

8. Исследование влияния ингибиторов транскрипции и трансляции на репарацию и деграцию ДНК в облученных тимocyтах/Б. П. Иванник, Р. В. Голубева, С. Я. Проскуряков, Н. И. Рябченко.— Там же, 1976, 16, № 5, с. 483—486.
9. Saunders J. W., Fallon J. F. Cell death in morphogenesis.— In: Major problems in developmental biology /Ed. M. Locke, N. Y.: Acad. Press, 1967, p. 289—314.
10. Weber R. Biochemical characteristics of tail atrophy during anuran metamorphosis.— Colloq. int. CNRS, 1977, 266, N 1, p. 137—146.
11. Beckingham-Smith K., Tata J. R. Cell death. Are new proteins synthesized during hormone-induced tadpole tail regression? — Exp. Cell Res., 1976, 100, N 1, p. 129—146.
12. Bell P. A., Borthwick N. M. Regulation of transcription in rat thymus by glucocorticoids.— J. Steroid Biochem., 1979, 11, N 1B, p. 381—387.
13. Voris B. P., Nicholson M. L., Young D. A. Development of resistance to glucocorticoid hormones during rat thymus cell differentiation: Proteins associated with emergence of the resistant state.— Cancer Res., 1983, 43, N 3, p. 1236—1243.
14. Voris B. P., Young D. A. Glucocorticoid-induced proteins in rat thymus cells.— J. Biol. Chem., 1981, 265, N 21, p. 11319—11329.
15. Reeves R., Cserjesi P. Sodium butyrate induces new gene expression in Friend erythroleukemic cells.— Ibid., 1979, 254, N 10, p. 4283—4290.
16. Zhivotovskiy B. D., Seiliev A. A., Hanson K. P. Effect of gamma irradiation on DNA-dependent RNA polymerase activity in rat thymus cells.— Int. J. Radiat. Biol., 1982, 42, N 2, p. 199—204.
17. Radiation and mutagen inducible mammalian genes/P. Herrlich, H. J. Rahmsdorf, U. Mallick et al.— Biochimie, 1982, 64, N 3, p. 707—708.
18. A B-lymphocyte-specific high-turnover protein: Constitutive expression in resting B cells and induction of synthesis in proliferating cells/H. J. Rahmsdorf, U. Mallick, H. Ponta, P. Herlich.— Cell, 1982, 29, N 2, p. 459—468.
19. Pantazis P., Erickson L. C., Kohn K. W. Preservation of DNA integrity in human and mouse leukemic cells induced to terminally differentiate by chemical agents.— Develop. Biol., 1981, 86, N 1, p. 55—60.
20. Worgul B. V., Merriam G. R., Jr. The lens epithelium and radiation cataracts.— Radiat. Res., 1980, 84, N 1, p. 115—121.

ЦНИ рентгено-радиологич. ин-т МЗ СССР,
Ленинград

Получено 13.08.84

УДК 57.043+539.16:547.963.32

ТОПОИЗОМЕРАЗА II — ЕЕ РОЛЬ В КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ СУПЕРСПИРАЛЬНОЙ ЯДЕРНОЙ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ γ -ОБЛУЧЕНИЯ

В. И. Ващенко, Л. В. Щедрина, В. Е. Комар

Введение. В настоящее время установлено, что ядерная ДНК клеток высших организмов находится в суперспирализованном состоянии. В наших работах [1, 2] и исследованиях других авторов [3] показано, что конформационные изменения в суперспиральной ядерной ДНК, вызванные облучением, эффективно репарируются. Процесс репарации имеет сложный характер. Первоначальная фаза полного или частичного восстановления седиментационных свойств нуклеоида сменяется их повторным нарушением (вторая фаза релаксации), за которой следует полное восстановление седиментации до контрольного уровня. Такой волновой характер восстановления, по-видимому, связан с процессами эксцизионной репарации. На первом этапе идет быстрая застройка однонитевых разрывов в ДНК, что приводит к восстановлению нуклеоида — его седиментация приближается к контрольной. Вторая фаза — результат выщепления γ -модифицированных оснований, сопровождающаяся появлением вторичных разрывов в ДНК и релаксации ее суперспирализованных доменов. Репарация этих вторичных разрывов приводит к полному восстановлению седиментационных свойств нуклеоида лимфоидных клеток.

