



УДК 576.3:591.436

ЭКСТРАХРОМОСОМНЫЕ ДНК В КЛЕТКАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ НОРМАЛЬНЫХ КРЫС

Л. В. Обухова, Е. В. Киселева, А. Ю. Боровков, В. П. Кумарев,
Н. Б. Христолюбова

Введение. В настоящее время большое внимание исследователей привлекают экстрахромосомные генетические элементы, обнаруженные в различных эукариотических клетках у широкого диапазона видов от дрозофилы до человека [1—8]. Показано, что с экстрахромосомной ДНК связано явление нестабильности генома, одного из актуальных вопросов современной генетики [9]. Существует ряд косвенных данных, указывающих на возможную связь экстрахромосомной ДНК с дифференциальной активностью генов. Показано, что экстрахромосомные ДНК полидисперсны, размеры их варьируют от 0,15 до 20 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.), а их распределение по размерам и количеству на клетку меняется в процессе развития организма [2]. Существующие в настоящее время модели, объясняющие происхождение экстрахромосомной ДНК, в основном объединены идеей, что все эти элементы являются продуктами реорганизации генома [7].

Особое внимание привлекают кольцевые внехромосомные ДНК, так как они более стабильны в клетке, и маловероятно, что их наличие является артефактом процесса выделения в отличие от линейных молекул. Низкая концентрация (менее 0,02 %) и высокая гетерогенность кольцевых ДНК чрезвычайно затрудняют их изучение. Однако, несмотря на это, получены первые результаты. Показано, что структура кольцевых ДНК из клеток *HeLa* сходна с транспозомами [4]. В ряде случаев внехромосомные генетические элементы связаны с белками и имеют определенную упаковку, возможно, отражающую их функциональную активность [10].

Настоящая работа предпринята с целью идентификации и сравнительного анализа экстрахромосомных ДНК в клетках печени и мозга нормальных крыс, а также поиска подходов для дальнейшего изучения их структуры и функции.

Материалы и методы. В работе использовали мозг и печень нормальных крыс линии Вистар. Внехромосомную ДНК выделяли по следующей схеме: мозг 30 взрослых самцов весом 150—200 г и печень из 10 тех же крыс растирали в жидком азоте. Клетки суспендировали в 50 мл 50 мМ трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкозы, рН 8,0 и продолжали выделение по методу [11] с дополнительным гидролизом РНКазой (Ленингр. завод мед. препаратов), предварительно прогретой при 100 °С, и хроматографией на сафарозе CL4B. ДНК, вышедшую в свободном объеме, осаждали спиртом. Осадок растворяли в 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0. Дальнейшее фракционирование вели центрифугированием в градиенте плотности CsCl в присутствии бромистого этидия [12]. Анализировали фракции, соответствующие кольцевым и суперспирализованным формам ДНК (с коэффициентами рефракции от 1,383 до 1,392), используя плазмиду *pUC12* как маркер. Для обогащения фракций кольцевыми и суперспирализованными молекулами ДНК проводили последовательное 2—3-кратное центрифугирование

с параллельно проводимыми электрофоретическим и электронно-микроскопическим анализами образцов.

Из мозга и печени крыс выделяли также фракции митохондриальных ДНК по методу [13] с дополнительной РНКазной обработкой и хроматографией на сефарозе CL4B. Часть фракций обрабатывали протениазой К («Мегск», ФРГ) по методу [12].

Электронно-микроскопический анализ образцов осуществляли с использованием белково-монослойной техники Кляйншмидта [14]. Белковый монослой снимали на сетки с угольной пленкой, промывали в 90 %-ном спирте, высушивали и оттеняли сплавом платина — палладий под углом 7°. Снимки получали на микроскопе JEM-100С (Япония), после чего их увеличивали и с помощью курвиметра измеряли контурную длину ДНК.

