда,  $10^{-3}$  мкг

Fig. 2. Dot-hybridization of *HeLa* genomic DNA of different growth state with  $^{32}\text{P}$ -labelled probes *pMTH1* (а), *pMTH9* (б): I — DNA from cells in exponential phase; 2.5  $\mu\text{g}$ ; 2 — DNA from cells in late stationary phase, 2.5  $\mu\text{g}$ ; 3 — probe ( $10^{-3}$   $\mu\text{g}$ )

Изменения количества копий мкДНК в геноме, аналогичные описанным выше, получены и при гибридизации с фрагментом клонированной мкДНК клона *pMTH9*. Число копий в этом случае изменилось примерно на 300, составляя 900 копий в необработанных и около 600 в клетках, обработанных ЦГИ.

Для изучения влияния старения на копийность мкДНК в геноме образцы ядерной ДНК, выделенные из культуры клеток в стадии экспоненциального роста, а также из клеток поздней стационарной фазы (обычно 6—8-е сут роста), наносили на фильтры и гибридизовали с мкзондами (рис. 2). Данные денситограмм свидетельствуют о различной степени изменения мкДНК в геномной ДНК при старении для клонов *pMT111* и *pMT119*. Так, уменьшение копий мкДНК для клона *pMT111* в геноме составляло 160—180, в то время как для клона *pMT119* эта величина была порядка 450—500 копий.

Таким образом, представленные здесь данные свидетельствуют о следующем. Во-первых, число копий клонов *pMT111* и *pMT119* в геноме  $8 \cdot 10^2$  и  $9 \cdot 10^2$  позволяет считать их умеренно повторяющимися последовательностями генома человека. Во-вторых, обработка культуры клеток *HeLa* ЦГИ и старение клеток приводят к уменьшению копийности мкДНК в геноме. Наиболее вероятным механизмом для объяснения данного процесса, по нашему мнению, является рекомбинация повторов между собой и их последующая эксцизия в кольцевой форме, возможно, аналогично описанному для *L-1*, *Sau-3A* последовательностей [14, 15]. В то же время трудно объяснить изменение копийности данных мкДНК процессом обратной транскрипции, описанным для *Alu*-повторов [16], а также механизмом по типу «чешуи лукавицы» [17].

В настоящее время опубликовано лишь несколько работ, в которых установлена «запрограммированность» процесса эксцизии с последующим образованием кольцевых молекул (созревание  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\sigma$ -генов рецепторов Т-клеток) [18—20]. Насколько широко распространено это явление и свидетельствует ли оно о выживании или о гибели клеток, пока не ясно.

#### EXCISION OF HeLa GENOMIC REPEATED SEQUENCES AS A POSSIBLE WAY TO PRODUCE MINICIRCULAR DNA

G. D. Teleguev, I. V. Zozulia, S. S. Maliuta

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the USSR, Kiev

#### Summary

Using cloned minicircular DNA (mcDNA) of *HeLa* cells a number of its genomic copies has been studied. It is found that both probes have chromosome homology and are presented at least by 800-900 copies. The cycloheximide treatment and «ageing» in vitro results in a 0.2-2-fold decrease of its genomic copies with simultaneous increase in cytoplasmic fraction. It is explained by means of recombination and excision of repeats in the circular form.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith Ch., Vinograd J. A small polydisperse circular DNA of *HeLa* cells // J. Mol. Biol.—1972.—69, N 2.— P. 163—178.
2. Stanfield Sh., Helinski D. R. Small circular DNA in *Drosophila melanogaster* // Cell.—1976.—9, N 2.— P. 333—345.
3. Molecular cloning and characterization of small polydisperse circular DNA from mouse 3T6 cells // P. Sunnerhagen, R. M. Sjöberg, A. L. Kalsson et al. // Nucl. Acids Res.—1986.—14, N 20.— P. 7823—7838.
4. Stanfield Sh., Helinski D. R. Cloning and characterization of small circular DNA from Chinese hamster ovary cells // Mol. and Cell. Biol.—1984.—4, N 1.— P. 173—180.
5. Kunisada T., Yamagishi H. Sequence repetition and genomic distribution of small polydisperse circular DNA purified from *HeLa* cells // Gene.—1984.—31, N 3.— P. 213—223.
6. Riabowol K., Shmookler R. R., Goldstein S. Interspersed repetitive and tandemly repetitive sequences are differentially represented in extrachromosomal covalently closed circular DNA of human diploid fibroblasts // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 15.— P. 5563—5584.

7. Delap R. J., Rush M. G. Change in quantity and size distribution of small circular DNAs during development of chicken bursa // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 12.—P. 5855—5859.
8. Weiberg F. C., Sunnerhagen P., Bjursell G. New, small circular DNA in transfected mammalian cells // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 2.—P. 653—662.
9. Extrachromosomal circular DNAs in interspecific mouse-rat reconstituted cells / H. Yamagishi, T. Kunisada, M. Tosu, S. Toyozo // Gann. Jap. J. Cancer Res.—1984.—75, N 1.—P. 36—42.
10. Bell G. J., Karam J. H., Rutter W. J. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 9.—P. 5759—5763.
11. Kujalos F. C., Jones C. W., Efstradiatis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 6.—P. 1541—1552.
12. Labelling DNA to high specific *in vitro* by nick-translation with DNA polymerase I / P. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.—1977.—113, N 1.—P. 237—251.
13. Telegov G. D., Maliuta S. S. HeLa minicircular DNA cloning in *Escherichia coli* cells and analysis of recombinant clones obtained // Proc. 4th Soviet-Italian Symp.—Pushchino, 1986.—P. 65—68.
14. Kiyama R., Okumura K., Matsui H. Nature of recombination involved in excision and rearrangement of human repetitive DNA // J. Mol. Biol.—1987.—198, N 4.—P. 589—598.
15. Jones R., Potter S. LI sequences in HeLa extrachromosomal circular DNA: evidence for circularization by homologous recombination // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 7.—P. 1989—1993.
16. Krolewski J. J., Rush M. G. Some extrachromosomal circular DNAs containing the *Alu* family of dispersed repetitive sequences may be reverse transcripts // J. Mol. Biol.—1984.—174, N 1.—P. 31—40.
17. Varshavsky A. On the possibility of metabolic control of replicon «misfiring». Relationship to emergence of malignant phenotypes in mammalian cell lineages // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 6.—P. 3673—3677.
18. Fujimoto Sh., Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor  $\alpha$ -chain gene rearrangements // Nature.—1987.—327, N 6119.—P. 242—244.
19. Okazaki K., Sakano H. Thymocyte circular DNA excised from T cell receptor  $\alpha$ - $\beta$ -gene complex // EMBO J.—1988.—7, N 6.—P. 1669—1674.
20. Okazaki K., Davis D. D., Sakano H. T cell receptor  $\beta$ -gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining // Cell.—1987.—49, N 4.—P. 477—485.
21. Иванов П. Л., Акуличев А. В., Рысков А. П. Экспрессия повторяющихся последовательностей генома в клетках мозга крысы: клонирование и характеристика кДНК-копии транскрипта элемента LI // Генетика.—1987.—23, № 8.—С. 1349—1359.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 08.06.89