

21. *Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment* / J. L. Roscl, P. L. Earl, J. P. Weir, B. Moss // *J. Virol.*— 1986.— 60, N 2.— P. 436—449.

ВНИИ молекуляр. биологии НПО «Вектор»
Минмедпрома СССР, пос. Кольцово Новосиб. обл.
Ин-т молекуляр. биологии и биохимии АН КазССР,
Алма-Ата
Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск

Получено 11.03.90

УДК 577.391

А. И. Медведев, Г. И. Ревина

КИСЛЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ КАК ИНГИБИТОРЫ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

Показана способность полипептидов, состоящих из аспарагиновой и глутаминовой кислот, ингибировать репарацию двунитевых разрывов ДНК, вызванных γ -облучением клеток HeLa и китайского хомячка. Полное ингибирование репарации наблюдалось при концентрациях 20 (полиглутамат, молекулярная масса 2 000—12 000) и 100 мкмоль/л (аспартилглутамат, 1 500—4 500). Оба полипептида в указанных концентрациях малотоксичны, действие ингибиторов обратимо.

Введение. Ингибиторы репарации разрывов ДНК применяются в радиобиологии, цитологии, прикладной онкологии для выяснения механизма определения эффективности действия физических и химических факторов, оказывающих летальное и мутагенное действие на клетки, а также для усиления действия ионизирующего облучения при радиотерапии опухолей. Описано использование ингибиторов разной химической природы, вызывающих полное подавление восстановления двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках эукариот, индуцированных воздействием облучения. Такой эффект вызывают ЭДТА в концентрации 5 000—10 000 мкмоль/л и специфический ингибитор ДНК-полимераз 9-арабинофуранозиладенин (400 мкмоль/л) [1, 2].

В настоящей работе описываются свойства нового класса ингибиторов, отличающегося по химической природе от известных,— кислых α -полипептидов, также вызывающих полное ингибирование восстановления индуцированных γ -облучением ДР ДНК в клетках млекопитающих в существенно меньших концентрациях и обладающих меньшей токсичностью [3].

Материалы и методы. В работе исследовали два синтетических аналога природного модификатора [4] радиационного мутагенеза — аспартилглутамат (АГ) со среднечисленной молекулярной массой (м. м.) 2 365 и полиглутамат (ПГ) со среднечисленной м. м. 3 953. Полипептид АГ (м. м. 1 500—3 500) получали согласно ранее описанной методике [4], м. м. коммерческого («Fergak», Западный Берлин) препарата ПГ составляла 2 000—15 000.

В экспериментах использовали монослойную культуру двухдневных клеток китайского хомячка клонов 237, 431 и клеток HeLa, которые культивировали на среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Сразу после посева клеток в среду вводили [³H]тимидин (18,5 кБк/мл) на сутки. За 16 ч до начала эксперимента среду с меченым тимидином сливали, клетки промывали средой Эрла и инкубировали в среде с сывороткой.

Исследование ингибирования протекающей репарации ДР ДНК проводили согласно методике [5]. Клетки отмывали физиологическим раствором и инкубировали в растворах полипептидов с указанными далее концентрациями, облучали при мощности дозы 3,6 Гр/мин (Co⁶⁰) при температуре 37 или 4 °С. После прекращения облучения, обработки полипептидом или одновременной обработки полипептидами и облучения

© А. И. МЕДВЕДЕВ, Г. И. РЕВИНА, 1990

клетки фиксировали в фосфатном буфере (0,15 М NaCl, 7 мкМ K_2HPO_4 , 4,3 мкМ K_2HPO_4) при температуре 4°C в течение 30 мин, а затем снимали со стекла механическим способом. В некоторых экспериментах после облучения и обработки полипептидами клетки промывали физиологическим раствором для удаления полипептидов и инкубировали в среде с сывороткой в течение 3—4 ч, а затем фиксировали при 4°C и снимали.

Двунитевые разрывы ДНК определяли по методике [6]. Для этого суспензию клеток (50—100 тыс.) промывали на полиядерном лавсановом мембранном фильтре [7] с диаметром пор 0,95—1,0 мкм, лизировали, элюировали деградированную ДНК и определяли радиоактивность, как в [6], с некоторыми изменениями. При лизисе не использовали протеиназы К; ДНК, оставшуюся на фильтре, снимали обработкой с помощью 0,4 мл 0,4 М едкого натрия в течение 12 ч при 37°C, затем нейтрализовали 1,5 М соляной кислотой. Радиоактивность подсчитывали в толуольно-тритоловом единичном титляторе. Время элюции во всех опытах составляло 4 ч, опыты ставили в 4—5-кратной повторности.

