

25. Kaufmann S. H., Coffey D. S., Shaper J. H. Considerations on the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex-lamina.—*Exp. Cell Res.*, 1981, **132**, N 1, p. 105—123.
26. Вокуркова Н., Збарский И. Б. Особенности электрофоретической картины белков ядерного матрикса гепатомы 27 крыс и действие на нее некоторых ингибиторов протеиназ.—*Вопр. мед. химии*, 1982, **28**, № 6, с. 113—117.
27. Fields A. P., Kaufmann S. H., Shaper J. H. Isolation, chemical characterization and immuno-localization of an acidic non-histone protein to the nucleus of rat liver nuclei.—In: 8-th Nucle(ol)ar Workshop (Banyuls, 23—30 Juin 1983). Banyuls, 1983, p. 30.
28. Gerace L., Blobel G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis.—*Cell*, 1980, **19**, N 1, p. 277—287.
29. Hemminki K. Labelling of histones and non-histones in lung nuclear matrix and chromatin fractions.—*Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1977, **358**, N 9, S. 1125—1131.
30. Кузьмина С. Н., Бульдяева Т. В., Збарский И. Б. Белки ядерного матрикса и их биосинтез в клетках печени крысы и гепатомы Зайделя.—*Биохимия*, 1980, **45**, № 8, с. 1417—1424.
31. Kuehl L. Nuclear protein synthesis.—In: *The Cell Nucleus* / Ed. H. Busch. New York : Acad. press, 1974, v. 3, p. 345—375.
32. Избирательное подавление хлорамфениколом биосинтеза белков в клетках асцитных опухолей. / Т. В. Бульдяева и др.—*Эксперим. онкология*, 1984, **6**, № 4, с. 35—38.

Ин-т биология развития
им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Получено 03.09.84

УДК 577.152.5

ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

В. В. Терских, И. Б. Бронштейн,
И. И. Громова, А. В. Тимофеев, К. А. Кафиани

Введение. ДНК-топоизомеразы представляют собой своеобразную группу генетических ферментов, которые катализируют переходы между различными конформационными или топологическими формами ДНК. Основные реакции, катализируемые топоизомеразами: суперспирализация или релаксация кольцевых двухцепочечных молекул ДНК, катенация и декатенация (зацепление и разъединение) одно- и двухцепочечных колец ДНК, завязывание и развязывание узлов в кольцевых молекулах ДНК, соединение двух одноцепочечных колец с комплементарной последовательностью в полностью дуплексную кольцевую молекулу [1—3]. Топоизомеразы также способны осуществлять инсерцию и эксцизию вирусных ДНК и соединение цепей ДНК с образованием новых последовательностей. Благодаря наличию таких активностей ДНК-топоизомеразы могут играть весьма важную роль в таких основных генетических процессах, как репликация, рекомбинация, репарация и транскрипция, а также в структурных перестройках ДНК в составе хроматина.

Большинство реакций, осуществляемых топоизомеразами, связано с переносом сегментов цепей ДНК с одной стороны замкнутой структуры на другую, что требует внесения временных одноцепочечных (в случае топоизомераз I типа) или двухцепочечных (в случае топоизомераз II типа) разрывов фосфодиэфирной связи в ДНК, которая затем замыкается ферментом. Энергия, нужная для восстановления фосфодиэфирной связи, сохраняется в промежуточном ковалентном фермент-субстратном комплексе, обычно в фосфотирозинового связи между молекулой фермента и одним из возникших концов цепи в месте ее разрыва [4]. Собственно конформационные изменения ДНК могут не требовать макроэргических кофакторов, а происходить за счет свободной энергии суперспирализации (в случае топоизомераз I типа), но могут и нуждаться в АТФ (топоизомеразы II типа).

Функции топоизомераз в животных клетках практически не изучены. Для выяснения этих функций необходимо использование клеточ-

ных систем, осуществляющих определенные генетические, онтогенетические либо физиологические функции или процессы и позволяющих выделить, идентификацию и анализ ферментов и ДНК-последовательностей, с которыми данный фермент взаимодействует.

Одной из важнейших функций клетки является деление. Сведения об участии топоизомераз в процессах клеточной репродукции противоречивы: по одним данным [5—8] активность топоизомераз коррелирует, а по другим [9] — не коррелирует с пролиферативной активностью клеток. В настоящей работе изучались топоизомеразы фибробластов китайского хомячка в связи с их пролиферативной активностью. Ниже приводятся свидетельства в пользу участия топоизомеразы типа I в подготовке клеток к делению.

В данной статье описано также выделение ДНК-последовательностей, которые связываются с топоизомеразой при реакции *in vitro*. Разработка такой техники открывает путь к выделению и идентификации тех участков хромосомной ДНК, которые преимущественно взаимодействуют с топоизомеразой в живой клетке и тем самым к выяснению конкретных функций топоизомераз в превращениях и экспрессии ДНК.

