

Академик Н. П. ДУБИНИН, Л. Л. МАТУСЕВИЧ,
Г. И. ГОРОШКИНА, Г. Д. ЗАСУХИНА

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАБОТЫ СИСТЕМЫ ВЫРЕЗАНИЯ ОДНОНИТЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Защита генетической информации, записанной в молекулах ДНК от первичных поражений, возникших в них под действием мутагенов, осуществляется при помощи сложной системы репарационных ферментов. Наиболее полно изучена работа системы ферментов, вызывающих вырезание однонитевых поражений в молекуле ДНК, и ферментов достройки бреши по нормальной матрице, лежащей в опозитной нормальной однонитевой матрице. Наличие вырезания поражений ДНК и его количественная оценка хорошо разработаны путем учета количества димеров тимина, которые возникают в молекулах ДНК после облучения клеток ультрафиолетовыми лучами (¹⁻³).

Этот метод был широко использован в работах на бактериях; что же касается млекопитающих, то здесь имеются лишь отдельные примеры. Наличие этих случаев у животных, и в том числе у млекопитающих, указывает на всеобщность систем репараций, снимающих повреждения с ДНК, а их малочисленность указывает на необходимость внимательного изучения этого вопроса. Крупное значение имеет анализ систем репарации в свете эволюционного положения вида, дифференциации этого свойства при мутациях и измененных физиологических состояниях и в связи с появлением злокачественности. Наличие репарационных систем путем применения теста вырезания димеров тимина установлено для клеток человека линии HeLa (^{4a, 4b, 5}), в фибробластах нормальной почки человека (⁶). Эта система отсутствовала в перевиваемой культуре из клеток почек китайского хомяка (⁷), в перевиваемой культуре L клеток мыши (⁸), в клетках кожи человека, больного ксеродермой (⁹).

В настоящей работе, с использованием метода индикации активности систем репарации по вырезанию димеров, дан сравнительный анализ этой активности: в первичной культуре клеток почек сирийского хомяка, в перевиваемых клетках почек эмбриона свиньи (СПЭВ), в перевиваемых клетках китайского хомяка (клон 431), в перевиваемых клетках сирийского хомяка (ПСХ), в первичной культуре клеток куриного эмбриона. Отдельные опыты касались подавления репарационных систем с помощью ингибитора кофеина (концентрация 150 мкг/мл) и актиномицина D (концентрация 0,05 мкг/мл). Опыты были проведены на первичной культуре клеток почек сирийского хомяка. Определение тиминовых димеров проводили по методу Сетлоу (¹⁰) в клетках сразу после у.-ф. облучения (максимум испускания 2537 Å на 30 см) и через 12 и 24 час. после облучения. Изученные виды клеток отличались между собой по степени радиочувствительности, что выражалось в неодинаковом проценте индуцированных димеров при одной дозе облучения. Наибольшее число димеров (1,7%) обнаруживалось в клетках куриного эмбриона, наименьшее (0,43%) в клетках СПЭВ, что видно из данных рис. 1, 2. Изученные нами виды клеток были неодинаковы также и по способности сохранять количество индуцированных димеров после их индукции ультрафиолетовым светом.

Эти различия свидетельствуют о разной мощности работы системы репарации. Так, в первичных клетках почек хомяка и СПЭВ к 12 час. процент димеров падал от 1,22 до 0,66 и от 0,43 до 0,25 соответственно, а к 24 час. — до 0,3 и 0,23. Таким образом, через 24 часа клетки сирийского хомяка теряли 75% индуцированных димеров, а клетки эмбриона свиньи 46%. Среди полученных нами данных существенным является факт обнаружения вырезания поражения ДНК в первичных клетках сирийского хомяка и отсутствие работы этой системы репарации в перевиваемой линии этих клеток. Известно (¹¹), что в перевиваемых культурах клеток

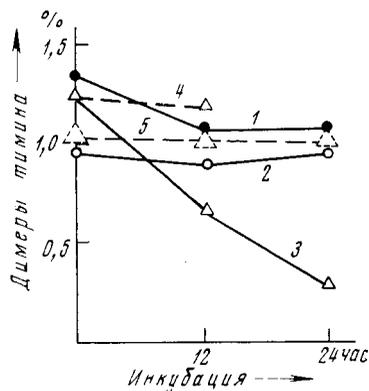


Рис. 1

Рис. 1. Вырезание димеров тимина в ДНК облученных у.-ф. светом клеток: 1 — перевиваемых клеток китайского хомяка, 2 — перевиваемых клеток сирийского хомяка, 3 — первичных клеток сирийского хомяка, 4 — первичных клеток сирийского хомяка + кофеин, 5 — первичных клеток сирийского хомяка + актиномицин D. Время облучения у.-ф. светом 10 мин.

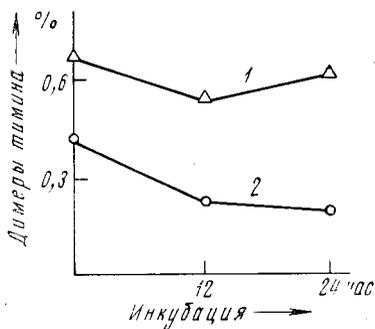


Рис. 2

Рис. 2. Вырезание димеров тимина в ДНК облученных у.-ф. светом клеток. 1 — первичных клеток куриного эмбриона, 2 — перевиваемых клеток почек эмбриона свиньи. Время облучения у.-ф. светом 1 мин.

