

20. Dean R. T. Cellular degradative processes.— London: Chapman and Hall, 1978.— 120 p.
21. Sprinzl M., Gauss D. H. Compilation of tRNA sequences.— Nucl. Acids Res., 1984, 12, Suppl., p. 1—57.
22. Майолов С. Е. Биохимические основы злокачественности.— Л.: Медицина, 1971.— 230 с.
23. Лузиков В. Н. Регуляция формирования митохондрий.— М.: Наука, 1980.— 317 с.
24. Hay R., Bohni P., Gasser S. How mitochondria import proteins.— Biochim. et biophys. acta, 1984 779, N 1. p. 65—87.
25. Penneys N. S., Muench K. H. Tryptophanyl-tRNA synthetase of human skin.— Clin. Res., 1971, 19, N 2, p. 581—582.
26. Penneys N. S., Muench K. H. Human placental tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase. Purification and subunit structure.— Biochemistry, 1974, 13, N 3, p. 560—565.
27. Gabius H.-J., Cramer F. Purification and subunit structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from hen liver mitochondria.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 106, N 2, p. 325—330.
28. Immunological evidence for structural differences between Euglena Gracilis chloroplast valyl- and leucyl-tRNA synthetase and their cytoplasmic counterparts / B. Colas, P. Imbault, V. Sarantoglou, J. H. Weil.— FEBS Lett., 1982, 141, N 2, p. 213—216.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва
Ин-т канцерогенеза ВОИЦ АМН СССР, Москва

Получено 13.08.84

УДК 577.123

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК В ЯДРАХ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMIDIUM* 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-АМИНОНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТАМИ

М. К. Куханова, А. А. Краевский, Л. А. Терентьева, В. А. Рассказов

Введение. Мощными ингибиторами синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами (α — из тимуса теленка, β — из печени крыс и I — из *E. coli*) в системах *in vitro*, являются даНТР [1], которые после связывания с комплексом ДНК-полимераза+ДНК реагируют с 3'-концом растущей цепи. В результате этой реакции остатки 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-фосфатов включаются в 3'-положение и тем самым терминируют рост новосинтезированной цепи.

Известно также, что 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозиды с теми же основаниями, что и даНТР, подавляют синтез ДНК в эмбрионах морского ежа в системе *in vivo* [2]. По предварительным данным механизм их действия аналогичен действию даНТР, т. е. аминоклеозиды фосфорилируются и далее трифосфорилируются до даНТР и обрывают синтез ДНК по механизму терминации.

В этой работе представлены результаты исследований по действию четырех даНТР на синтез ДНК в изолированных ядрах, полученных из эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedium* на стадии подвижной бластулы. Показано, что даНТР являются ингибиторами репликативного синтеза ДНК и блокируют образование фрагментов Оказаки. Действие даНТР и агаТТР обратимо при добавлении избытка природного субстрата дТТР.

Материалы и методы. даАТР, даСТР, даГТР и даТТР синтезированы по [3] и предоставлены В. Е. Зайцевой; дАТР, дСТР, дГТР и дТТР производства НПО БАВ (Новосибирск); ddТТР фирмы «PL», США; NEM («Serva», США); [³H]дСТР фир-

Принятые сокращения: дНТР — 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (дАТР), цитозин (дСТР), гуанин (дГТР) и тимин (дТТР); даНТР — 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (даАТР), цитозин (даСТР), гуанин (даГТР) и тимин (даТТР); азТТР — 2'-дезоксид-2'-азидорботимидин-5'-трифосфат; ddТТР — 2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат; агаТТР — 5'-трифосфат 1-(β -D-арабинофуранозил)тимина; NEM — N-этилмалесимид.

мы «Изотоп», СССР, удельная активность 10 Ки/ммоль; агаТТР синтезирован по [4]; азТТР предоставлен Л. А. Александровой.