Материалы и методы. Культура клеток. Использовали перевиваемую культуру фибробластов китайского хомячка, линия 431. Стационарные культуры получали, выращивая клетки во флаконах в среде 199, содержащей 0,5 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в течение 6—7 дней. Клеточную пролиферацию стимулировали сменой истощенной среды на свежую, содержащую 10 % ЭТС. В качестве контрольных использовали нестимулированные культуры. В разные сроки после стимуляции клетки снимали со стекла резиновым шпателем в буфере NaCl — 150 мМ, Na-P — 10 мМ, pH 7,6 и три раза промывали в том же буфере. Из полученной суспензии отбирали пробы клеток, фиксировали их 70 %-ным этанолом и окрашивали красителем Hoechst 33258. Пролиферативную активность определяли методом точной цитофлуориметрии (ЦФМ) на приборе Epics-TM (Coultronix) по гистограммам относительного распределения клеток по фазам пролиферативного цикла.

Выделение и очистка топоизомеразы I. Для выделения фермента клетки исходной суспензии осаждали при 4000 g и суспендировали в буфере Na-P — 5 мМ, pH 7,2, MgCl₂ — 5 мМ, ДТТ — 1 мМ, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) — 1 мМ. Через 30 мин набухания клетки гомогенизировали в этом же буфере в стеклянном гомогенизаторе. Ядра осаждали при 2000 g 5 мин, промывали в буфере Na-P — 5 мМ, pH 7,2, ДТТ — 1 мМ, ФМСФ — 1 мМ, снова осаждали и суспендировали в том же буфере. К суспензии добавляли ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ и равный объем буфера трис-HCl — 50 мМ, pH 7,5, NaCl — 2 М, ДТТ — 5 мМ, ФМСФ — 1 мМ. Для осаждения ДНК из лизата добавляли равный объем буфера трис-HCl — 50 мМ, pH 7,5, NaCl — 1 М, полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000) — 18 %, ДТТ — 5 мМ, ФМСФ — 1 мМ. Через 40 мин выпавший осадок удаляли центрифугированием при 5000 g 20 мин. Надосадочную жидкость наносили на колонку с гидроксипатитом (НТР, «Bio-Rad», США) 1,5×5 см, уравновешенным 20 мМ K-P буфером с 5 мМ ДТТ и 10 % глицерина. Для элюции белка использовали градиент K-P — 0,02—1 М объемом 50 мл. Активные фракции, содержащие топоизомеразу I типа, диализовали против буфера трис-HCl — 25 мМ, pH 7,2, ДТТ — 5 мМ, глицерин — 10 %, ЭДТА — 1 мМ, NaCl — 0,2 М. Отдиализованный ферментный препарат наносили на колонку с гепарин-сефарозой (1×2,5 см) со скоростью 4 мл/ч. Топоизомеразу элюировали 30 мл градиента 0,2—2,0 М NaCl со скоростью 1,8 мл/ч. Фракции, содержащие топоизомеразу, объединяли и диализовали против буфера трис-HCl — 50 мМ, pH 7,2, ДТТ — 5 мМ, ЭДТА — 1 мМ, глицерин — 20 %. Для длительного хранения в препарат добавляли БСА до конечной концентрации 200 мкг/мл. Концентрации белка определяли по Бредфорду [10].

Выделение плазмидной и клеточной ДНК. Немеченную и меченную ³H-тимидином ДНК плазмиды pBR322 выделяли как описано ранее [11, 12]. Для выделения ДНК из фибробластов китайского хомячка клетки отмывали от среды буфером трис-HCl — 25 мМ, pH 7,6, NaCl — 0,15 М и осаждали центрифугированием при 4000 g 15 мин. Клеточный осадок суспендировали в буфере SEDTA: NaCl — 0,1 М, NaOH — 0,05 М, ЭДТА — 0,05 М, pH 7,8, снова осаждали и суспендировали

в том же буфере и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. После гомогенизации добавляли NaCl, SDS и протеиназу К до конечной концентрации 0,25 М, 0,2 % и 100 мкг/мл соответственно. Инкубацию с протеиназой проводили 3 ч при 37 °С и 20 ч при 25 °С. После двух депротеинизаций фенолом ДНК диализовали против буфера трис-НСl — 20 мМ, рН 7,6, NaCl — 80 мМ, ЭДТА — 10 мМ. Обработку РНКазой проводили при 37 °С 3 ч (концентрация РНКазы 100 мкг/мл). ДНК после 4-кратной фенольной депротеинизации осаждали этанолом.

Фрагменты ДНК получали дроблением ультразвуком 22 кГц, 2,5 мин в буфере трис-НСl — 10 мМ, рН 7,5, ЭДТА — 0,1 мМ, концентрация ДНК составляла 0,5 мг/мл. Размер полученных фрагментов определяли электрофорезом в агарозном геле. В качестве маркеров использовали HindIII — гидролизат ДНК фага λ и AluI — гидролизат рBR322.