Для изучения влияния полипептидов на включение меченого тимидина использовали клетки китайского хомячка клона 431. Перед введением тимидина клетки инкубировали с АГ в концентрации 100 мкмоль/л и ПГ в концентрации 20 мкмоль/л в течение 15 мин. Затем в инкубационную среду добавляли тимидин, облучали в дозе 70 Гр, определяли уровень включения тимидина для нерастворимой в ТХУ-фракции по методике [8]. Уровень включения меченого тимидина для кислоторастворимой фракции близок для всех вариантов опыта.

Определение токсичности полипептидов по выживаемости клеток китайского хомячка клона 431, а также мутагенного действия по увеличению выхода хромосомных aberrаций облученных в дозе 1 Гр клеток проводили по методике [4]. Условия инкубации клеток с полипептидами совпадают с использованными при определении ингибирования репарации ДР ДНК.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены данные по репарации ДР ДНК, вызванных облучением клеток *HeLa* и фибробластов китайского хомячка в дозе 100 Гр при температурах 4 и 37°C в присутствии полипептидов АГ и ПГ. Как видно, оба исследуемых полипептида не индуцируют заметных количеств ДР ДНК, на что указывает незначительная, совпадающая по величине деградация ДНК, регистрируемая в необлученных клетках, необработанных полипептидами, в сравнении с инкубируемыми в их присутствии. Наибольшая деградация ДНК наблюдается при облучении клеток при температуре 4°C, полностью подавляющей восстановление ДР [1]. Аналогичный по величине эффект наблюдался при облучении обеих культур клеток при 37°C в присутствии полипептидов АГ и ПГ, что указывает на полное ингибирование репарации ДР исследуемыми полипептидами. Восстановления разрывов не происходило при продолжении инкубации клеток *HeLa* и китайского хомячка в течение 1 ч после окончания облучения в растворах АГ и ПГ с теми же концентрациями, составляющими соответственно 100 и 20 мкмоль/л. В то же время в клетках, облученных при 37°C в отсутствие полипептидов, большая часть разрывов ДНК восстанавливается уже в ходе продолжающегося около 30 мин облучения (рис. 1), что согласуется с известными данными [6].

Вывод о полном ингибировании репарации ДР в облученных клетках китайского хомячка исследуемыми полипептидами подтверждается результатами по уровню включения (см. «Материалы и методы») меченого тимидина в клетки, облученные в присутствии полипептидов, по сравнению с облученными в их отсутствие. Он составляет $1,4 \pm 0,6$ и $2,9 \pm 1,5$ % в присутствии АГ и ПГ соответственно ($100\% = 20718 \pm \pm 510$ имп/мин на 1 млн клеток).

На рис. 2 приведена зависимость степени ингибирования репарации ДР ДНК от концентрации полипептида АГ. Результаты показывают, что ингибитор АГ эффективен в диапазоне концентраций $100 \div \div 4$ мкмоль/л.

В табл. 1 представлены данные по токсичности полипептидов в зависимости от используемой концентрации. Видно, что АГ и ПГ мало-

токсичны в концентрациях, вызывающих полное ингибирование восстановления разрывов. Заметная токсичность, определяемая по снижению выживаемости клеток, обнаруживается при увеличении концентраций АГ и ПГ в инкубационной смеси до 300 и 50 мкмоль/л.

Эффект полного ингибирования репарации ДР полипептидами обратим. После отмывки клеток, облученных в присутствии ингибиторов,

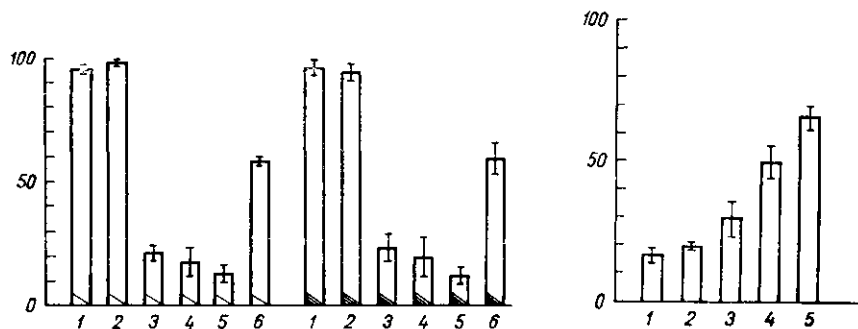


Рис. 1. Ингибирование репарации ДР ДНК, вызванных облучением в дозе 100 Гр клеток *HeLa* и инкубацией с полипептидом АГ (светлые треугольники); клеток фибробластов китайского хомячка клона 431 и инкубацией с полипептидом ПГ (закрашенные треугольники): 1 — необлученные, необработанные полипептидами клетки; 2 — необлученные, инкубированные с полипептидами; 3 — облученные при 4°C в отсутствие полипептидов; 4 — облученные при 37°C в присутствии полипептидов; 5 — то же, что и 4, но с дополнительной инкубацией при 37°C в присутствии полипептидов; 6 — облученные при 37°C в отсутствие полипептидов. По оси абсцисс — варианты экспериментов, по оси ординат — % ДНК, оставшейся на фильтре