Выделение ядер из эмбрионов морского ежа и определение синтеза ДНК. Ядра из эмбрионов морского ежа на стадии подвижной бластулы выделяли по модифицированной методике [5]. Эмбрионы собирали центрифугированием (10 мин, 2000 g), промывали три раза раствором 0,9 М глюкозы с добавлением $1 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА. Осадок после центрифугирования суспендировали в буфере А (20 мМ трис-НСI, рН 8,0, 5 мМ меркаптоэтанол, 5 мМ $MgCl_2$), содержащем 0,32 М сахарозу, и гомогенизировали, пропуская суспензию 2—3 раза через шприц с иглой № 8. Разрушение эмбрионов и клеток наблюдали при микроскопировании. Гомогенат центрифугировали при 4000 g 15 мин, затем осадок, содержащий неочищенный ядерный материал, ресуспендировали в буфере А, содержащем 1,5 М сахарозу, и центрифугировали 30 мин при 14000 g. Полученный осадок суспендировали в буфере А, содер-

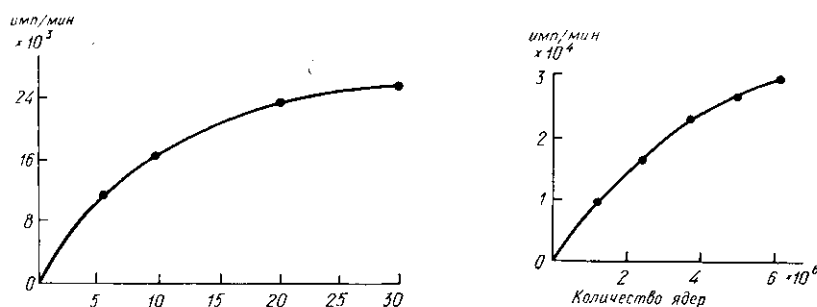


Рис. 1. Зависимость включения $[^3H]$ СТР ядрами от времени. Каждая проба содержала $4 \cdot 10^6$ ядер. Условия проведения опытов описаны в «Материалах и методах».

Fig. 1. Time dependence of incorporation of $[^3H]$ CTP by nuclei. Each sample contained $4 \cdot 10^6$ nuclei. Conditions are described in «Materials and Methods».

Рис. 2. Зависимость включения $[^3H]$ СТР ядрами от количества ядер в пробе. Время инкубации 15 мин.

Fig. 2. Dependence of incorporation of $[^3H]$ CTP by nuclei versus the amount of nuclei per sample cell. Incubation time 15 min.

жащем 0,32 М сахарозу, до концентрации $(2-3) \cdot 10^8$ ядер в 1 мл, что соответствовало ~ 125 ед. A_{260} . Для измерения оптической плотности аликвоту ядерной суспензии разбавляли 0,05 Н NaOH. Полученную суспензию использовали в опытах для изучения синтеза ДНК. Количество ядер определяли в камере Горяева (под микроскопом). В ряде опытов проводили дополнительную очистку ядер. Для этого суспензию ядер насаивали на 1,5 М сахарозу, приготовленную на буфере А, и центрифугировали 40 мин при 14000 g. В опытах использовали только свежеприготовленные ядра.

Инкубационная смесь для определения синтеза ДНК в ядрах содержала в объеме 0,1 мл 50 мМ трис-НСI, рН 7,8, 3 мМ $MgCl_2$, 2 мМ меркаптоэтанол, 2 мкКи (или $1 \cdot 10^6$ имп/мин) $[^3H]dCTP$, смесь трех dNTP (где это указано), дополнительных к радиоактивному субстрату, ингибиторы в концентрациях, указанных в подписях к рисункам и таблицам. После инкубации при $24^\circ C$ к пробам добавляли равный объем 10 %-ной ТХУ, содержащей 1 %-ный пирофосфат натрия и через 15 мин пропускали их сквозь стеклянные фильтры GF/C («Whatman», Англия). Фильтры промывали 50 мл 5 %-ной ТХУ с 1 %-ным пирофосфатом натрия.

Центрифугирование в щелочном сахарозном градиенте. Для анализа размеров ДНК, включающей радиоактивную метку, к пробам добавляли мкл 0,2 М ЭДТА, 10 мкл 20 %-ного N-лаурилсаркозина и 10 мкл 3 Н NaOH. Через 1 ч при $24^\circ C$ 0,1 мл суспензии наносили на сахарозный градиент (4,8 мл 5—20 %-ной сахарозы), содержащей 0,15 Н NaOH, 0,3 мМ ЭДТА, 0,1 %-ный N-лаурилсаркозин. Центрифугирование проводили на «Spinco» в роторе SW-65 14 ч, 37000 об/мин.