В настоящей работе сделана попытка определить степень участия топоизомеразной ферментной системы в процессах пострадиационных изменений конформации суперспиральной ДНК лимфоцитов.

Материалы и методы. Лимфоциты периферической крови крыс выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина. Суспензию лимфоцитов облучали (0,8 Гр/мин) на установке «Луч-1» (^{60}Co). Инкубацию клеток ($1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) осуществляли в среде 199 с 10 % изологичной сыворотки, полученной от 3—4 животных. Перед облучением в инкубационную среду в разных вариантах опытов последовательно вносили новобиоцин (2 мг/мл), налидиксовую кислоту (6 мг/мл), новобиоцин+налидиксовую кислоту (2 мг/мл+6 мг/мл), рифампицин (5 мг/мл). Через определенные интервалы времени инкубации лимфоциты осаждали, трижды промывали холодным физиологическим раствором, после чего лизировали на поверхности линейных градиентов сахарозы (15—30 %), содержащих компоненты в концентрациях: 1,95 М NaCl, 0,001 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl (рН 8,0). Центрифугирование проводили в течение 30 мин при 10 °С и 37 000 об./мин в роторе SW-60 центрифуги L5-75 («Beckman», США) [2].

Кроме того, в одной из серий экспериментов нами был исследован репаративный синтез ДНК в лимфоцитах человека (в стадии G_0) методом фракционирования ДНК на бензоил-нафтоиллированной ДЭАЕ-целлюлозе (БНД-целлюлозе) после дозы облучения 20 Гр. Выделенные в градиенте фиколл-верографина лимфоциты суспендировали в среде 199 ($1-2 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл) и облучали на установке «Луч-1» (0,97 Гр/мин, 0 °С). Перед облучением клетки инкубировали с ^3H -тимидином (370 кБк/мл) при 37 °С; до внесения изотопа в среду добавляли оксимочевину (10 мМ) для подавления полуконсервативной репликации. После завершения пострadiaционной инкубации (через 10, 30, 60 мин соответственно) лимфоциты осаждали центрифугированием и дважды промывали холодным 0,01 М Na-фосфатным буферным раствором (0,14 М NaCl, 0,003 М KCl, рН 7,4) (PBS), затем один раз SSC-буферным раствором (0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, рН 7,0), после чего лизировали DS-Na. Лизат подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию, обрабатывали РНКазой, проназой, затем ДНК лизатов фрагментировали механически до определенных размеров (величину фрагментов ДНК определяли при помощи электрофореза в агарозном геле, в качестве стандарта использовали рестрикты с известной молекулярной массой). После этого осуществляли хроматографию на БНД-целлюлозе, причем пик радиоактивности, элюируемый 1 М NaCl, соответствовал нативной двуспиральной ДНК, а элюируемый формамидом — денатурированной и двунитевой ДНК, содержащей одонитевые участки. Критерием уровня репаративного синтеза служило увеличение включения ^3H -тимидина, регистрируемое в 1 М NaCl-элюате облученных клеток по сравнению с контрольными.

Результаты и обсуждение. В последнее десятилетие некоторыми исследователями показано, что релаксацию суперспиральной ДНК может осуществлять система топоизомераз [4]. Оказалось, что топоизомеразы типа II не только релаксируют ДНК, но и способны создавать дополнительные супервитки. При помощи ингибиторов топоизомераз II (новобиоцина, коумермицина А, налидиксовой и оксолиновой кислот) удалось выявить их роль во многих процессах функционирования клетки. Исходя из этих данных, мы предположили, что в сложной пострadiaционной кинетике эксцизионной репарации принимают участие топоизомеразы. В первой серии опытов в качестве ингибитора топоизомеразы II использовали новобиоцин. Результаты экспериментов представлены на рис. 1, кривая а. Видно, что присутствующий в инкубационной среде антибиотик значительно модифицирует (о степени модификации судили по относительной седиментации нуклеоида — Sedimentation relativity, Sr, которая численно равна отношению седиментации нуклеоида облученных лимфоцитов к седиментации нуклеоида контрольных клеток) пострadiaционный процесс восстановления нуклеоида лимфоцитов. Во-первых, полностью подавляется вторая фаза релаксации суперспиральных доменов; во-вторых, появляется феномен «персепарации», т. е. увеличение подвижности нуклеоида выше контрольных значений. Это явление впервые было показано на фибробластах человека при инкубации их с новобиоцином без облучения [5].