Fig. 1. Inhibition of DNA double-strand breaks repair induced by irradiation of *HeLa* cells at a dose of 100 Gy and incubation with AG polypeptide (light triangles); Chinese hamster cells, clone 431 and incubation with PG polypeptide (painted triangles): 1 — unirradiated and polypeptide untreated cells; 2 — unirradiated cells incubated with polypeptides; 3 — cells irradiated at 4° in the absence of polypeptides; 4 — cells irradiated at 37° in the presence of polypeptides; 5 — the same as in 4 but with additional incubation at 37° in the presence of polypeptides; 6 — cells irradiated at 37° without polypeptides.

Рис. 2. Ингибирование репарации ДР ДНК, вызванных облучением клеток китайского хомячка клона 237 в дозе 100 Гр и инкубацией с полипептидом АГ в разных концентрациях: 1 — облучение при 4°C в отсутствие АГ; 2—4 — облучение при 37°C в присутствии АГ с концентрациями 100, 11 и 3,7 мкмоль/л соответственно; 5 — облучение в отсутствие ингибитора при 37°C. Обозначение осей соответствует рис. 1

Fig. 2. Inhibition of DNA double-strand repair induced by irradiation of Chinese hamster cells of clone 237 at a dose of 100 Gy and incubation with AG polypeptide at various concentrations: 1 — irradiation at 4° in the absence of AG; 2, 3, 4 irradiation at 37° in the presence of AG at the concentrations of 100 μM/l (2), 11 μM/l (3), 3.7 μM/l (4), 5 — irradiation without inhibitor at 37°.

от свободных, несвязавшихся полипептидов репарация ДР и включение тимидина восстанавливаются. Наблюдается усиление действия облучения по накоплению нерепарированных ДР. Соответствующие результаты приведены в табл. 2, условия регистрации ДР аналогичны приведенным для данных рис. 1 и рис. 2.

Как следует из табл. 2, после длительной репарации не наблюдается полного восстановления ДР в клетках, облученных при 37°C в отсутствие полипептидов [6], и регистрируется существенная деградация ДНК, достигающая 20 % нормы. Присутствие в среде при облучении АГ или ПГ способствует существенному накоплению нерепарированных повреждений; при этом степень деградации ДНК в клетках, облученных в дозе 100 Гр в присутствии ингибиторов, сравнима с измеренной в клетках, облученных в дозе 200 Гр в отсутствие полипептидов.

Близкий по величине эффект накопления нерепарированных повреждений генетических структур при совместном действии облучения и полипептидов наблюдался также при облучении в малой дозе (1 Гр)

и определении поврежденных через длительные сроки репарации (6—22 ч) по выходу структурных перестроек хромосом в клетках китайского хомячка. Так, при восьмичасовой длительности репарации после

Таблица 1

Влияние различных концентраций АГ и ПГ на выживаемость клеток фибробластов китайского хомячка

Influence of AG and PG at different concentrations on the survival of Chinese hamster fibroblasts

Концентрация, мкмоль/л	ПГ	Концентрация, мкмоль/л	АГ
20	92,5±6,2	100	94,3±4,0
50	44,3±4,5	200	78,0±7,6
—	—	300	41,1±2,1

окончания совместного действия облучения и полипептида АГ в концентрации 100 мкмоль/л выход хромосомных aberrаций составил для АГ — 5,2±0,5, облучения — 13,8±±5,6, действия обоих факторов — 29,2±0,9 %.

Сравнительно малая токсичность кислых полипептидов, высокая биологическая активность, избирательность действия, соответствие по структуре природным метаболитам делают перспективным

их использование для изучения механизма образования структурных перестроек хромосом, роли нерепарированных разрывов ДНК в репродуктивной гибели и трансформации клеток при облучении, а также в

Таблица 2

Влияние облучения в дозе 100 Гр полипептидов АГ (100 мкмоль/л) и ПГ (20 мкмоль/л) на накопление повреждений, нерепарированных после 4 ч репарации

Influence of irradiation at a dose of 100 Gy, AG polypeptides at the concentration of 100 μmoles/l and PG at the concentration of 20 μmoles/l on the accumulation of damages unrepaired after four hours of reparation in HeLa cell culture of Chinese hamster fibroblasts, clones 237 and 431

Условия эксперимента	HeLa	Клон 237	Клон 431
Облучение при 37 °С в отсутствие АГ и ПГ	83,6±2,4	80,2±4,8	80,6±2,3
То же в их присутствии	65,0±3,0	57,1±3,6	60,2±5,0

качестве агента, способного существенно усиливать летальное действие нонизирующего облучения и других факторов, вызывающих в клетках образование разрывов ДНК.

