

УДК 577.391

ГЕНЕТИКАР. И. ПИНТО, Ф. Л. ВИХАНСКАЯ, Л. П. ФАЛЬКОВСКАЯ,
Л. Г. СЕМЕНОВА**ОБРАЗОВАНИЕ И ВОССОЕДИНЕНИЕ ОДИНОЧНЫХ РАЗРЫВОВ
ДНК КЛЕТОК HeLa ж-63 ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ***(Представлено академиком Н. П. Дубининым 18 VII 1973)*

В последние годы выполнен ряд исследований, посвященных изучению природы образования и характера воссоединения одиночных разрывов в ДНК, вызванных облучением клеток млекопитающих (¹⁻⁷). Однако, несмотря на высокую чувствительность использованного в большинстве работ метода скоростной седиментации в градиенте плотности сахарозы, авторы были вынуждены для обнаружения и оценки числа одиночных разрывов прибегать к облучению в дозах порядка 10–100 крад, намного превышающих летальные. При облучении лимфомных клеток линии р388F в дозах 200–300 р (с мощностью $2 \cdot 10^{10}$ рад/мин) получен (⁸) сдвиг распределения ДНК в сахарозном градиенте по сравнению с ДНК необлученных клеток в сторону легких фракций. После 30 мин инкубации профиль седиментации возвращался к контрольному. В отличие от других исследований в этой работе меченые предшественники предварительно удалялись и до облучения одно клеточное деление проходило в чистой инкубационной среде. Это давало возможность и на асинхронной культуре анализировать эффект облучения на сравнительно однородном материале полностью синтезированной матричной ДНК (⁹).

Целью настоящей работы было получение количественных данных об одиночных разрывах ДНК, вызванных облучением клеток в дозах, близких к биологическим, и о воссоединении их в различных условиях инкубации.

Исследовалась монослойная культура клеток HeLa линии ж-63, имеющая генерационное время $18,2 \pm 0,2$ час. и продолжительность фаз клеточного цикла $T_1 = 7,7 \pm 1,5$; $T_2 + M = 2,1 \pm 0,4$; $S = 8,4 \pm 1,5$ (¹⁰). Состав инкубационной среды (в %): гидролизат лактоальбумина 75; сыворотка лошадиной крови 10; сыворотка человеческой крови 15. Клетки обрабатывались в лаг-фазе роста H^3 -тимидином в течение 6 час., отмывались от радиоактивных предшественников и культивировались в инкубационной среде 18 час. В опыт брали $(2-5) \cdot 10^5$ клеток. Лизис проводили в 0,2 мл 0,5 М NaOH + 0,001 М ЕДТА в течение 2 час. при комнатной температуре. Затем лизат клеток помещали на вершину изокинетического градиента щелочной сахарозы (5–30 % сахарозы в 0,9 NaCl + 0,1 М NaOH + 0,001 М ЕДТА при pH 12 (¹¹)) и центрифугировали в течение 90 мин. при 20° на ультрацентрифуге «Beckman», роторе SW-65, 32 000 об/мин. Градиент фракционировали на 14 фракций и считали радиоактивность каждой фракции с помощью счетчика. При исследованиях воссоединения разрывов пробы после облучения инкубировали при 37° 30 или 15 мин., или при 0° в течение 30 мин. В некоторых случаях в инкубационную среду добавляли кофеин в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М. Облучение проводили на установке ЛМБ- γ -1 (Co⁶⁰) мощностью 2820 р/мин в дозах от 500 до 4000 рад.