Электрофорез ДНК. Электрофорез проводили в агарозном геле (1 % -ном — для определения топоизомеразной активности; 1,8 % -ном — для определения размера фрагментов) в буфере трис-НСl — 40 мМ, рН 7,8, Na-ацетат — 20 мМ, ЭДТА — 2 мМ. После электрофореза ДНК в геле окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Образование и выделение ковалентных комплексов топоизомеразы с ДНК. Реакционная смесь объемом 250 мкл содержала 50 или 135 мМ NaCl, 50 мМ трис-НСl, рН 7,1, 0,5 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ, 10 % глицерина, 20 мкг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА), 300 ед. топоизомеразы, 20 мкг ^3H -рBR322 ДНК. Через 20 мин инкубации при 30 °С реакцию останавливали 25 мкл 0,5 М NaOH и нейтрализовали средой 25 мкл 0,5 М HCl и 25 мкл 0,5 М трис-НСl, рН 7,5. После остановки реакции объем доводили до 500 мкл 10 мМ трис-НСl, рН 7,5. Центрифугировали на Spinco L2 65 В в роторе SW-65 40 ч при 35000 об/мин и 4 °С. Радиоактивность определяли на фильтрах в толуоловом сцинтилляторе.

Определение релаксирующей активности топоизомеразы I. Реакционная смесь для определения топоизомеразной активности содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 200 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 0,5 мМ ЭДТА, 20 % глицерина, 100 мкг/мл БСА, 0,5—1,0 мкг суперспиральной ДНК рBR322. Реакцию проводили в 10 мкл при 30 °С и останавливали добавлением 25 мкл смеси, содержащей SDS (2 %), 10 % фикола, 10 мМ ЭДТА и бромфеноловый синий.

Определение декатенирующей активности топоизомеразы II. Реакцию декатенирования проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 120 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 3 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 10 % глицерина, 2 мкг ДНК кинетоластов трипанозомиды *Criethidia oncopelti*. О наличии активности судили по выщелению макс- и миникольц из сети кинетоластной ДНК.

Результаты и обсуждение. Динамика топоизомеразной активности при индуцированной пролиферации в культуре клеток. Чтобы выяснить отношение ДНК-топоизомераз к механизмам регуляции клеточных делений, мы использовали культуру фибробластов китайского хомячка, стимулированную к пролиферации, как описано в разделе «Материалы и методы». Рис. 1 показывает, что массовое вступление клеток в S-фазу наступает на 20-м часу после смены среды. Активность топоизомеразы I типа определяли в частично очищенных ядерных экстрактах, так как ранее было обнаружено, что сырые ядерные экстракты не проявляют активности с ДНК рBR322, видимо, вследствие наличия ингибитора в ядрах. Удельная активность ядерной топоизомеразы, определяемая по релаксации суперспиральной плазмидной ДНК, быстро повышается уже к 4-му часу и достигает максимума на 10-м часу после смены среды, а затем медленно понижается. Таким образом, топоизомеразная активность — один из параметров раннего ответа клеток на пролиферативный стимул.

Чтобы проверить возможное влияние утечки фермента из ядер при их выделении на результаты и (или) наличие топоизомеразной активности в цитоплазме клеток, определяли релаксирующую активность в постъядерной фракции в каждой из использованных порций клеток (после осаждения ядер в 5 мМ Na-P-буфере). С плазмидной ДНК рBR322 она не определялась и могла быть выявлена лишь с ДНК вируса SV40, которая, по нашим данным, является намного луч-

шим субстратом для топоизомеразы I клеток китайского хомячка, чем ДНК рBR322. Кривая 2 на рис. 1 показывает изменения топоизомеразной активности в цитоплазме стимулированных клеток, определенной по релаксации ДНК SV40, и позволяет заключить, что форма кривой 1 не зависит от возможной утечки фермента из ядерной в цитоплазматическую фракцию.

Таким образом, в клетках, стимулированных к пролиферации смешанной среды, происходит сильная активация (или синтез *de novo*) ядерной топоизомеразы I, пик которой приблизительно на 10 ч опережает ник пролиферативной активности. Полученный результат согласуется с высказанной еще Виноградом и Вонгом [1—3] идеей о значении

Рис. 1. Изменения топоизомеразной активности в клеточном цикле фибробластов китайского хомячка: 1 — активность топоизомеразы (% релаксированной ДНК рBR322), отнесенная к единице белка в надосадочной жидкости после осаждения ПЭГ-6000 нуклеиновых кислот и части белков из лизата выделенных ядер; 2 — процент клеток в S—G₂-фазах клеточного цикла, определенный путем ЦФМ; 3 — активность топоизомеразы в цитоплазме. По оси абсцисс — время после смены среды с 0,5 % ЭТС на среду с 10 % ЭТС.