Результаты исследования. Характеристика системы синтеза ДНК в ядрах из эмбрионов морского ежа. На рис. 1 представлены данные по включению $[^3H]dCTP$ в кислотонерастворимый материал в зависимости от времени инкубации. Видно, что в течение 15—20 мин происходит увеличение уровня радиоактивности

в кислотонерастворимой фракции. На рис. 2 показана зависимость синтеза ДНК от количества ядер в пробе. Вплоть до $6 \cdot 10^6$ ядер в пробе наблюдалось увеличение включения радиоактивной метки в ДНК. Все дальнейшие опыты проводили при концентрации ядер в пробе $(2-4) \cdot 10^6$ и времени инкубации 15 мин.

Характерной особенностью синтеза ДНК ядрами из эмбрионов морского ежа на изучаемой стадии их развития является почти полное отсутствие зависимости синтеза ДНК от добавленных экзогенных dNTP (табл. 1). Как видно из этой таблицы, включение $[^3\text{H}]d\text{CTP}$ без добавления экзогенных dNTP ниже всего лишь на 5—20 % в разных опытах по сравнению с системой, в которую дополнительно внесены dNTP по 20 мкМ каждого. Поэтому в

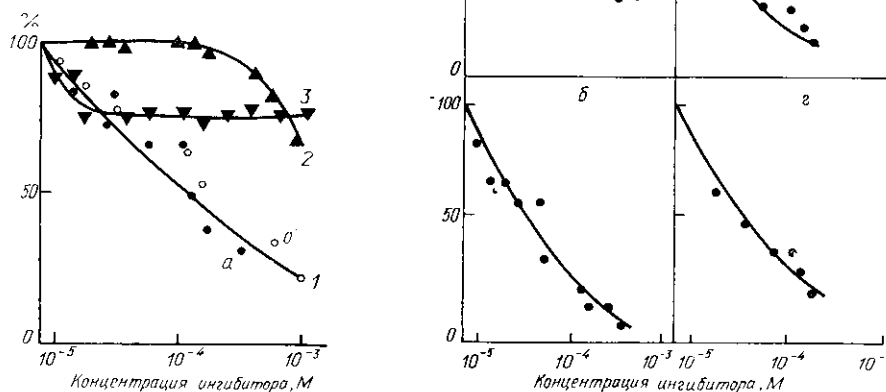


Рис. 3. Ингибирование синтеза ДНК в ядрах с помощью daTTP (1, а) и araTTP (1, б), ddTTP (2) и azTTP (3). Время реакции 15 мин, 24 °С. 100 % соответствуют 30000 имп/мин или 4,5 пмоль.

Fig. 3. Inhibition of the DNA synthesis in the nuclei by daTTP (1, a), araTTP (1, б), ddTTP (2) and azTTP (3). Incubation time 15 min at 24 °C. 100 % of incorporation correspond to 30,000 cpm or 4.5 pmoles.

Рис. 4. Ингибирование синтеза ДНК в ядрах daTTP (а), daATP (б), daCTP (в) и daGTP (г). Время инкубации 15 мин. За 100 % принято включение без ингибиторов. Fig. 4. Inhibition of DNA synthesis in the nuclei by daTTP (a), daATP (б), daCTP (в) and daGTP (г). Incubation time 15 min. Incorporation without inhibitors was taken as 100 %.

последующих опытах при изучении синтеза ДНК в присутствии ингибиторов экзогенные dNTP не добавляли (если специально не указывается).

При удалении из системы АТФ наблюдали лишь остаточный синтез, составляющий 15—25 % от синтеза в полной системе. В табл. 1 отражено действие некоторых известных ингибиторов ферментов синтеза ДНК (NEM, araTTP и ddTTP). Добавление NEM, блокирующей сульфгидрильные группы, приводило к существенному уменьшению включения $[^3\text{H}]d\text{CTP}$. До концентрации 1 мМ ddTTP не оказывал заметного действия, а araTTP в концентрации 0,5 мМ ингибировал систему на 70 %.

Действие daNTP на синтез ДНК ядрами. На рис. 3 представлены данные по ингибированию синтеза ДНК в зависимости от концентрации ингибиторов — аналогов dTTP: daTTP и araTTP подавляют синтез ДНК примерно одинаково, тогда как ddTTP и azTTP мало влияют на этот процесс. На рис. 4 показано действие каждого из четырех daNTP на репликацию и в табл. 2 приведены концентрации daNTP, подавляющие синтез ДНК на 50 %; все четыре daNTP ведут себя как весьма эффективные ингибиторы синтеза.