Результаты и обсуждение. Использование 2—3-кратного центрифугирования внехромосомного материала в градиенте плотности CsCl позволило обогатить исследуемые фракции кольцевыми молекулами ДНК в среднем с 1 на 1000 до 1 на 100 молекул, а в случае печени получить гомогенную суперспирализованную фракцию ДНК (рис. 1, *а*). Электронно-микроскопический анализ показал, что выделенные из клеток мозга и печени фракции, имеющие коэффициент рефракции 1,383—1,387, содержат гетерогенные кольцевые молекулы (рис. 1, *б—з*), размер которых колеблется от 0,2 до 2 мкм (рис. 2, *а, б*). Заметны некоторые различия в степени гетерогенности кольцевых молекул в клетках печени и мозга. Так, в клетках мозга гетерогенность открытых кольцевых молекул по размерам довольно широка (0,2—2 мкм) и не имеет какого-либо заметного максимума. В клетках же печени практически не встречаются молекулы с контурной длиной более 1 мкм. В клетках печени наиболее многочисленными копиями по сравнению с остальными кольцевыми молекулами представлены молекулы размером 0,2 мкм, что может свидетельствовать об их амплификации и, возможно, определенной специфической функции в этих клетках. Тот факт, что из клеток печени удалось выделить суперспирализованные кольцевые молекулы, также указывает на большую по сравнению с мозгом долю коротких кольцевых ДНК, так как они менее чем длинные молекулы подвержены возможному повреждению в процессе выделения. Полученные данные в силу небольшой выборки не позволяют пока с уверенностью утверждать о существовании тканевых различий по содержанию внехромосомных кольцевых ДНК в клетках мозга и печени крыс, но такой вывод правомочен и требует дальнейших исследований.

Электронно-микроскопический анализ позволил также установить, что в составе описанных выше фракций помимо открытых кольцевых молекул ДНК присутствуют и другие релаксированные складчатые формы, имеющие вид розеток с петлями, отходящими от одного общего центра (рис. 1, *и—л*). Некоторые розетки содержали довольно длинные свободные концы ДНК, однако большинство имеет замкнутую форму и является, вероятно, кольцевыми молекулами. Встречаются также беспорядочно упакованные кольцевые молекулы, образовавшиеся, возможно, за счет удаления скрепляющих факторов, поддерживающих розеткоподобную форму (рис. 1, *м*).

Розеткоподобная укладка ДНК была описана ранее в составе хромосомов эукариот [15], кольцевых ДНК митохондрий [16] и внехромосомных элементов прокариот [17]. Ранее нами было показано, что в поддержании подобной конформации ДНК участвуют РНК, белки и, возможно, липиды, которые располагаются в области довольно крупных центральных электронноплотных глобул, скрепляющих петли розеток [18]. Однако розеткоподобные структуры, выявляемые во фракциях, выделенных из мозга и печени крыс, практически не содержали аналогичных электронноплотных центральных глобул, что, по-видимому, связано с удалением белков, РНК и липидов при довольно жесткой обработке материала в процессе его выделения.

Сохранение складчатой организации ДНК внехромосомных элементов, несмотря на длительность обработки, вероятно, обусловлено наличием остаточных белков, ковалентно связанных с ДНК [19], а также взаимодействием между комплементарными участками ДНК, расположенными в основании петель розеток. В таком случае должна суще-