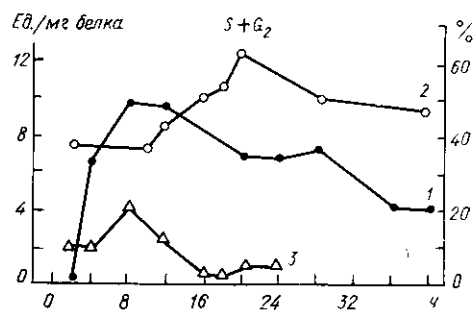


Fig. 1. Topoisomerase activity during the cell cycle of Chinese hamster fibroblasts: topoisomerase activity (% of relaxed DNA pBR322) per unit of protein in the supernatant after PEG-6000 precipitation of nucleic acids and some proteins from the lysate of isolated nuclei (1); percentage of cells in S-G₂ phases of cell cycle determined by cytophotometry (2); topoisomerase activity in the cytoplasm (3). Abscissa: the time after 10% embryonic serum addition.

суперспирализации в контроле репликации ДНК. В разное время появлялись как подтверждения, так и опровержения этой идеи. Результаты опытов с клетками яичников китайского хомячка, где было выявлено влияние этидия бромидна на репликацию ДНК [13], свидетельствовали о значении суперспирализации в этом процессе, а угнетение репликации ДНК в этих клетках новобиоцином указывало на топоизомеразы как на фактор контроля синтеза ДНК [14]. Определение топоизомеразной активности (без дифференцирования типа фермента) в синхронизированных лимфоцитах человека показало высокую активность в S-фазе и низкую — в G₀ и G₁ [6]. Обнаружение значительной части топоизомеразной активности ядра, прочно связанной с мембранной фракцией (фракция содержит малую часть ядерной ДНК и обладает способностью к репликации *in vitro*), указывает на топоизомеразу как на компонент аппарата репликации хромосомной ДНК [15]. В более поздних работах проводили дифференцирование топоизомераз I и II типов, и эти работы не выявили роли топоизомеразы типа I в контроле синтеза ДНК и клеточной пролиферации. Так, в регенерирующей печени крыс, по данным Шампу [9] и Дюге с сотр. [5, 6], активность типа I не коррелирует с синтезом ДНК, тогда как активность типа II обнаруживает четкую корреляцию [5]. Корреляция активности топоизомеразы I с пролиферативной активностью была ранее показана также для животных клеток в культуре. В работе [7] с фибробластами человека и мыши при стимуляции делений эпидермальным фактором роста были выявлены изменения активности топоизомеразы II с динамикой, близкой к описанной нами динамике активности топоизомеразы I в стимулированных фибробластах китайского хомячка. Таким образом, участие топоизомеразы I в контроле синтеза ДНК и пролиферации показано здесь впервые.

Механизм роста топоизомеразной активности, происходящего при стимуляции клеточных делений, неясен. В случае дробящихся яиц морского ежа, где ооцит содержит лишь небольшой запас топоизоме-

раз, а после оплодотворения totalная активность возрастает (при циклических колебаниях топоизомеразной активности, коррелирующих с S-периодами) в 400 раз параллельно росту числа клеток, по-видимому, происходит синтез топоизомераз *de novo* [8].

Учитывая низкий уровень активности топоизомеразы I в покоящихся клетках (рис. 1), можно предположить, что и в нашей клеточной системе рост топоизомеразной активности также обеспечивается синтезом фермента. В отношении фибробластов человека и мыши, сти-