Рис. 5 иллюстрирует зависимость синтеза ДНК в ядрах от времени в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ М даТТР. В качестве контроля приведен синтез ДНК без ингибитора. Видно, что при данной концентрации даТТР ингибирование составляет примерно 50% независимо от времени, что свидетельствует о равновероятном взаимодействии даТТР и соответ-

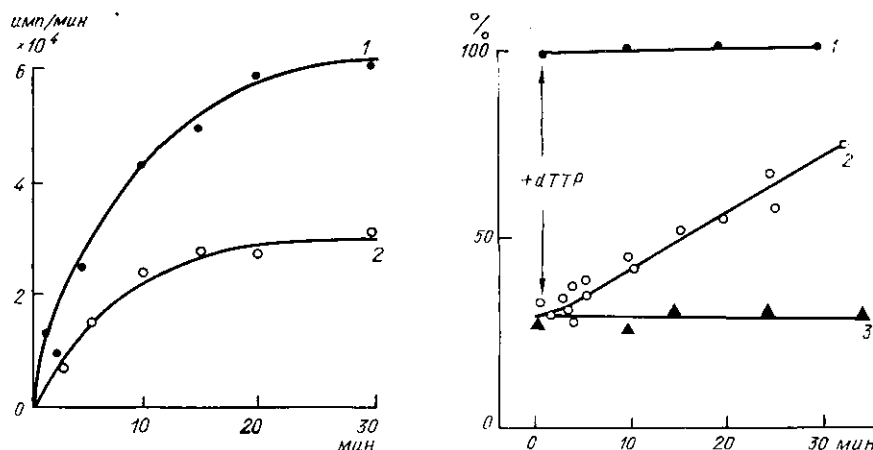


Рис. 5. Зависимость синтеза ДНК в ядрах от времени: без ингибиторов (1) и в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ М даТТР (2).

Fig. 5. Time dependence of the DNA synthesis in nuclei: without inhibitors (1), in the presence of $4 \cdot 10^{-4}$ M daTTP (2).

Рис. 6. Обратимость действия даТТР при добавлении 50-кратного по отношению к даТТР субстрата синтеза дТТР. За 100% принято включение $[^3\text{H}]$ дСТР в ДНК без ингибитора за данный промежуток времени (1); включение $[^3\text{H}]$ дСТР в пробы, содержащие $4 \cdot 10^{-4}$ М даТТР, в течение 10 мин с последующим добавлением $2 \cdot 10^{-2}$ М дТТР (2); в пробах присутствовал даТТР ($4 \cdot 10^{-4}$ М) (3).

Fig. 6. The reversibility of action of daTTP upon adding of a 50-fold excess of dTTP with respect to daTTP. Incorporation of $[^3\text{H}]$ CTP to DNA without inhibitors within a given time was taken as 100% (1); incorporation of $[^3\text{H}]$ dCTP in the sample that contained $4 \cdot 10^{-4}$ M daTTP within 10 min with a subsequent addition of $2 \cdot 10^{-2}$ M dTTP (2); daTTP ($4 \cdot 10^{-4}$ M) was present in a sample cell (3).

вующего субстрата дТТР с ДНК-синтезирующим комплексом. Через 20 мин реакция практически заканчивается в обоих случаях.

Обратимость действия даТТР и агаТТР. На рис. 6 и 7 представлены данные по обратимости действия даТТР и агаТТР на синтез ДНК в ядрах. К пробам, содержащим $4 \cdot 10^{-4}$ М даТТР или

Таблица 1

Влияние экзогенных dNTP и других соединений на включение в ДНК $[^3\text{H}]$ дСТР ядрами эмбрионов в полной системе

The Effect of Exogenous dNTPs and Other Compounds on the Incorporation of $[^3\text{H}]$ dCTP in DNA of Embryo Nuclei in a Complete System

Условия	Включение радиоактивной метки, %
Полная система	100
+20 мкМ dNTP	105—125
+10 мкМ dNTP	105
-АТР	20—25
+0,8 мМ NEM	40
+2,0 мМ NEM	25
+1,0 мМ ddTTP	75—85
+0,5 мМ агаТТР	30

Таблица 2

Концентрация ингибиторов, при которой подавление синтеза ДНК составляет 50% от контроля

Concentration of Compounds which Inhibits the DNA Synthesis by 50% Against the Control

Вещество	Концентрация ингибитора, М
даТТР	$2 \cdot 10^{-4}$
даАТР	$6 \cdot 10^{-5}$
даСТР	$2 \cdot 10^{-5}$
даГТР	$5 \cdot 10^{-5}$
агаТТР	$1 \cdot 10^{-4}$
азТТР	$(1-2) \cdot 10^{-3}$

Примечание. Полная система включала: солевую смесь, АТР и ядра, как это указано в разделе «Материалы и методы». За 100% принято включение радиоактивной метки, составляющее $(25-35) \cdot 10^3$ имп/мин или 20 пмолей.