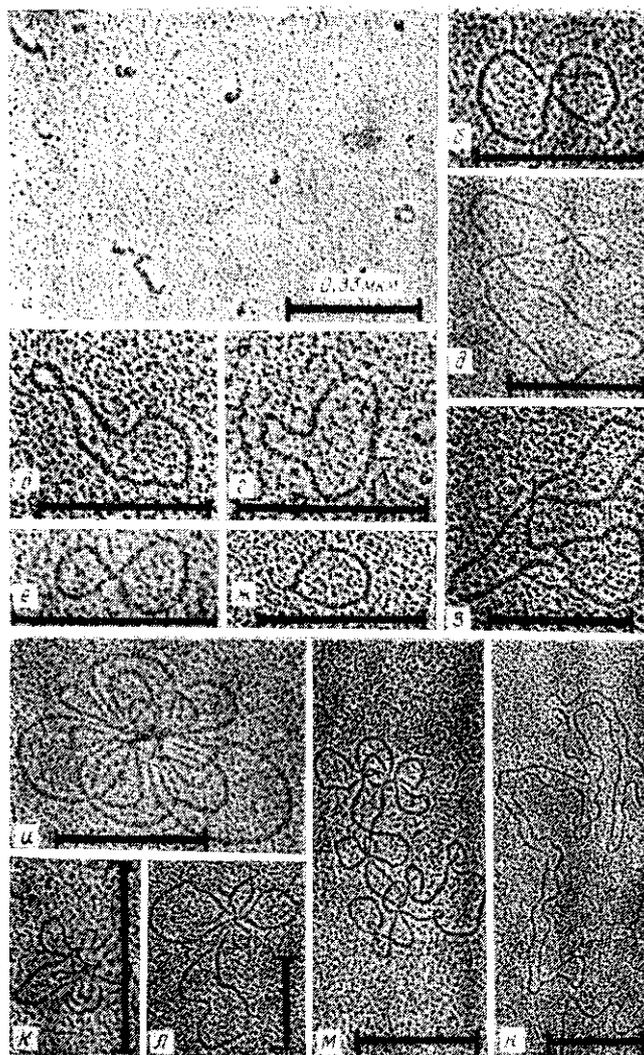


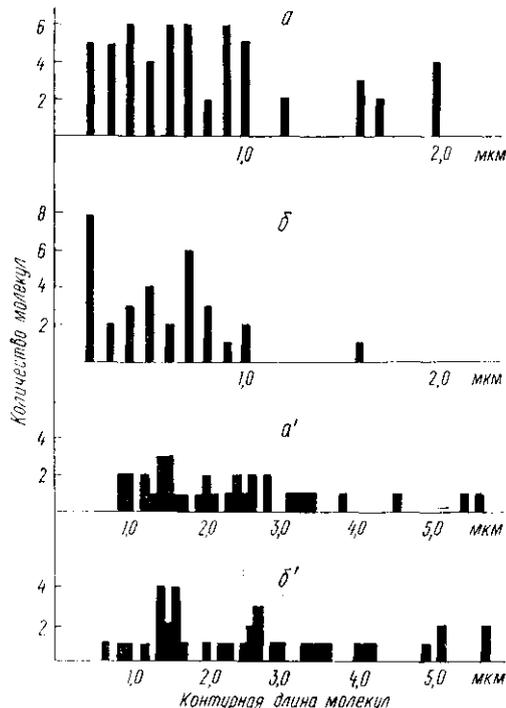
Рис. 1. Внехромосомные молекулы ДНК, присутствующие в клетках мозга и печени нормальных крыс: суперспирализованные ДНК из клеток печени (а), открытые кольцевые ДНК из клеток мозга (б—д) и печени (е—з), складчатые розеткоподобные формы кольцевых ДНК (и—л), складчатая кольцевая ДНК из мозга (м) и кольцевая ДНК митохондрии мозга после действия протенназы К (н)

Fig. 1. Electron micrographs of extrachromosomal DNA obtained from brain and liver of normal rat. Supercoiled DNA from liver (a), opened circular DNA from brain (b-d) and liver (e-g); folded rosette-like forms of circular DNA (h-l); folded circular DNA from brain (m); circular mitochondrial DNA from brain after protcinase K treatment (n)

ствовать периодичность внутренней структуры ДНК, которая, возможно, определяется присутствием во внехромосомных элементах эукариот высокоповторяющихся последовательностей ДНК [10].

Присутствующие в препаратах розеткоподобные структуры, содержащие свободные концы ДНК, относятся, на наш взгляд, к фрагментам ДНК хромосом, в то время как замкнутые складчатые формы — к кольцевым внехромосомным элементам. Установлено, что розеткоподобную организацию имеют кольцевые ДНК с контурной длиной более 1 мкм.