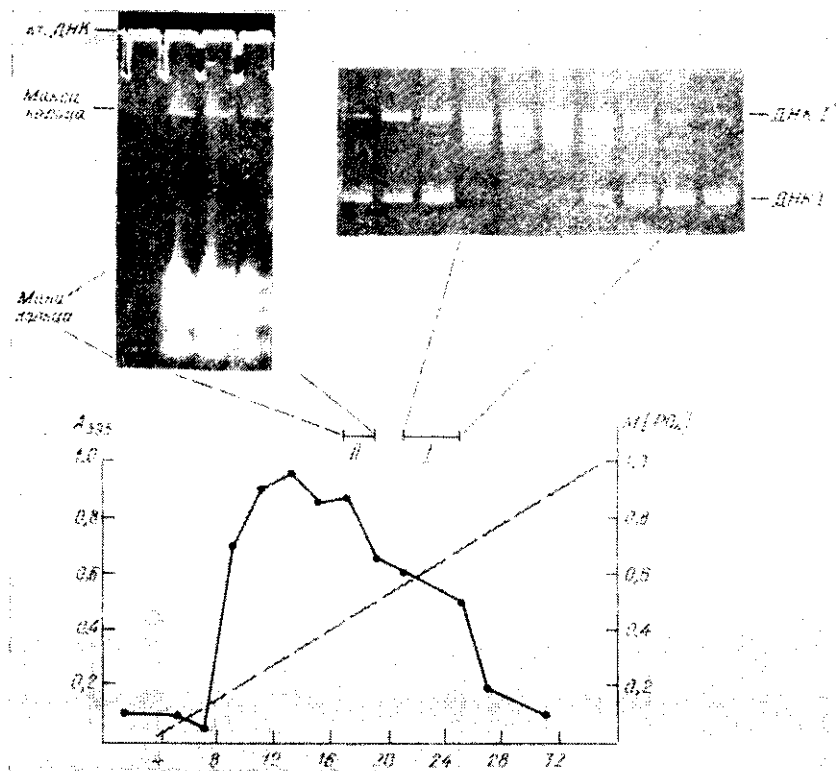


Рис. 2. Разделение топоизомераз I и II типа на гидроксипатите и определение их активности электрофоретическим анализом продуктов реакции релаксации ДНК рBR322: I — топоизомеразная активность I типа; II — топоизомеразная активность II типа; ДНК I — суперспиральная ДНК рBR322; ДНК II — релаксированная ДНК рBR322; кт. ДНК — кинетопластная ДНК *Crithidia oncopelti*. Концентрация белка определена по Бредфорду [10].

Fig. 2. Separation of topoisomerase I and II on hydroxylapatite and their activity determined by electrophoretic analysis of DNA pBR322 relaxation products: I — topoisomerase I activity; II — topoisomerase II activity; ДНК I — supertwisted DNA pBR322; ДНК II — relaxed DNA pBR322; кт. ДНК — kinetoplast DNA *Crithidia oncopelti*. The concentration of protein was determined according to Bradford [10].

мулированных эпидермальным фактором роста, имеется свидетельство в пользу биосинтеза топоизомеразы II, так как повышение ее активности наблюдается сначала в полирибосомах, а затем в ядре [7]. Изучение механизма контроля уровня топоизомераз в стимулированных клетках составит предмет наших дальнейших исследований.

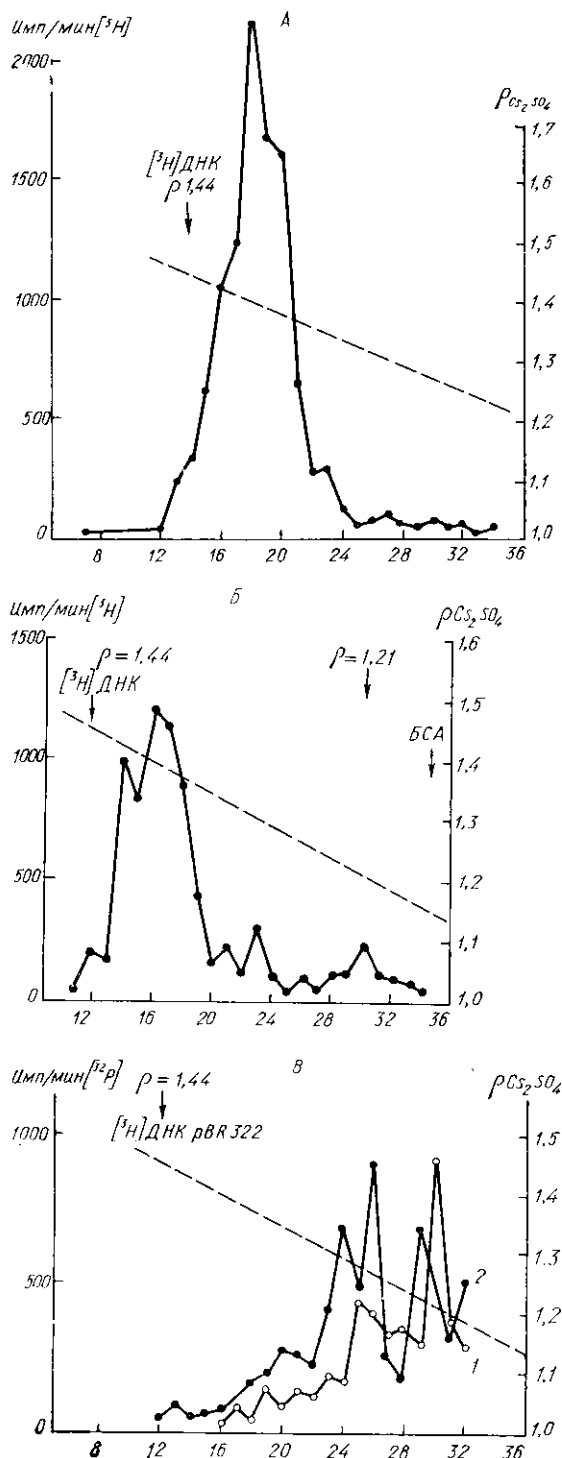
Выделение и характеристика ковалентных комплексов топоизомеразы I с плазмидной и клеточной ДНК. Исходя из вероятной роли ДНК-топоизомераз в регуляции пролиферации и в генетических процессах, большой интерес представляет изучение сайт-специфичности этих ферментов при их действии *in vitro* и определение ДНК-последовательностей, с которыми топоизомеразы взаимодействуют *in vivo* в тех или иных генетических, онтогенетических или физиологических ситуациях. Удобную возможность

изучать эти вопросы создает сам механизм топоизомеразной реакции, а именно образование ковалентного комплекса фермента с ДНК как промежуточного этапа реакции [1—3, 9]. Это обстоятельство не только освобождает исследователя от необходимости применения химических реагентов или таких воздействий, как УФ-облучение, необходимых при изучении аналогичных вопросов в отношении других белков (гистонов, негистоновых белков и т. д.), но и позволяет однозначно идентифицировать ДНК-последовательности, с которыми фермент взаимодействует *in situ*.