$2 \cdot 10^{-4}$ М araTTP, через 10 мин добавляли субстрат синтеза ДНК dTTP в концентрации, превышающей концентрацию ингибитора в 50—100 раз, и определяли зависимость синтеза ДНК от времени. Видно, что через 2—3 мин после добавления dTTP включение $[^3\text{H}]$ dCTP в кислотонерастворимую фракцию в обоих случаях начинает возрастать (кривая 2) и через 25 мин инкубации радиоактивность в пробе составляет в случае daTTP 60—70 %, а в случае araTTP — 75—90 % от радиоактивно-

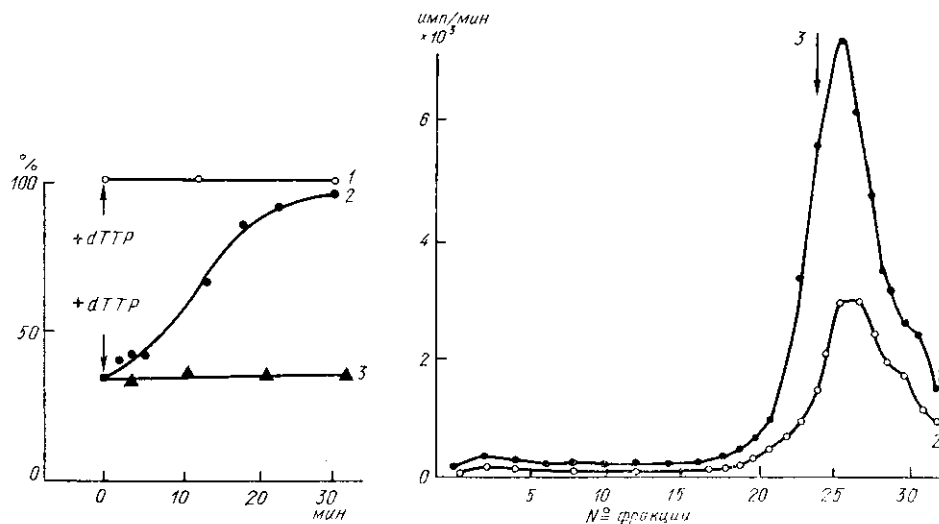


Рис. 7. Обратимость действия araTTP при добавлении 100-кратного по отношению к araTTP субстрата dTTP. Обозначения для кривой 1, как на рис. 6; 2 — включение $[^3\text{H}]$ dCTP в пробы, содержащие $2 \cdot 10^{-4}$ М araTTP, в течение 10 мин с последующим добавленным dTTP ($1,6 \cdot 10^{-2}$ М); 3 — пробы, содержащие araTTP ($2 \cdot 10^{-4}$ М).

Fig. 7. Reversibility of action of araTTP upon adding of a 100-fold excess of dTTP with respect to araTTP. Designation for curve (1) as in Fig. 6; incorporation of $[^3\text{H}]$ dCTP in the samples containing $2 \cdot 10^{-4}$ М araTTP within 10 min with a subsequent addition of $1,6 \cdot 10^{-2}$ М dTTP (2); samples with araTTP ($2 \cdot 10^{-4}$ М) (3).

Рис. 8. Анализ величины фрагментов ДНК, включающих $[^3\text{H}]$ dCTP, в щелочном градиенте плотности сахарозы. Условия описаны в разделе «Материалы и методы»: 1 — распределение радиоактивности в градиенте после инкубации ядер с $[^3\text{H}]$ dCTP; 2 — то же в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ М daTTP; 3 — положение маркера tРНК.

Fig. 8. Analysis of sizes of DNA fragments containing radioactivity in alkaline gradient of sucrose density. Conditions are described in «Materials and Methods». Distribution of radioactivity in gradient after incubation of nuclei with $[^3\text{H}]$ dCTP (1); the same in the presence of $4 \cdot 10^{-4}$ М daTTP (2); location of tRNA marker (3).

