



УДК 547.963.3:577.7

РОЛЬ АКТИВАЦИИ ГЕНОМА В ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Б. Д. Животовский, К. П. Хансон

В настоящее время принято различать два основных вида клеточной гибели: насильственную и физиологическую. Насильственная гибель клеток происходит в ответ на воздействие повреждающих или патогенных агентов, вызывающих необратимые изменения важнейших метаболических процессов (биоэнергетические реакции, мембранный транспорт и др.) [1]. Физиологическая гибель клеток выступает как активный генетически регулируемый процесс, играющий существенную роль в дифференцировке, морфогенезе и поддержании клеточного гомеостаза тканей и органов [2]. Была высказана гипотеза о существовании специальной генетической программы гибели, при участии которой запускаются и регулируются процессы морфогенетической гибели клеток [2, 3]. Термином «программируемая клеточная гибель» обозначают те случаи физиологической клеточной гибели, когда реализация генетической программы на всех ее уровнях является доказанной или, по крайней мере, весьма вероятной [3].

Известно, что эмбриогенез всегда сопровождается явлениями массовой гибели клеток, причем данный феномен представляет собой нормальный способ элиминации временных органов и тканей в ходе развития. Саундерс [2] впервые предположил, что гибель клеток в эмбрио- и морфогенезе является результатом активации особой генетической программы, запускаемой специфическими внутритканевыми или внешними сигналами. По-видимому, закономерности гибели клеток в развитии могут быть распространены и на другие случаи их элиминации, происходящие в соответствии с генетическими механизмами. Предпринимались многочисленные попытки выделить и охарактеризовать те вещества и/или факторы, которые выполняют роль пусковых сигналов в программируемой клеточной гибели. В настоящее время с наибольшей определенностью можно говорить о морфогенетической роли гормонов (эктизона, тироксина, ювенильных гормонов). При этом отмечается исключительно высокая специфичность их действия, проявляемая не только на органном уровне, но даже в пределах различных участков одной и той же ткани [4]. Одним из важнейших проявлений программируемой гибели на молекулярном уровне является энзиматический распад хроматина, который обнаружен на конечных этапах созревания ряда терминально дифференцирующихся типов клеток, таких как эритроциты, лимфоциты, клетки хрусталика глаза и др. [5, 6]. Дегградация генетических структур в этих клетках может быть активирована под влиянием различных специфических и неспецифических индукторов. Установлено, что продукты распада хроматина образуются в результате его энзиматической дегградации и представляют собой моно- и олигомеры нуклеосом [6]. При этом нуклеазной атаке подвергаются как транскрипционно активные, так и репрессированные участки генома [7]. Дегградация ДНК, по-видимому, происходит на заключительных стадиях программируемой клеточной гибели. Этот процесс,

однако, начинается в клетках, сохраняющих определенную структурную целостность, и ему предшествует активный синтез РНК и белков. Так, ингибиторы белкового синтеза — циклогексимид и пурамицин — предотвращают энзиматический распад хроматина, вызываемый в тимocyтах под действием ионизирующей радиации и глюкокортикоидов. Аналогичный эффект вызывают также актиномицин *D* и кордицепин, которые угнетают синтез РНК [4, 8]. Эти данные указывают на возможность активации генома и синтеза специфических белков, необходимой для реализации программы гибели. В настоящее время ведется интенсивный поиск продуктов генной активности при программируемой клеточной гибели. Наиболее ранние исследования в данном направлении были проведены на эмбрионах цыплят и головастиках лягушек. Известно, что гибель клеток мезенхимы передней и задней некротических зон при формировании крыла куриных эмбрионов происходит в строго определенной временной последовательности. В этом случае вслед за стадией активации генома, выражающейся в усилении синтеза ДНК и РНК, наступает стадия развития, характеризующаяся резким падением синтеза РНК и белка и предшествующая клеточной гибели [9]. Близкая картина наблюдается в процессе развития вторичного неба — структуры, разделяющей оральную и нозальную полости. Активации синтеза макромолекул и гибели клеток при этом предшествует повышение уровня цАМФ [4]. Весьма характерным явлением в метаморфозе лягушки является элиминация хвоста у головастиков и индукция роста конечностей. Эти процессы активируются под действием тироксина и иницируются в момент формирования тироксинпродуцирующей способности щитовидной железы. Изучение закономерностей клеточной гибели в некротической зоне хвоста головастиков показало, что распаду коллагена и цитолитическим изменениям клеток предшествует стадия усиленного синтеза РНК и белков [4]. Установлено также, что актиномицин *D* и циклогексимид задерживают гибель клеток в некротической зоне [10]. Однако попытки обнаружить присутствие специфических белков с помощью электрофоретического анализа их фракционного состава не увенчались успехом, что, по-видимому, было связано с недостаточной разрешающей способностью примененного метода [11].

