

С. И. СЛЕЗИНГЕР, Е. Р. ЛОЗОВСКАЯ, А. А. ПРОКОФЬЕВА-БЕЛЬГОВСКАЯ
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТ- И ГЦ-ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК ПО ДЛИНЕ
ХРОМОСОМ 1 И 2 В ДВУХ ТИПАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 25 III 1974)

Многочисленные работы по изучению репликации ДНК в хромосомах в конце периода синтеза выявили высокую степень асинхронности этого процесса (¹⁻⁴). Нами получены данные о том, что в первичных культурах эмбриональных фибробластов и лейкоцитов периферической крови человека картины распределения поздней метки в хромосомах различны (⁵). Одним из обнаруженных фактов было то, что центромера и прилежащие к ней районы хромосомы 1 в культурах фибробластов реплицируются заметно позже, чем в лейкоцитах. Мы объяснили этот феномен тем, что время репликации участков хромосом связано с особенностями их генетического функционирования, различного в двух типах дифференцированных клеток. Центромерный и прицентромерные районы хромосомы 2 в обоих типах клеток ведут себя в этом отношении одинаково.

Наши исследования, также как и подавляющее большинство работ такого рода, были выполнены с использованием лишь одного из предшественников синтеза ДНК — Н³-тимидина. Это позволило выявить только поздно-реплицирующуюся ДНК, богатую АТ-парами, но не дало возможности выявить ДНК, богатую ГЦ-парами оснований. Поэтому важно было исследовать истинное распределение АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосом 1 и 2 в этих двух типах клеток.

Для получения первичной культуры эмбриональных фибробластов были использованы кожно-мышечные ткани 6-недельного эмбриона мужского пола (материал медицинского аборта). Кровь для постановки культуры лейкоцитов была взята у здорового мужчины 23 лет. Культивирование проводилось по общепринятым методикам. Через 19 час. после постановки культуры фибробластов и через 72 часа после начала культивирования лейкоцитов в среду вводили предшественники синтеза ДНК. Каждая культура велась в двух вариантах; А — с Н³-тимидином (0,6 мкС/мл, у.а.11 С/ммоль) и холодным дезоксицитидином; Б — с Н³-дезоксицитидином (0,6 мкС/мл, у.а.11 С/ммоль) и холодным тимидином. Предшественники синтеза ДНК вводили таким образом, что концентрации их во всех вариантах всех опытов были одинаковы. Чистота веществ проверялась хроматографически. В течение всего времени опыта культуральная среда автоматически заменялась на свежую. Фиксацию культуры фибробластов проводили на 48 часу роста, культуры лейкоцитов — на 92 часу. Клетки фиксировали смесью метанол — ледяная уксусная кислота (3 : 1). За 1 час до фиксации в среду вводили колхицин (0,5 мкг/мл). Для удаления не включившихся предшественников препараты обрабатывали 3% холодной хлорной кислотой в течение 20 мин. и после этого промывали 60 мин. водой. Для получения автографов использовалась жидкая ядерная эмульсия типа М (НИИХИМФОТО, СССР).

Для изучения распределения метки по длине хромосом 1 и 2 их делили на 7 и 6 равных участков соответственно. Был вычислен процент гранул, приходящийся в среднем на каждый участок в вариантах А и Б обоих опы-

тов. Данные для участков хромосомы 1, симметричных относительно центромеры, усреднялись. Центромерный район (участок 4) при данном делении хромосомы 1 на участки, включает в себя основную часть прицентромерного гетерохроматина.

Анализ показал, что количество АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосомы 1 в первичной культуре эмбриональных фибробластов (рис. 1А) повышено в теломерах, падает в серединах плеч и опять повышается в центромере и прилежащих к ней районах. Относительное содержание в этом районе АТ-пар оснований выше, чем ГЦ-пар. Отличия обоих распределений от равномерного и друг от друга достоверны ($P < 0,005$).

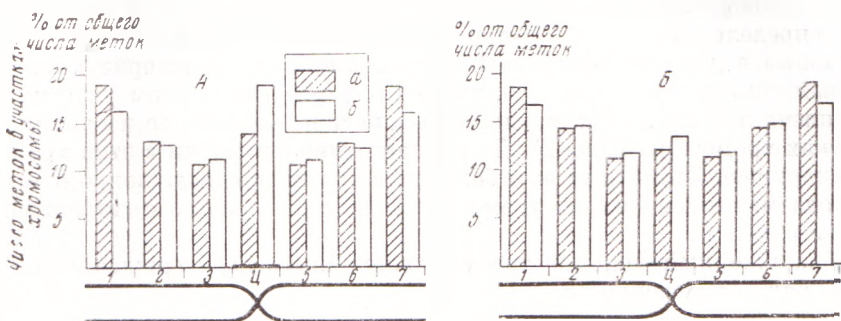


Рис. 1. Распределение АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосомы 1. А — эмбриональные фибробласты, Б — лейкоциты. а — ГЦ-пары, б — АТ-пары оснований. 1—7 — разные участки хромосомы; Ц — центромерный участок (4)