сти в контрольных опытах, куда ингибитор не вносился (кривая 1). Включение в каждой пробе в процентах (кривая 2) рассчитывали от соответствующей точки контроля. Кривая 3 отражает данные по включению метки в пробы в присутствии ингибитора без добавления dTTP, который добавляли также в каждую пробу (кривая 1), не содержащую ингибитор. Включение $[^3\text{H}]$ dCTP практически не изменялось по сравнению с пробами без добавления dTTP.

Анализ величины фрагментов ДНК, включающих метку. На рис. 8 представлены данные анализа размеров ДНК ядер после инкубации их с $[^3\text{H}]$ dCTP без ингибитора и в присутствии daTTP. Видно, что $[^3\text{H}]$ dCTP включается в основном во фрагменты ДНК, имеющие коэффициент седиментации 4—5 S. В высокомолекулярной фракции радиоактивность составляет 4—6 % в расчете на весь радиоактивный материал градиента. Инкубация ядер в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ М daTTP приводила к заметному уменьшению включения метки во фрагменты ДНК. Уменьшение счета составляет примерно 60 %, что соответствует данным рис. 3 и 4.

Обсуждение результатов. Как видно из приведенных данных, daNTP являются достаточно мощными ингибиторами синтеза ДНК в

ядрах, полученных из эмбрионов морского ежа на стадии подвижной бластулы. Из табл. 1 и рис. 3, отражающих действие известных ингибиторов ДНК-полимераз (NEM, ddTTP и agaTTP) на синтез ДНК в ядрах, следует, что изучаемый процесс синтеза ДНК является в основном репликативным и в нем участвует ДНК-полимераза α . Так, известно, что NEM является ингибитором ДНК-полимеразы α в системе *in vitro* с очищенной полимеразой α [6] и ингибирует в значительной степени синтез ДНК в ядрах из клеток мыши L929 [7] и печени крыс [8]. В то же время NEM в концентрации до 100 мкг/мл не влияет на активность ДНК-полимеразы β из печени крыс [8], ведущей в основном репаративный синтез ДНК. В нашей системе NEM в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М подавлял синтез на 70—75 %. В табл. 1 показано, что agaTTP, второй известный тип ингибиторов ДНК-полимеразы α в системах *in vitro* и в ядрах из клеток HeLa в S-фазе [9], в нашем случае ингибировал синтез ДНК на 60—70 %. Ингибитор ДНК-полимеразы типа β ddTTP [10] подавлял включение [3 H]dCTP только на 20—25 %, причем практически полностью отсутствовала зависимость ингибирования от концентрации ddTTP в пределах $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М. Из этого следует, что выделенные ядра ведут по крайней мере на 75—80 % репликативный синтез. Остальные 20—25 % включенной метки могут отражать, по-видимому, как репаративный синтез, вызванный повреждениями ДНК при выделении ядер, так и более сложное влияние ингибиторов на ДНК-полимеразу α в ядерной системе. Такое же ингибирование ddTTP синтеза ДНК наблюдалось в лизате клеток HeLa [10].

Для синтеза ДНК ядрами, выделенными из эмбрионов морского ежа на стадии подвижной бластулы, не требуется добавления экзогенных dNTP в отличие от систем с ядрами из L-клеток мыши [11], а также из печени крыс [8], в которых синтез ДНК резко снижается при удалении даже одного из dNTP. Этот феномен можно объяснить наличием в ядрах достаточно большого пула dNTP для синтеза ДНК. В работе [12] отмечается, что неоплодотворенные яйца морского ежа содержат громадный пул dNTP, который вполне достаточен для репликации ДНК в течение двух делений. Поэтому при испытании действия daNTP в системе с ядрами смесь экзогенных dNTP не добавляли.

Данные рис. 4 и табл. 2 свидетельствуют, что все четыре daNTP являются эффективными ингибиторами синтеза ДНК в ядрах, ведущих на 70—75 % репликативный синтез и на 25—30 % репаративный. В этой системе daNTP являются, по-видимому, ингибиторами процессов обоих типов, так как в опытах *in vitro* [1] было показано, что они ингибируют как полимеразу α , так и β . Их действие сопоставимо, а в случае daCTP сильнее, чем эффект agaTTP. Различия в концентрациях daNTP, дающих 50 %-ное подавление синтеза, может быть связано с разной величиной пула dNTP в ядрах. В отличие от daNTP рибо-аналог azTTP слабо ингибировал включение [3 H] dCTP во фрагменты ДНК. Известно [13], что azATP подавлял репликацию ДНК на ранних этапах элонгации, включающих синтез рибо-прайма, но не влиял на синтез ДНК в ядрах из асцитной карциномы Эрлиха. Следовательно, ядра, используемые нами, уже имели рибо-праймеры и продолжали синтез ДНК.