В последние годы наиболее интенсивно изучаются молекулярные механизмы гибели лимфоидных клеток под действием глюкокортикоидов и ионизирующего излучения. Лимфолитическое действие глюкокортикоидов, очевидно, осуществляется в соответствии с общепринятым механизмом гормональной активации генетических процессов [4]. Вслед за проникновением в клетку и формированием гормон-рецепторного комплекса последний переносится в ядро, где связывается с определенными нуклеотидными последовательностями ДНК. Это сопровождается активацией транскрипции [12] и образованием мРНК, кодирующих синтез специфических белковых факторов, ответственных за осуществление гормонального эффекта. Следует отметить, что в данном случае лимфолитическое действие гормона также подавляется ингибиторами синтеза РНК и белков. Янг и сотр. [13] выполнили серию работ, в которых с помощью высокоразрешающего двумерного электрофореза в полиакриламидном геле пытались выявить присутствие новых продуктов генной активности в лимфоцитах, обработанных глюкокортикоидными гормонами. Авторы показали, что линии клеток, различающиеся по чувствительности к глюкокортикоидам, обладают различным спектром фракционного состава белков. Причем в гормонустойчивых клетках обнаружена индукция синтеза белка с молекулярной массой 36 000, вызываемая дексаметазоном. Высказывается предположение, что данный белок определяет устойчивость клеток к лимфолитическому действию гормона. Усовершенствование метода фракционирования белков позволило авторам в клетках тимуса крысы выявить дексаметазониндуцируемый синтез шести новых белков, четыре из которых появляются уже в течение 15—45 мин после действия гормона.

а два — через 1 ч [14]. Кордицепин — ингибитор процессинга мРНК — предотвращает гормональную индукцию синтеза этих белков. Показано, что они кодируются мРНК с очень коротким периодом полураспада. По-видимому, изменение в скорости синтеза первых четырех белков вызывает наиболее характерное и быстрое проявление действия гормона в клетке — подавление транспорта глюкозы. Медленная активация синтеза двух других коррелирует с более поздними метаболическими эффектами и особенно с увеличением хрупкости ядерного материала. Принципиальным является вопрос о специфичности стрессиндуцированных белков. Был проведен эксперимент по сравнению способности различных стрессорных агентов вызывать активацию синтеза белков в клетках тимуса [14]. В отличие от дексаметазона, соли тяжелых металлов (хлорид кадмия) индуцируют синтез двух белков: металло-тионина и белка с молекулярной массой 27 000. Оба продукта достигают максимального течения к 4 ч после воздействия. Инкубация клеток тимуса в течение 1 ч при температуре 42 °С (тепловой шок) приводит к появлению в клетке, помимо известного ранее белка с массой 70 000, еще 24 новых. Интенсивность включения метки в них превышает контроль в 50—200 раз. По-видимому, каждый агент взаимодействует с определенными генными локусами, не перекрывающимися друг друга, и вызывает специфический ответ клетки. Механизм генной индукции в этих случаях различен. Необходимо отметить, что наряду с лимфолитическим действием гормонов, сопровождающимся деградацией ядерных структур, имеется ряд других примеров терминальной дифференцировки клеток, для которых ведущим событием является элиминация ядра. Широко распространенной экспериментальной моделью при изучении данного класса явлений служат клетки лейкемии Фрэнк, индуцируемые к эритроидифференцировке под влиянием целого ряда химических агентов — ДМСО, бутирата натрия, гемина. Химические индукторы вызывают усиление генной активности, вслед за которым начинается интенсивный синтез гемоглобина и иницируются процессы деградации хроматина [15].

Одним из своеобразных радиобиологических феноменов является так называемая интерфазная гибель лимфоидных клеток, наступающая при небольших дозах облучения. В ответ на воздействие радиации в этих клетках развивается строго определенная последовательность биохимических и морфологических изменений, завершающихся энзиматической деградацией хроматина и распадом ядра. Изучение молекулярных механизмов данного феномена выявило существенное его сходство с лимфолитическим действием гормонов и другими явлениями терминальной дифференцировки клеток. Это послужило основанием для предположения о радиационной активации программы гибели в лимфоидных клетках, проходящих путь терминальной дифференцировки [5]. Эксперименты показали, что продукты пострадиационного распада хроматина по своим структурным характеристикам идентичны образующимся при действии гормонов. Актиномицин D и циклогексимид тормозят деградацию хроматина в тимоцитах облученных животных [8]. В настоящее время еще не получены данные, которые позволили бы прийти к однозначному заключению об усилении генной активности на ранних стадиях развития пострадиационного лимфолиза. Тем не менее уже в первые минуты после действия радиации обнаружено повышение активности РНК-полимеразы II, ответственной за считывание генов мРНК, причем, как и при действии глюкокортикоидов на лимфоциты, усиление активности не касается РНК-полимеразы I, считывающей гены рРНК [16]. Наряду с этим получены данные об индукции генной активности в В-лимфоцитах периферической крови, подвергнутых воздействию радиации. Причем включение радиационно-индуцированных генов может происходить при уровнях облучения, вызывающих только один или несколько актов ионизации на геном [17, 18].