В наших экспериментах использовали высокоочи-

Рис. 3. Образование топоизомеразой I ковалентного комплекса с ДНК рBR322 (центрифугирование в градиенте плотности Cs_2SO_4). А, Б. Топоизомеразную реакцию проводили и останавливали, как описано в «Материалах и методах» (А — в присутствии 50 мМ NaCl; Б — в присутствии 135 мМ NaCl). В. Фракции 28—32 (625 мкл, 650 имп.) объединяли и диализовали против буфера 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ NaCl. Реакцию фосфорилирования проводили при 37°C 30 мин в 250 мкл (50 мМ трис-НСl, рН 9,6, 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ ДТТ, 70 имп. ^3H -ДНК из диализованных фракций 30—34, 5 мкКи ^{32}P -АТФ с удельной активностью 500 Ки/мМ) с 3 ед. полинуклеотидкиназы. После фосфорилирования образец делили на две части. К одной из них добавляли NaCl и протеиназу К до конечных концентраций 100 мМ и 300 мкг/мл соответственно. Инкубировали при 37°C 60 мин. 1 — фосфорилированный ДНК-топоизомеразный комплекс без обработки протеиназой К; 2 — фосфорилированный ДНК-топоизомеразный комплекс, обработанный протеиназой К. Центрифугирование и измерение радиоактивности проводили как описано выше. В качестве маркера использовали ^3H -ДНК рBR322 и БСА.

Fig. 3. Covalent complex formation between topoisomerase I and pBR322 (Cs_2SO_4 density gradient centrifugation).



щенный препарат топоизомеразы I, свободный от ДНКаз и топоизомеразы II типа, полученный, как описано выше. Для реакции применяли суперспиральную ДНК рBR322, меченную *in vivo* ^3H -тимидином, который добавляли в культуру *E. coli* во время амплификации плазмиды. Реакцию с топоизомеразой останавливали защелачиванием и смесь подвер-

гали равновесному ультрацентрифугированию в градиенте плотности Cs_2SO_4 . Результаты этой части работы представлены на рис. 3.

Рис. 3 показывает, что меченный ^3H материал распределяется в зоне между свободной ДНК и свободным белком, то есть этот материал имеет значения плавучей плотности, свойственные ДНК-белковым комплексам с широким распределением весовых соотношений белок—ДНК. Распределение значений плавучей плотности комплексов зависит от величины ионной силы при топоизомеразной реакции (рис. 3, А, Б).

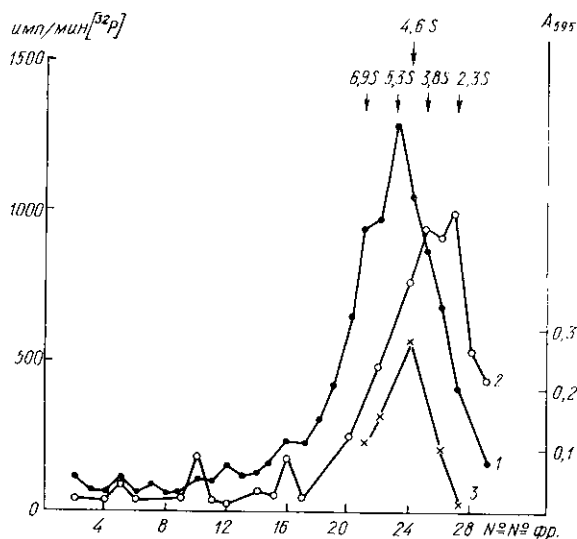


Fig. 4. Analysis of nuclease-stable part of DNA-topoisomerase complex by sedimentation in 20-40 % glycerine gradient BSA (3); DNA-protein complex treated with DNase II (1); DNA-protein complex treated with DNase II and proteinkinase K (2).

Рис. 4. Анализ нуклеазоустойчивой части ДНК-топоизомеразного комплекса седиментацией в 20—40 % -ном глицериновом градиенте. Обработку комплекса ДНКазой II (100 мкг/мл) проводили в 75 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4,9, при 37 °C в течение 24 ч. После окончания реакции диализовали против 50 мМ трис-HCl, pH 9,5 и фосфорилировали полинуклеотидкиназой, как описано выше. Образец делили на две части, одну из которых обрабатывали протеинкиназой K (1,3 мг/мл) при 37 °C 12 ч. Глицериновый градиент (20—40 %) готовили на буфере трис-HCl—50 мМ, pH 7,2, NaCl—1 М, ЭДТА—1 мМ. Центрифугировали в роторе SW-65 24 ч при 52000 об/мин. 3—БСА; 1—ДНК-белковый комплекс, обработанный ДНКазой II; 2—ДНК-белковый комплекс, обработанный ДНКазой II и протеинкиназой K.