Для каждого распределения ДНК в градиенте подсчитывали средневесовой молекулярный вес M_w по формуле

$$M_w = \sum f_i M_i / \sum f_i, \quad (1)$$

где f_i — радиоактивность i -фракции, а M_i — ее молекулярный вес, который вычислялся по константе седиментации $S_{20,w}^0$ с помощью уравнения $S_{20,w}^0 = 0,0528 M^{0,4}$ для ДНК в щелочном градиенте ⁽¹²⁾. Среднее число вызванных облучением одиночных разрывов ДНК, приходящихся на единицу молекулярного веса, вычисляли далее по формуле

$$\lambda = 2 \left[\frac{1}{(M_w)_0} - \frac{1}{(M_w)_k} \right], \quad (2)$$

где $(M_w)_0$ и $(M_w)_k$ — средневесовые молекулярные веса облученного и контрольного распределений. Формула (2) получена на основе зависимости

$$M_w = \frac{2M_0}{n^2} (e^{-n} + n - 1), \quad (3)$$

выведенной в работе ⁽¹³⁾ и справедливой для случая, когда множество молекул одинакового веса M_0 облучается дозой, которая в среднем производит в такой молекуле n разрывов. При $n \geq 4$ эта зависимость с ошибкой не более 6% заменяется на $M_w = 2M_0/(n+1)$. Принимая, что распределение

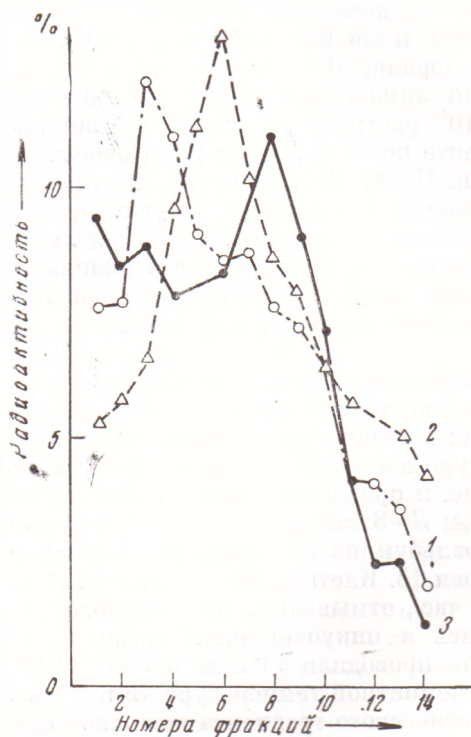


Рис. 1

Рис. 1. Профили седиментации препаратов ДНК необлученных клеток (1) и облученных в дозах 1000 р (2) и 2000 р (3)

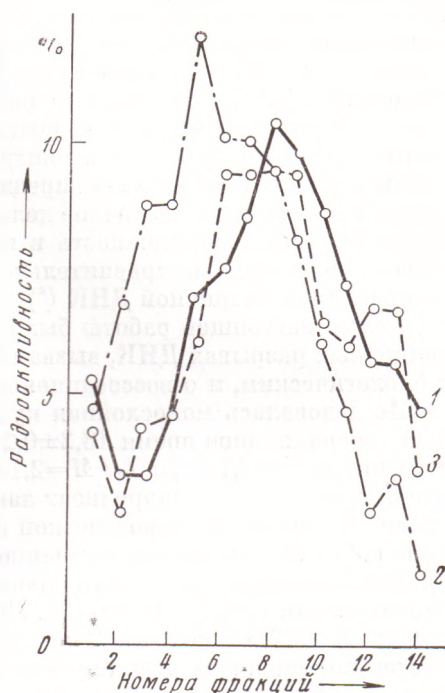


Рис. 2

Рис. 2. Профили седиментации препаратов ДНК, облученных в дозе 1000 р при инкубации 30 мин. после облучения при 0° (1), 37° (2) и при 37° в присутствии $10^{-2} M$ кофеина (3)

необлученной ДНК в градиенте является следствием случайных разрывов одиночных цепей ДНК с весом M_0 под действием щелочи со средним числом разрывов n_k , а распределение облученной ДНК — следствием случайных разрывов со средним числом $n_k + n_0 = n_k + \lambda M_0$, и исключая M_0 и n_k из уравнения (4), можно получить формулу (2). Аналогичная формула ис-

пользуется, исходя из предположения, что среднечисленный вес распределения равен половине средневесового (¹, ¹⁴).