Во второй серии опытов мы использовали еще один ингибитор топоизомеразы II — налидиксовую кислоту как отдельно, так и совместно с новобиоцином. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1, кривые б и в. Здесь так же, как и в предыдущих опытах, можно выделить два эффекта: подавление второй волны релаксации и феномен

«перерепарации». Однако имеются и отличия. Налидиксовая кислота малоэффективна для проявления «перерепарации», но при совместном использовании с новобиоцином усиливает его эффект по сравнению с простым суммированием при раздельном внесении указанных антибиотиков. Таким образом, характер модификации дает основание сделать вывод об участии топоизомеразы II на втором этапе эксцизионной репарации. Подобный вывод сделан также в работе Маттерна [6], в которой использовали облучение как УФ-светом, так и рентгеновскими лучами. Следует отметить, что ингибиторы-антибиотики не обладают

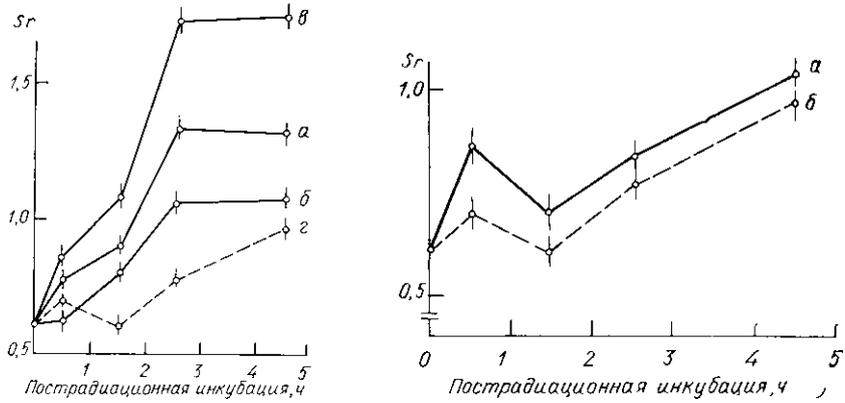


Рис. 1. Изменение седиментации нуклеоида лимфоцитов после γ -облучения (8 Гр) в присутствии антибиотиков: *a* — новобиоцина; *b* — налидиксовой кислоты; *в* — новобиоцина+налидиксовой кислоты; *г* — без антибиотиков. *Sr* — относительная подвижность нуклеоида.

Fig. 1. Changes in sedimentation of lymphocyte nucleoid after γ -irradiation (8 Gy) in the presence of antibiotics.

Рис. 2. Изменение седиментации нуклеоида лимфоцитов после γ -облучения (8 Гр) в присутствии рифампицина (*a*) и без него (*б*). *Sr* — относительная подвижность нуклеоида.

Fig. 2. Changes in sedimentation of lymphocyte nucleoid after γ -irradiation (8 Gy) in the presence (*a*) and absence (*b*) of rifampicin.

строгой специфичностью [7], поэтому нельзя исключать возможность участия в пострadiационных процессах репарации нуклеоида топоизомераз другого класса, т. е. топоизомераз типа I.

В третьей серии экспериментов, результаты которых представлены на рис. 2, в инкубационную среду в качестве ингибитора синтеза белка вносили рифампицин. Видно, что, оказывая незначительное общее модифицирующее действие, антибиотик не подавляет вторую фазу релаксации. Таким образом, из совокупности результатов всех экспериментов можно сделать вывод, что в процессах эксцизионной репарации принимают участие предсуществующие в клетке топоизомеразы, по крайней мере, на этапе второй фазы релаксации.

Феномен увеличения подвижности нуклеоида при использовании новобиоцина не удается объяснить простым изменением плотности суперспирализации, так как это изменение не зарегистрировано ни нами, ни в экспериментах Левина [5]. Такой же эффект увеличения подвижности нуклеоида зарегистрирован нами и для тимоцитов [8].