Все показанные на рис. 3, Б ^3H -ДНК-содержащие фракции могут быть дополнительно помечены путем инкубации с γ -меченой АТФ и полинуклеотидкиназой, из чего следует, что фермент образует свободные 5'-гидроксильные концы, а сам связывается с 3'-фосфатной группой в месте разрыва фосфодиэфирной связи в ДНК.

Продемонстрированный метод позволяет выделять и характеризовать даже очень малые количества материала из любой интересующей зоны градиента плавучей плотности. В качестве примера на рис. 3Б показаны результаты опыта, где зона с плавучей плотностью 1,21 г/см³, содержащая лишь 40 имп/мин⁻¹ меченной ^3H ДНК, была фосфорилирована при помощи полинуклеотидкиназы и подвергнута повторному центрифугированию в градиенте Cs_2SO_4 (рис. 3, В). Меченный ^3P материал, содержащий более 1000 имп/мин, выявляется чаще в той же плотностной зоне, свидетельствуя о реальности выделения индивидуальных по составу комплексов по данной методике.

В выделенном указанным путем материале можно изучать как белковый, так и нуклеиновый компоненты комплексов топоизомеразы — ДНК. Так, рис. 3, В показывает, что связь фермента с ДНК сохраняется при обработке фосфорилированных по ДНК комплексов протеиназой K: частичный протеолиз таких комплексов приводит к повышению средней плавучей плотности, но лишь малая часть меченой ДНК появляется в зоне свободной ДНК.

Для характеристики белковой части комплексов ДНК гидролизовали ДНКазой II, а оставшийся связанным с топоизомеразой нуклеазоустойчивый фрагмент ДНК фосфорилировали при помощи полинук-

леотидкиназы и подвергали седиментации в градиенте концентрации глицерина. Из рис. 4 видно, что коэффициент седиментации меченого таким образом фермента составляет от 5,3 S до 6,9 S. После обработки фермента протеиназой К меченный ^{32}P фрагмент сохраняется на ферменте, однако коэффициент седиментации белка снижается до 2,3—3,9 S.

В описанных опытах топоизомеразы взаимодействовала с плазмидным суперспиральным ДНК-субстратом. Для применения указанного подхода к клеточным ДНК требовалось прежде всего убедиться,

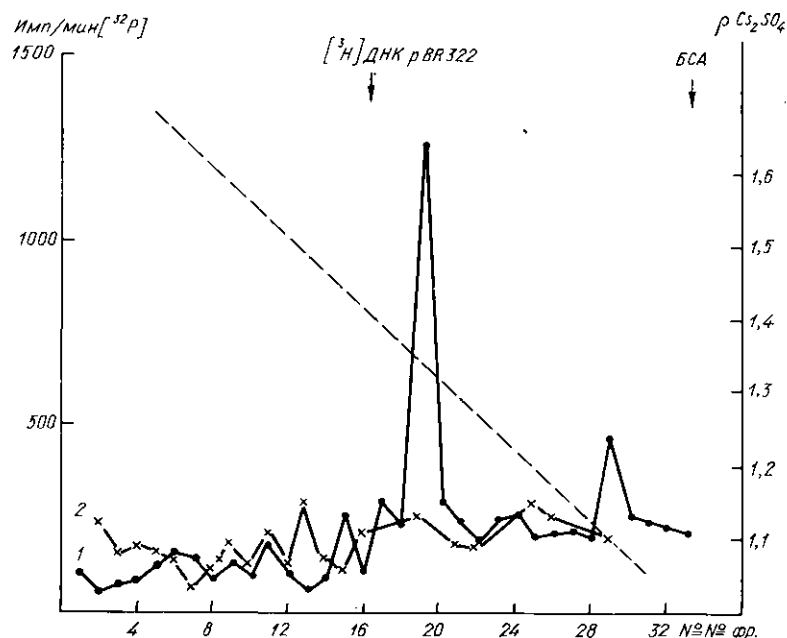


Рис. 5. Образование ковалентных комплексов между топоизомеразой I и ДНК из фибробластов китайского хомячка. Топоизомеразную реакцию проводили в 150 мМ NaCl 1 мин и останавливали добавлением NaOH. В реакции использовали фрагменты ДНК, полученные обработкой ультразвуком. После диализа фосфорилировали полинуклеотидкиназой с использованием ^{32}P -АТФ. Центрифугировали в градиенте плотности Cs_2SO_4 в роторе SW-65 48 ч при 35000 об/мин и 10°C. 1 — ДНК, обработанная топоизомеразой и полинуклеотидкиназой; 2 — ДНК, не обработанная топоизомеразой.

Fig. 5. Covalent complex formation between topoisomerase I and Chinese hamster fibroblast DNA.