млекопитающих быстро идет процесс малигнизации. Одним из показателей этого процесса служит появление широкого хромосомного полиморфизма. В нашем случае в первичной культуре клеток хомяка сохранялся строго диплоидный уровень при наличии 44 хромосом. У перевиваемой линии, где исчезла работа репарационной системы, число хромосом колебалось от 42 до 46. Можно высказать соображение, что потеря клетками способности восстанавливать повреждения генетического материала в некоторых случаях может быть связана со злокачественным ростом. Аналогичная гипотеза была высказана (¹¹) на основании установленной связи между повышенной чувствительностью к у.-ф. облучению, неспособностью вырезать димеры и тенденцией к злокачественному преобразованию в клетках людей, больных Xeroderma pigmentosum. Во всяком случае на ряде примеров показана потеря работы системы вырезания для клеток в перевиваемых линиях. Это касается клеток перевиваемой культуры китайского хомяка (⁷). В нашем опыте с сирийским хомяком мы смогли сравнить первичные культуры с перевиваемой и прямо убедиться, что переживание клеток в условиях перевиваемой культуры ведет к потере системы вырезания. Этот опыт, казалось бы, указывает, что все первичные культуры обладают системой репарации, а все перевиваемые культуры лишены ее. Но в наших опытах было показано, что в перевиваемой культуре клеток почек эмбриона свиньи также работает система вырезания. Однако вопрос этот не совсем ясен, он требует дальнейших исследований. На это указывают исключения из полученных нами закономерностей. Известно, что длительно культивируемые линии клеток HeLa имеют систему вырезания. Что касается первичной культуры, то в наших опытах

обнаружено, что в клетках первичной культуры куриного эмбриона система вырезания не работает.

Действие ингибиторов ферментов репарации: кофеина и актиномицина D многократно было установлено в опытах на клетках бактерий. Однако с клетками млекопитающих до сих пор положительных результатов не было получено. Достижение этих результатов важно для доказательства глубины сходства в работе системы вырезания при разном эволюционном положении организмов. В наших опытах показано (рис. 1), что в клетках первичной культуры сирийского хомяка их способность к вырезанию димеров подавляется при действии кофеина и актиномицина D. Таким образом, полученные к настоящему времени факты свидетельствуют, что разные клетки млекопитающих и птиц (клетки куриного эмбриона) могут существенно отличаться между собой по способности к восстановлению первичных повреждений, возникающих в молекулах ДНК. Необходимо отметить, что в ряде случаев клетки перевиваемых культур теряют гены, ответственные за процессы восстановления. Природа этих потерь не ясна, здесь возможны мутации, репрессирование генов и, наконец, физическая потеря этих генов из клеток. Последнее происходит при возникновении хромосомной изменчивости, ведущей к потере определенных хромосом из кариотипа. Вполне возможно, что установление связи между способностью клеток к репарации и набором хромосом в клетках на разных уровнях пассирования культуры может послужить методом локализации в определенных хромосомах генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов. Необходимо также отметить, что факты разной работы систем восстановления в разных линиях клеток указывают, что следует ожидать разного взаимовлияния между ними и вирусами. По-видимому, в тех клетках животных, в которых нет репаративных возможностей, не будут восстанавливаться и повреждения генетического материала вирусов, хозяевами которых являются высшие организмы. С другой стороны, вирусы, являясь мутагенами, могут обладать большим мутагенным потенциалом в клетках с пониженной репаративной способностью и меньшим в клетках с активной системой репарации.

Институт общей генетики
Академии наук СССР

Поступило
9 VIII 1971

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Aoki, R. Boyce, P. Howard-Flanders, *Nature*, **209**, 686 (1966).
² A. Clark, M. Chamberlin et al., *J. Mol. Biol.*, **19**, 442 (1966). ³ M. Klimek, M. Vlasinova, *Int. J. Rad. Biol.*, **11**, 329 (1966). ⁴ a) I. D. Regan, I. E. Trosko, *Radiation Res.*, **31**, 548 (1967); б) I. D. Regan, I. E. Trosko, W. L. Carrier, *Biophys. J.*, **8**, 319 (1968). ⁵ В. Н. Со́йфер, Л. Л. Матусевич, Г. И. Горошкина, *Радиобиология*, **10**, 275 (1970). ⁶ I. E. Trosko, M. R. Kasschau, *Photochem. and Photobiol.*, **6**, 245 (1967). ⁷ I. E. Trosko, E. Chu, W. L. Carrier, *Radiation Res.*, **24**, 667 (1965). ⁸ M. Horikawa, O. Nikaïdo, I. Sugahara, *Nature*, **218**, 489 (1968). ⁹ I. E. Cleaver, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **63**, 428 (1969). ¹⁰ R. Setlow, P. Swenson, W. Carrier, *Science*, **142**, 1464 (1963). ¹¹ R. Setlow, I. Regan et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1035 (1969).