Облучение в дозах 1000—4000 рад дало ясно выраженные сдвиги в сторону легких фракций по сравнению с необлученной ДНК (рис. 1). В дозе 500 рад такие сдвиги имели место не во всех случаях. По результатам 40 опытов с облучением в дозах 500, 1000, 2000, 4000 рад и без облучения было найдено уравнение регрессий $n_{\text{ср}} = 5 \cdot 10^{11} R$, где $n_{\text{ср}}$ — среднее число одиночных разрывов, приходящихся на 1 г веса ДНК, R — доза облучения в рад. Доверительный интервал для истинного значения коэффициента регрессии K с вероятностью 0,95 составляет $\{1,7 \cdot 10^{11}; 8,3 \cdot 10^{11}\}$. Заметим, что для доз порядка $(50 \div 1000) \cdot 10^3$ рад в работе (⁴) получено $K = 5,3 \cdot 10^{11}$, а в работе (¹) $K = 9 \cdot 10^{11}$ (в наших обозначениях).

Инкубация облученных в дозе 1000 рад клеток при температуре 37° в течение 15 мин. смещает распределение ДНК в сторону тяжелых фракций (по сравнению с ДНК без инкубации), а среднее число разрывов уменьшается на 30%. При 30 мин. инкубации распределение возвращается в положение, характерное для необлученной ДНК (рис. 2), а среднее число разрывов практически равно нулю. Внесение в инкубационную среду кофеина уменьшает эффект воссоединения вследствие 30 мин. инкубации в 3 раза и характерным образом меняет форму пика распределения (рис. 2). Инкубация при температуре 0° не дает признаков воссоединения разрывов.

Среди условий, при выполнении которых справедлива формула (2), имеется статистическая независимость радиационных разрывов от разрывов, вызванных обработкой ДНК щелочью. Это условие можно считать выполненным, если учесть, что места разрыва цепи ДНК под действием радиации и щелочи различны (¹⁵). Однако показано, что обработка щелочью облученной ДНК вызывает дополнительные разрывы в тех местах, которые были повреждены радиацией без разрыва цепи (¹⁵). Поэтому полученные нами данные о среднем числе разрывов ДНК при облучении относятся к сумме собственно одиночных разрывов, вызванных радиацией, и указанных выше повреждений, которые становятся разрывами под действием щелочи. В соответствии с (¹⁵) число собственно одиночных разрывов составляет $2/3$ суммарного.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
18 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Lett, I. Galdwell, C. I. Dean, P. Alexander, *Nature*, **214**, 790 (1967).
² P. H. M. Lohman, *Mutat. Res.*, **6**, 449 (1968). ³ M. Horikawa, O. Nikaido et al., *Exp. Cell. Res.*, **63**, 2—3, 325 (1970). ⁴ W. Veath, S. Okada, *Biophys. J.*, **9**, 3, 330 (1969). ⁵ S. Sawada, S. Okada, *Radiation Res.*, **41**, 1, 145 (1970). ⁶ T. Donlon, A. Norman, *Mutat. res.*, **13**, 2, 97 (1971). ⁷ Э. В. Айказян, В. М. Михельсон, В. Д. Жестяников, *Цитология*, **15**, № 7, 881 (1973). ⁸ B. W. Fox, M. Fox, *Int. J. Radiat. Biol.*, **18**, 5, 479 (1970). ⁹ B. W. Fox, M. Fox, *Mutat. Res.*, **8**, 629 (1969). ¹⁰ Е. Г. Семенова, Автореф. кандидатской диссертации, Инст. цитологии АН СССР, 1972. ¹¹ H. Noll, *Nature*, **215**, 360 (1967). ¹² F. W. Studier, *J. Mol. Biol.*, **11**, 373 (1965). ¹³ A. Charlesby, *Proc. Roy. Soc.*, **224**, A, 120 (1954). ¹⁴ P. M. Corry, A. Cole, *Radiation Res.*, **36**, 3, 528 (1968). ¹⁵ A. Bopp, U. Hagen, *Biochim. et biophys. acta*, № 209, 2, 320 (1970).