В качестве рабочей гипотезы все многообразие возможных конформационных переходов ДНК в нуклеоиде мы выразили схемой, представленной на рис. 3. По нашим представлениям, в состав нуклеоида входит топоизомераза II, состоящая, как минимум, из двух субъединиц. Одна из них в ходе лизиса в процессе выделения нуклеоида теряется, освобождая места закрепления суперспирализованных доменов. При этом супервитки сохраняются и, следовательно, сохраняется способность специфически реагировать с интеркаляторами и отвечать полной релаксацией доменов при воздействии ионизирующих излучений (на

схеме этап II) на нуклеоид. В эксперименте это проявляется в увеличении или уменьшении его относительной подвижности в сахарозном градиенте. При добавлении в сахарозные градиенты этидий бромид в концентрациях от 0 до 3 мкг/мл седиментация нуклеоида уменьшается, достигая определенного предельного значения, в дальнейшем при увеличении содержания этидий бромид в градиенте седиментация нуклеоида вновь увеличивается, стремясь к единице. В случае взаимо-

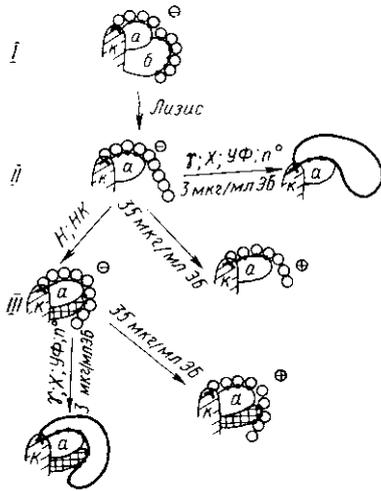
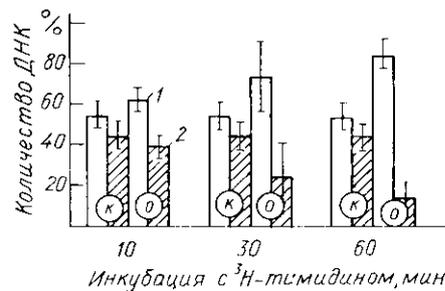


Рис. 3. Схема взаимодействия топоизомеразы II с повреждающими агентами в составе нуклеоида: *K* — негистоновые коровые белки; *a, б* — субчастицы топоизомеразы; черные точки — места прикрепления суперспирализованного домена; заштрихованная область — присоединившийся антибиотик; (+) и (−) — указание на знак суперспирали. Символы γ , X , $УФ$, n° — воздействие излучений различной природы; *ЭБ* — этидий бромид; *H* и *НК* — новобиоцин и налидиксовая кислота соответственно.

Fig. 3. The scheme of topoisomerase II interaction with chemical and physical agents in nucleoids.

Рис. 4. Диаграмма изменения включения 3H -тимидина в ДНК после γ -облучения (20 Гр) лимфоцитов человека: *K* — необлученные клетки; *O* — облученные клетки; 1 — ДНК, элюируемая 1 М NaCl; 2 — ДНК, элюируемая формамидом.

Fig. 4. The diagram of 3H -thymidine incorporation into DNA after γ -irradiation (20 Gy) of human lymphocytes.



действия с антибиотиками происходит замыкание части связей доменов на них и таким образом увеличивается компактизация нуклеоида, т. е. увеличивается его подвижность, причем выше контрольных значений (этап III на схеме). В этом случае, как видно из схемы, сохраняются все свойства суперспирализованных доменов ДНК в нуклеоиде. При добавлении в сахарозные градиенты этидий бромид в различных концентрациях регистрируется характерная для суперспирализованной ДНК двухфазная зависимость ее седиментации. Так как ингибиторы-антибиотики имеют гетероциклическую структуру, которую имеют также и интеркаляторы, то можно предположить, что они встраиваются в сахарофосфатный скелет ДНК. Однако прямых экспериментальных данных в пользу такого предположения пока нет. Что же касается связи топоизомераз с суперспиральной ДНК, то косвенным свидетельством могут служить полученные недавно в эксперименте [9] комплексы топоизомеразы I — нуклеосома и топоизомеразы II — нуклеосома. Гипотетические представления Ворсела [10] также предполагают такую связь.