Число таких структур во фракциях после многократного центрифугирования достигает 30—40 %, и они четко разделяются на две группы. В первую входят розетки диаметром около 0,6 мкм с многочисленными (10—20) петлями (рис. 1, и), во вторую — более мелкие розетки диаметром 0,3 мкм, содержащие от 3 до 10 петель (рис. 1, к, л). Контурная длина ДНК в составе более крупных розеток сходна в клетках печени и мозга и колеблется от 4,8—5 до 15—19 мкм, что соответствует, вероятно, мономерным, ди- и тримерным формам митохондриального генома, хотя не исключено, что некоторые из них могут иметь пемитохондриальное происхождение. Результаты опытов по выделению и анализу ДНК митохондрий из клеток печени и моз-



г, вероятно, мономерным, ди- и тримерным формам митохондриального генома, хотя не исключено, что некоторые из них могут иметь пемитохондриальное происхождение. Результаты опытов по выделению и анализу ДНК митохондрий из клеток печени и моз-

Рис. 2. Распределение по контурным длинам кольцевых (а, б) и мелких розеткоподобных форм ДНК в мозге (а, а') и печени (б, б') нормальных крыс. Гистограммы построены для фракций градиента с коэффициентом рефракции: 1,383—1,387 — для кольцевых и розеткоподобных форм ДНК
 Fig. 2. Contour length distributions of circular (a, b) and small rosette-like DNAs (a', b') from brain (a, a') and liver (b, b') of normal rat. The distribution was obtained for fractions of CsCl-EtBr gradient with refractive indexes: 1.383-1.387

га, а также измерение контурной длины митохондриальной ДНК после обработки протеиназой К (рис. 1, н) показали, что размер ДНК митохондрий составляет в среднем около 5 мкм, что соответствует литературным данным [20] и совпадает с контурной длиной ДНК в составе крупных розеток.

Вторая группа представляет собой кольцевую ДНК в виде мелких розеток, контурная длина которых колеблется от 1 до 3 мкм. Не наблюдается различий в распределении по размерам внутри этой группы между клетками мозга и печени (рис. 2, а', б'). Что могут представлять собой подобные формы ДНК? Так, в клетках нормальной печени крыс были обнаружены вирусоподобные частицы [21], аналогичные таковым мышам, у которых обнаружены кольцевые ДНК [22]. Имеются также данные о розеткоподобной укладке ДНК в составе вирусных частиц [23]. В то же время можно предположить, что рассматриваемые структуры отражают способ упаковки более крупных циклических молекул ДНК внехромосомных элементов, подобно тому, как это наблюдалось нами ранее у прокариот [17]. В нативном состоянии петли розеток, вероятно, суперспирализованы и их релаксация происходит в процессе выделения и обработки материала. Не исключено, что используемые обработки приводят также к разворачиванию некоторых мелких розеток в кольцевые молекулы, так как размеры этих разных форм ДНК перекрываются (рис. 2).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что в клетках мозга и печени крыс содержатся гетерогенные внехромосомные молекулы ДНК небольших размеров, которые могут обнаруживаться в виде суперспирализованных, кольцевых либо складчатых розеткоподобных форм. Не исключено, что они, как и другие описанные

в литературе экстрахромосомные кольцевые ДНК, относятся к подвижным генетическим элементам и оказывают существенное влияние на работу генетического аппарата клетки. Исследованию структурной организации и функционального значения этих обнаруженных нами экстрахромосомных ДНК будут посвящены дальнейшие исследования.

Авторы благодарны А. Г. Ромащенко, С. И. Байбородину, Б. Н. Зайцеву, Г. В. Генераловой, А. М. Наякшину, Н. Д. Патрикеевой за помощь и участие в обсуждении результатов.