Графики рис. 6 и 7 показывают, что действие agaTTP и daTTP обратимо при добавлении в систему большого избытка, по сравнению с ингибиторами, субстрата dTTP. На основании полученных данных можно полагать, что мононуклеотидные остатки из daTTP и agaTTP, включенные в 3'-конец синтезируемой цепи ДНК, подвергаются нуклеазному выщеплению и замещаются на природные тимидиловые остатки из dTTP, после чего ядра вновь могут продолжать синтез ДНК. Медленное повышение уровня синтеза ДНК свидетельствует в пользу того, что daTTP и agaTTP ингибируют синтез ДНК по терминационному механизму. Подобные эффекты обратимости действия ага-производных были описаны в работе [14], где показано, что выщепление

моноклеотидных остатков ага-нуклеотидов производится репаративной системой ядер. Учитывая данные опытов с очищенными ДНК-полимеразам *in vitro* [1], можно полагать, что daNTP действуют по тому же механизму.

Как видно из рис. 8, добавление daNTP в ДНК-синтезирующую систему значительно понижает суммарный синтез ДНК, хотя фрагменты Оказаки образуются обычной длины. Поэтому мы полагаем, что ингибирование полимеризации происходит главным образом на этапе перехода от рибо-праймеров к элонгации синтеза ДНК. Возможны, однако, и другие интерпретации замеченного явления. Одна из них предполагает, что незрелые (недостроенные) фрагменты Оказаки подвергаются более быстрому гидролизу нуклеазами.

Авторы благодарят А. В. Иткеса за полезную критику и ценные советы.

INHIBITION OF REPLICATIVE DNA SYNTHESIS IN NUCLEI
OF SEA URCHIN (*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUM*) EMBRYO
BY 2', 3'-DIDEOXY-3'-AMINONUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES

M. K. Kukhanova, A. A. Kraevsky

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

N. A. Terentieva, V. A. Rasskazov

The Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

S u m m a r y

2', 3'-dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates are shown to be inhibitors of replicative DNA synthesis in isolated nuclei of sea urchin embryo. These compounds inhibit the fragment Okazaki synthesis. The effect of 2', 3'-dideoxy-3'-aminothymidine 5'-triphosphate and arabinothymidine 5'-triphosphate is reversible when adding the corresponding substrate of DNA synthesis, 2'-deoxy-thymidine-5'-triphosphate.

1. 2', 3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases / Z. G. Chidgevadze, R. Sh. Beabcalashvili, A. M. Atrazhev et al.—Nucl. Acids Res., 1984, 12, N 3, p. 1671—1686.
2. Ингибирование биосинтеза ДНК в эмбрионах морских ежей с помощью 2', 3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов / М. К. Куханова, С. В. Кочеткова, А. А. Краевский и др.—Биохимия, 1983, 48, № 3, с. 1747—1751.
3. Аминонуклеозиды и их производные. XI. Синтез 3'-амино-2', 3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов / В. Е. Зайцева, Н. Б. Дяткина, А. А. Краевский и др.—Биоорганич. химия, 1984, 10, № 5, с. 670—680.
4. Schinazi R. F., Chen M. S., Prusoff W. H. Antiviral and antineoplastic activities of pyrimidine arabinosyl nucleosides and their 5'-amino derivatives.—J. Med. Chem., 1979, 22, N 10, p. 1273—1277.
5. The mode of action of aphidicolin on DNA synthesis in isolated nuclei / M. Oguro, M. Shioka, M. Nagano, Y. Mano.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, 92, N 1, p. 13—16.
6. Cozzarelli N. R. The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis.—Ann. Rev. Biochem., 1977, 46, p. 641—648.
7. Involvement of deoxyribonucleic acid polymerase β in nuclear deoxyribonucleic synthesis / T. R. Butt, W. M. Wood, E. L. McKay, L. P. Adams.—Biochem. J., 1978, 173, N 1, p. 309—314.
8. Zoncheddu A., Accomando R., Badaracco G. Comparison of the effects of differential inhibitors of eucaryotic DNA polymerases on DNA synthesis in isolated rat liver nuclei.—Int. J. Biochem., 1983, 15, N 3, p. 337—342.
9. Wist E., Krokan H., Prydz H. Effect of 1- β -D-arabinofuranosilcytosine triphosphate on DNA synthesis in isolated HeLa cell nuclei.—Biochemistry, 1976, 15, N 16, p. 3647—3652.
10. Wager M. A., Evans M. E., Huberman K. S. Effect of 2', 3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate on HeLa cells in vitro DNA synthesis: evidence that DNA polymerase α is the only polymerase required for cellular DNA replication.—Nucl. Acids Res., 1978, 5, N 5, p. 1933—1946.
11. Berger N. A., Johnson C. DNA synthesis in permeabilized mouse L cells.—Biochim. et biophys. acta, 1976, 425, N 1, p. 1—17.