На диаграмме рис. 4 представлены результаты экспериментов по изучению репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах человека. Видно, что уровень включения 3H -тимидина в облученных клетках превышает контрольные значения. Он составляет 62 % после 10 мин инкубации и достигает 83 % спустя 1 ч после ее начала. Следовательно, наши ре-

зультаты, как и данные литературы [11, 12], свидетельствуют о том, что в лимфоцитах, находящихся в стадии G₀, после воздействия ионизирующей радиации осуществляется репаративный синтез ДНК, который как этап эксцизионной репарации, по-видимому, соответствует (в свете наших вышеизложенных представлений) фазе первоначального восстановления суперспиральной структуры нуклеоида в этих клетках.

TOPOISOMERASE II. ITS ROLE
IN CONFORMATION CHANGES IN SUPERHELICAL
NUCLEAR DNA OF LYMPHOCYTES AFTER γ -IRRADIATION

V. I. Vashchenko, L. V. Shchedrina, V. E. Komar

Central Research Institute for Roentgenology and Radiology,
Ministry of Public Health, USSR, Leningrad

Summary

Inhibitors of DNA topoisomerase system (novobiocin, nalidixic acid) are studied for their effect on the repair of superhelical DNA structure damaged by ionizing radiation (8 Gy) in rat lymphocytes. The data obtained show that the topoisomerase II participates in the appearance of the second relaxation of superhelical domains in nuclear DNA after irradiation. The scheme is suggested concerning the participation of this enzyme in the structure of nucleoids in their interaction with chemical and physical agents. BND-cellulose chromatography reveals the presence of repair synthesis in human lymphocytes after their γ -irradiation (20 Gy) in vitro.

1. *Changes in the supercoiled structure of nuclear DNA in rat and peripheral blood lymphocytes after γ -irradiation* / N. A. Klimov, V. I. Vashchenko, S. N. Kolubaeva, V. E. Komar.— *Int. J. Radiat. Biol.*, 1982, **41**, N 2, p. 221—225.
2. *Изменение суперспиральной структуры ядерной ДНК лимфоцитов периферической крови крыс при гамма-облучении* / В. И. Ващенко, С. Н. Колобаева, Н. А. Климов, В. Е. Комар.— *Радиобиология*, 1980, **20**, № 4, с. 483—488.
3. *Supercoiled DNA repair in thymocyte fractions differing in radiosensitivity* / I. V. Filippovich, N. I. Sorokina, V. A. Soldatenkov, E. F. Romantzev.— *Int. J. Radiat. Biol.*, 1982, **42**, N 1, p. 31—44.
4. *Gellert M. DNA topoisomerases*.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, p. 879—910.
5. *Lavin M. F. Effect of novobiocin on DNA synthesis and structure in human lymphoblastoid cells*.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, **100**, N 1, p. 328—335.
6. *The reconstitution of higher-order DNA structure after γ -irradiation of mammalian cells* / M. R. Mattern, L. A. Zwelling, D. Kerrigan, K. W. Kohn.— *Ibid.*, 1983, **112**, N 3, p. 1077—1084.
7. *Nakayama K., Sugino A. Novobiocin and nalidixic acid target proteins in yeast*.— *Ibid.*, 1980, **96**, N 1, p. 306—312.
8. *Действие новобиоцина на процесс деградации и восстановления суперспиральной структуры ядерной ДНК фракций тимоцитов крысы* / В. И. Ващенко, А. М. Решиков, В. Е. Комар, К. П. Хансон.— *Радиобиология*, 1983, **23**, № 6, с. 786—789.
9. *Javaherian K., Liu L. F. Association of eukaryotic DNA topoisomerase I with nucleosomes and chromosomal proteins*.— *Nucl. Acids Res.*, 1983, **11**, N 2, p. 461—472.
10. *Glikin G. C., Kuberti I., Worcel A. Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: in vitro studies*.— *Cell*, 1984, **37**, N 1, p. 31—41.
11. *Hollatz R., Jempel K. Unsheduled DNA synthesis in UV-irradiated spleen lymphocytes of the rat after wholebody γ -irradiation*.— *Radiat. and Environ. Biophys.*, 1978, **15**, N 1, p. 77—83.
12. *Lavin M. F., Kidson C. Repair of ionizing radiation induced DNA damage in human lymphocytes*.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, **4**, N 11, p. 4015—4022.

ЦНИ рентгено-радиол. ин-т МЗ СССР,
Ленинград

Получено 13.08.84