Таким образом, получен целый ряд фактов, указывающих на возможность индукции генной активности на ранних стадиях развития

процессов реализации программируемой клеточной гибели. Вполне вероятно, что различные физические и химические агенты способны индуцировать и ускорять процессы терминальной дифференцировки клеток [19]. При воздействии радиации это может выражаться в виде массовой гибели лимфоидных клеток. В пользу данного предположения свидетельствуют факты активации дифференцировки эритролейкемических клеток Фрэнк и клеток хрусталика глаза под влиянием УФ- и гамма-радиации [15, 20]. Наряду с этим химические индукторы дифференцировки имитируют радиационные эффекты, вызывая интерфазную гибель лимфоидных клеток. Однако это не означает, что между дифференцировкой клеток и их радиационной гибелью можно поставить знак равенства, так как ионизирующее излучение, помимо стимулирующего, безусловно оказывает поражающее действие, что может приводить к нарушению структурно-временной организации процесса дифференцировки.

В заключение остановимся на некоторых альтернативных возможностях участия генома в реализации программируемой клеточной гибели. Во-первых, необходимо получить строгие доказательства того, что действие индукторов клеточной гибели реализуется на уровне ДНК. Нельзя исключить, что оно происходит также на уровне транскрипции и трансляции. Во-вторых, реализация программы гибели может происходить не только в результате образования новых продуктов генной активности, но и вследствие выключения синтеза каких-то белков, необходимых для поддержания жизнеспособности клетки. Изучение механизмов клеточной гибели является одной из активно разрабатываемых проблем молекулярной цитологии, однако окончательное решение ее узловых вопросов требует еще дальнейших исследований.

ROLE OF GENOME ACTIVATION IN THE PROGRAMMED CELL DEATH

B. D. Zivotovsky, K. P. Hanson

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

Summary

Two main types of cell death are known: the «violent» and physiological (programmed). The programmed death (PD) of cells is an active genetically regulated process which plays an important role both in the cell differentiation and histomorphogenesis. One of the PD expressions at the molecular level is a decay of nuclear chromatin which is activated by different external inducers. Inhibitors of RNA or protein synthesis prevent the chromatin decay, thus indicating the requirement of certain specific proteins formed *de novo*. It is found that at the initial stages of chromatin decay development and cell death the synthesis of several «new» RNA and protein species is activated. The role of the genetic activity induction in the realization of PD cells is discussed.

1. *Trump B. F., Arstila A. U.* Cell membranes and disease processes.— In: Pathobiology and cell membranes / Ed. B. F. Trump, A. U. Arstila. N. Y.: Acad. Press, 1975, vol. 1, p. 1—52.
2. *Saunders R. A.* Death in embryonic systems.— *Science*, 1966, 154, N 3749, p. 604—612.
3. *Lockshin R. A., Beaulaton J.* Programmed cell death.— *Life Sci.*, 1974, 15, N 6, p. 1549—1565.
4. *Beaulaton J., Lockshin R. A.* The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and attempt at classification.— *Int. Rev. Cytol.*, 1982, 79, p. 215—232.
5. *Хансон К. П.* Молекулярные механизмы интерфазной гибели лимфоидных клеток.— *Радиобиология*, 1979, 19, № 6, с. 814—820.
6. *Уманский С. Р.* Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения.— *Успехи совр. биологии*, 1982, 93, № 2, с. 139—148.
7. *Борисова Е. А., Животовский Б. Д., Хансон К. П.* Молекулярные механизмы интерфазной гибели лимфоидных клеток. Распределение транскрибируемых последовательностей в продуктах пострадиационной деградации хроматина тимуса крыс.— *Радиобиология*, 1984, 24, № 6, с. 723—727.

8. *Исследование* влияния ингибиторов транскрипции и трансляции на репарацию и деградацию ДНК в облученных тимоцитах/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 пострadiационных изменений конформации суперспиральной ДНК лимфоцитов.