12. Mathews C. K. Giant pools of DNA precursors in sea urchin eggs.— *Exp. Cell Res.*, 1975, **92**, N 1, p. 47—56.
13. Eliasson R. E., Pontis E., Reichard P. Replication of polyoma DNA in nuclei isolated from azidocytidine inhibited fibroblasts.— *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, N 17, p. 9044—9050.
14. Hiss E. A., Preston R. J. The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single-strand breaks in DNA of mammalian cells following irradiation or chemical treatment.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, **478**, N 1, p. 1—8.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва
Тихоокеанский ин-т биоорганич. химии
ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Получено 16.07.84

УДК 575.127:633.71:576.851

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ Т-РАЙОНА В ГИБРИДАХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ СЛИЯНИЯ НОРМАЛЬНОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОК

И. Ф. Каневский, Н. Н. Череп, М. В. Скаржинская, Ю. Ю. Глеба

Введение. Клетки корончатых галлов растений, трансформированные *Agrobacterium tumefaciens* и несущие в своем геноме Т-ДНК, способны к росту *in vitro* на питательных средах, лишенных фитогормонов [1]. Они синтезируют необычные аминокислоты, так называемые опи-пы [2—4], а некоторые опухолевые линии не способны зеленеть на свету и/или регенерировать стебли. Эти свойства клеток корончатых галлов впервые были использованы Вуллемсом с соавт. [5] для отбора внутривидовых соматических гибридов между нормальной и трансформированной клетками *Nicotiana tabacum*. Нам ранее были получены аналогичным образом межвидовые гибриды *Nicotiana tabacum* (трансформированный) + *Nicotiana plumbaginifolia* [6]. В обоих случаях отбор гибридов оказался возможным, потому что у них сохранялся признак гормоннезависимости и при этом восстанавливалась способность к позеленению/регенерации стеблей.

В данной работе изучали возможность селективного отбора гибридных линий в межвидовой комбинации видов *Nicotiana tabacum* (трансформированный) и *Atropa belladonna* L., а также экспрессию признаков, прямо или опосредованно контролируемых генами Т-ДНК, в гибридных клетках: активность лизопиндегидрогеназы; неспособность к образованию побегов; неспособность к ризогенезу; устойчивость к 2-аминоэтилцистеину, 5-бромдезоксисуридину и 5-метилтриптофану.

Материалы и методы. В качестве одного из родителей использовали клеточную линию *Nicotiana tabacum*, сорт *White Burley*, полученную в результате трансформации клосток табака октопиновым штаммом *Agrobacterium tumefaciens* B6S3, несущим плазмиду LBA2 (любезно предоставлена д-ром О. Шидером, Ин-т селекции растений Макса Планка, Кёльн, ФРГ). Опухолевые клетки выращивали на среде Линсмейера и Скуга [7], лишенной гормонов, в темноте, при 28 °С. Источником мезофильных протопластов служили асептически выращиваемые диплоидные растения красавки *Atropa belladonna* L. ($2n=72$).

Для получения каллусных и мезофильных протопластов использовали ферментные смеси и технику, описанные Глейбой и Гоффманом [8].

Активность лизопиндегидрогеназы определяли по методике, разработанной Оттеном и Шилпероортом [9]. Анализ множественных молекулярных форм амилазы проводили согласно методике электрофореза в полиакриламидных гелях по Дэвису [10].

Слияние протопластов индуцировали по методу Менцеля с соавт. [11], при помощи полиэтиленгликоля и буфера с высоким рН, высоким содержанием Ca^{2+} и 10 %-ного диметилсульфоксида (ДМСО). После слияния протопласты культивировали три недели