ACIDIC POLYPEPTIDES AS INHIBITORS OF THE REPAIR OF DOUBLE-STRAND DNA BREAKS

A. I. Medvedev, G. I. Revina

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

The ability of polypeptides consisting of aspartic and glutamic acids to inhibit the repair of double-strand DNA breaks induced in γ -irradiated Chinese hamster and HeLa cells was shown. A complete inhibition of the double-strand DNA breaks repair was observed under the concentrations of 20 μ moles/l (polyglutamic acid with molecular weight 2000—15000 daltons) and 100 μ moles/l (aspartylglutamic acid with molecular weight 1500-4500 daltons). Both polypeptides were low toxic at the given concentrations, their inhibitory effect being reversible.

Окончание см. на с. 99.

transfection of Chinese hamster established cells and in subsequent cell generations. So it is necessary to test the mutagenic properties of the DNA molecules produced both for geneotherapy of human inherited diseases and for solution of other problems.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бужневская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез и некоторые аспекты генетической инженерии человека // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 66—72.
2. Мутагенность ДНК вируса простого герпеса и плазмиды в культивируемых клетках млекопитающих / Е. Л. Рубашевский, Л. Л. Лукаш, Т. И. Бужневская и др. // Докл. АН СССР.— 1984.— 279, № 3.— С. 752—754.
3. Рубашевский Е. Л. Плазмида *pBR325tk* как мутаген // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 76—78.
4. Rubashevsky E. L. Mutagen action of the recombinant plasmid *pBR325tk* on chinese hamster cells // XVIII EEMS Annu. Meet. (Bulgaria, Varna, October, 1988): Abstr.— Sofia, 1988.— P. 69.
5. Рубашевский Е. Л. Мутагенность вируса простого герпеса, его ДНК и рекомбинантной плазмиды *pBR325tk*: Автореф. дис... канд. биол. наук.— Киев, 1987.— 16 с.
6. Плохинский П. А. Биометрия.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970.— 367 с.
7. Бужневская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.— Киев: Наук. думка, 1984.— 136 с.
8. Мутагенная активность аденовируса I типа в фибробластах китайского хомячка / Е. Л. Рубашевский, Т. И. Бужневская, И. С. Дяченко, Л. Н. Носач // IV съезд генетиков и селекционеров Украины (Одесса, май 1981): Тез. докл.— Киев: Наук. думка, 1981.— С. 152—153.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 27.04.90

Окончание. Начало см. на с. 89—92.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper W. J., Coie A. Characterization studies of the rejoining of α -particle and γ -ray induced double-strand acissions in mammalian DNA // Rad. Res.— 1974.— 59, N 1.— P. 262.
2. Bryant P. E., Blocher D. The effects of 9- β -arabinofuranosyladenine on the repair of DNA strandbreaks in X-irradiated Ehrlich ascites tumor cells // Int. J. Rad. Biol.— 1982.— 42, N 4.— P. 385—394.
3. А. с. 1418339, С12 № 15/00. Ингибитор репарации двуниевых разрывов ДНК / А. И. Медведев // Бюл. изобретений.— 1988.— № 31.— С. 121.
4. Влияние природных и синтетических кислых полипептидов на нормальные и γ -облученные клетки китайского хомячка / А. И. Медведев, Ю. А. Манцыгин, Г. И. Ревина и др. // Радиобиология.— 1978.— 18, № 6.— С. 821—828.
5. Медведев А. И., Ревина Г. И., Кузин Л. М. Сильнокислые полипептиды как ингибиторы репарации однониевых разрывов ДНК, вызванных γ -облучением клеток *HeLa* // Докл. АН СССР.— 1983.— 270, № 1.— С. 232—235.
6. Bradley M. O., Kohn K. W. X-ray induced DNA double-strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 3.— P. 793—804.
7. Флеров Г. Н., Барашенков В. С. Практические применения пучков тяжелых ионов // Успехи физ. наук.— 1974.— 114, № 2.— С. 351—373.
8. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— 263 с.

Ин-т биол. физики АН СССР, Пушкино Моск. области

Получено 26.04.90