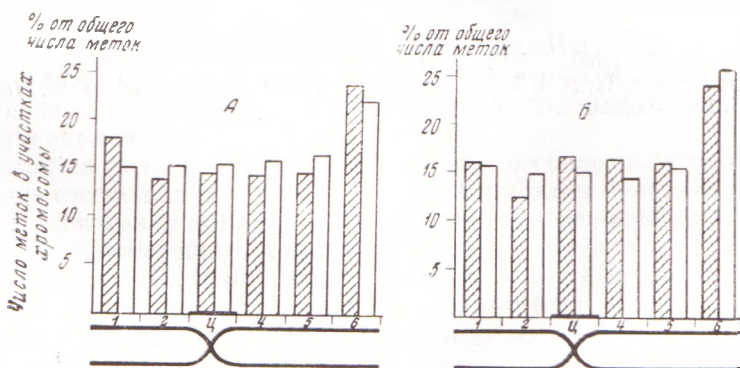


Рис. 2. Распределение АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосомы 2. Обозначения те же, что и на рис. 1

Распределения АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине этой хромосомы в культуре лейкоцитов периферической крови (рис. 1Б) от равномерного и друг от друга не отличаются. Можно лишь отметить ту же тенденцию, что и в эмбриональных фибробластах, повышенное содержание и АТ- и ГЦ-пар в теломерах и некоторое преобладание АТ-пар в центромерном районе. Распределения АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосомы 1 в двух типах клеток достоверно различаются ($P < 0,01$).

Таким образом, обнаружено, что относительное содержание ДНК в центромерном и прилежащих к нему районах хромосомы 1 (участок 4) не одинаково в двух исследованных типах клеток: в эмбриональных фибробластах содержание ДНК в этом участке выше, чем в серединах плеч, а в лейкоцитах достоверно не отличается от них. Помимо изменения содержания ДНК обнаружено изменение соотношения АТ- и ГЦ-пар оснований в этом же районе в хромосоме 1 в двух типах клеток. Все это может свиде-

тельствовать о том, что при дифференцировке фибробластов и лейкоцитов происходит избирательная репликация одних участков хромосомы и (или) недорепликация других. Если это так, то кажется вероятным, что недорепликация ДНК происходит в центромерном и прилежащем к нему гетерохроматиновом районе хромосомы 1 в культуре лейкоцитов, причем в основном за счет недорепликации АТ-пар оснований. Альтернативным объяснением является то, что два индивидуума, от которых были взяты изучаемые клетки, исходно могли различаться соотношением и количеством АТ- и ГЦ-пар оснований в этом районе. Косвенно в пользу этого может говорить известный факт полиморфизма С-сегментов центромерного района хромосомы 1 в лейкоцитах (⁶).

Распределения АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосомы 2 одинаковы в двух исследованных типах клеток и характеризуются повышенным содержанием как АТ-, так и ГЦ-пар в теломерном участке длинного плеча и практически равномерным распределением во всех остальных участках хромосомы (рис. 2). До сих пор гетерохроматин в этой хромосоме не обнаружен. Это делает еще более вероятным предположение о том, что наблюдаемые изменения в хромосоме 1 связаны именно с гетерохроматическим районом.

Обнаруженный феномен требует дальнейшего подтверждения и ставит целый ряд новых вопросов.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. German, J. Cell Biol., v. 20, 1, 37 (1964). ² C. W. Gilbert, S. Muldal et al., Nature, v. 195, № 4844, 869 (1962). ³ A. Lima-de-Faria, J. Reutalu, S. Bergman, Hereditas, v. 47, 3-4, 695 (1961). ⁴ A. A. Prokofjeva-Belgovskaya, S. I. Slezinger, Cytogenetics, v. 7, 5, 347 (1968). ⁵ С. И. Слезингер, А. А. Прокофьева-Бельговская, Д. М. Алаева, Цитология, т. 11, № 4, 4, 415 (1969). ⁶ Ann P. Graig-Holmes, F. B. Moor, M. W. Shaw, Am. J. Hum. Genet., v. 25, № 2, 181 (1973).