что фермент способен взаимодействовать также с линейной ДНК. Для этого ядерную ДНК фибробластов китайского хомячка обрабатывали ультразвуком до образования фрагментов средней длиной 1000 пар нуклеотидов, вносили избыток гомологичной топоизомеразы I, останавливали реакцию защелачиванием и смесь центрифугировали до равновесия в градиенте плотности Cs_2SO_4 . Рис. 5 показывает, что комплексы действительно образуются, причем преобладает компонент с плавучей плотностью 1,36 г/см³. Таким образом, топоизомеразы I клеток китайского хомячка эффективно взаимодействуют с гомологичной линейной ДНК, что указывает на перспективность использования метода для изучения специфических комплексов между топоизомеразой и клеточными ДНК.

Описанный метод может также оказаться полезным для получения информации о функциональном многообразии топоизомераз путем сравнения их наборов в клетках в процессе мейоза, пролиферации, дифференцировки или канцерогенеза. Характеристика линейной части комплексов, выделенных из таких клеток, позволит выяснить сайт-специфичность действия топоизомераз и природу ДНК-последо-

вательностей, с которыми эти ферменты взаимодействуют *in situ*, так как это по существу естественный метод пришивки функционально важного белка в момент и в месте осуществления им своей функции.

DNA-TPOISOMERASES OF PROLIFERATING ANIMAL CELLS

V. V. Terskikh, I. B. Bronstein, I. I. Gromova, A. V. Timofeev, K. A. Kafiani
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Chinese hamster fibroblasts were stimulated to proliferate by adding 10% embryonic serum to the culture. Specific activity of type I topoisomerase in partially purified nuclear extracts, prepared at various times after serum addition, markedly increased, peaking at the 10th hour, 10 hours before a mass entry of the cells into the S-phase. This indicates a role of topoisomerase I in the control of cell proliferation. With the aim of developing an approach to isolation and analysis DNA sequences that are the targets for topoisomerases in the cell, complex formation between the highly purified topoisomerase I and circular supertwisted DNA (of the plasmid pBR322) or nuclear DNA of Chinese hamster fibroblasts was studied. Isolation and characterization of the complexes by sedimentation and equilibrium density centrifugation are described, which allows characterizing the protein as well as the DNA moieties of the complexes.

1. Gellert M. DNA topoisomerases.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, p. 879—910.
2. Бронштейн И. Б., Кафиани К. А. Белки, изменяющие конформацию ДНК и их предполагаемая роль в генетической рекомбинации.— *Успехи совр. биологии*, 1983, **96**, № 1, с. 13—27.
3. Терещенко О. Д., Хайдарова Н. В. ДНК-топоизомеразы эукариотов.— *Успехи совр. биологии*, 1983, **96**, № 1, с. 28—45.
4. Klevan L., Tse Y.-C. Chemical modification of essential tyrosine residues in DNA topoisomerases.— *Biochim. et biophys. acta*, 1983, **745**, N 1, p. 175—180.
5. DNA topoisomerases from rat liver: physiological variations / M. Duguet, C. Lavanot, F. Harper et al.— *Nucl. Acids Res.*, 1983, **11**, N 4, p. 1059—1075.
6. Rosenberg B. A., Ungers G., Deutsch J. F. Variations of DNA swivel activity during the mammalian cell cycle.— *Nucl. Acids Res.*, 1976, **3**, N 12, p. 3305—3311.
7. Epidermal growth factor—induced topoisomerase (s). Intracellular translocation and relation to DNA synthesis / R. Miskimins, W. K. Miskimins, H. Bernstein, N. Shimizu.— *Exp. Cell Res.*, 1983, **146**, N 1, p. 53—62.
8. Poccia D. L., LeVine D., Wang J. C. Activity of a DNA topoisomerase (nicking—closing enzyme) during sea urchin development and the cell cycle.— *Develop. Biol.*, 1978, **64**, N 2, p. 273—283.
9. Champoux J. J. Proteins that affect DNA conformation.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, **47**, p. 449—479.
10. Bradford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.— *Analyt. Biochem.*, 1976, **72**, N 2, p. 248—254.
11. Бронштейн И. Б., Шахбазян Г. К., Кафиани К. А. Выделение и свойства эндонуклеазы из яйцеклеток вьюна.— *Биохимия*, 1983, **48**, № 1, с. 92—103.
12. Шахбазян Г. К., Бронштейн И. Б., Кафиани К. А. Выделение и характеристика ДНК-топоизомеразы из ооцитов вьюна.— *Биохимия*, 1984, **49**, № 8, с. 1211—1220.
13. Mattern M. R., Painter R. B. Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. I. Effects of ethidium bromide on DNA synthesis in permeable Chinese hamster ovary cells.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, **563**, N 2, p. 293—305.
14. Mattern M. R., Painter R. B. Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. II. Effects of novobiocin on DNA synthesis in Chinese hamster ovary cells.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, **563**, N 2, p. 306—312.
15. Yoshida S., Ungers G., Rosenberg B. H. DNA swivel activity in a nuclear membrane fraction.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, **4**, N 1, p. 223—228.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва

Получено 03.09.84