EXTRACHROMOSOMAL DNA IN BRAIN AND LIVER CELLS OF NORMAL RATS

L. V. Obukhova, E. V. Kiseleva, A. Yu. Borovkov, V. P. Kumarev, N. B. Khristolyubova

Institute of Cytology and Genetics, Academy of Sciences of the USSR,
Siberian Branch, Novosibirsk

Summary

Three forms of extrachromosomal DNA were revealed in the brain and liver cells of normal rats: supercoiled, relaxed circular and folded rosette-like molecules. Supercoiled DNA was obtained only from liver cells. The relaxed circular forms have different length in brain (0.2-2 μm) and liver (0.2-1 μm) cells. 25 % of relaxed circular molecules in liver have the length of 0.2 μm . DNA molecules of the length more than 1 μm have a folded rosette-like form and were the same in brain and liver cells.

1. Flavell A. J., Ist-Horowicz D. The origin of extrachromosomal circular copia elements // *Cell*.—1983.—34, N 2.—P. 415—419.
2. Delap R. J., Rush M. G. Change in quantity and size distribution of small circular DNAs during development of chicken bursa // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1978.—75, N 11.—P. 5855—5859.
3. Yamagishi H., Kunisada T., Tsuda T. Small circular DNA complexes in eukaryotic cells // *Plasmid*.—1982.—8, N 2.—P. 299—306.
4. Transposon-like sequences in extrachromosomal circular DNA from mouse thymocytes / S. Fyujimoto, T. Tsuda, M. Toto, H. Yamagishi // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 7.—P. 2072—2076.
5. Molecular characterization of small polydisperse circular deoxyribonucleic acid from an African green monkey cell line / A. H. Bertelsen, M. Z. Humayun, S. G. Karfopoulos, M. G. Rush // *Biochemistry*.—1982.—21, N 10.—P. 2076—2085.
6. Smith C. A., Vinograd J. Small polydisperse circular DNA of *HeLa* cells // *J. Mol. Biol.*—1972.—69, N 2.—P. 163—178.
7. Jones R. S., Potter S. S. L1 sequences in *HeLa* extrachromosomal circular DNA: evidence for circularization by homologous recombination // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 7.—P. 1989—1993.
8. Stanfield S. W., Helinski D. R. Cloning and characterization of small circular DNA from Chinese hamster ovary cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1984.—4, N 1.—P. 173—180.
9. Георгиева Г. П., Ильин Ю. В., Крамеров Д. А. Подвижные элементы генома эукариот // *Успехи биол. химии*.—1984.—25, № 2.—С. 180—189.
10. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.—М.: Наука, 1985.—223 с.
11. Riabowol K., Shmookler R. R. J., Goldstein S. Interspersed repetitive and tandemly repetitive sequences are differentially represented in extrachromosomal covalently closed circular DNA of human diploid fibroblasts // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13, N 15.—P. 5563—5584.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—612 с.
13. Palva T. K., Palva E. T. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction // *FEBS Lett.*—1985.—192, N 1.—P. 267—270.
14. Kleinshmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // *Meth. Enzymol.*—1968.—12B.—P. 361—377.
15. Выделение розеткоподобных структур из частично депротенизированного хроматина гепатоцитов крысы / А. Н. Прусов, В. Ю. Полякова, О. В. Зацепина и др. // *Цитология*.—1985.—27, № 9.—С. 1026—1030.
16. Van Tuyle G. C., McPherson M. Z. A compact form of rat liver mitochondrial DNA stabilized by bound proteins // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 13.—P. 6041—6055.
17. Электронно-микроскопические исследования внехромосомных элементов *Escherichia coli* / Е. В. Киселева, Н. В. Воробьева, А. Г. Ромащенко и др. // *Цитология*.—1986.—28, № 8.—С. 796—801.
18. Киселева Е. В., Лихошвай Е. В., Христоролюбова Н. Б. О структурном сходстве

- одного из уровней пространственной организации ДНК в геноме про- и эукариотических организмов // Там же.— № 10.— С. 1123—1128.
19. *Zovetti M. A., Helinski R.* Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. II. Characterization of the proteins associated with the unrelaxed and relaxed complexes of plasmid *ColE1* // *J. Biol. Chem.*— 1975.— 250, N 22.— P. 8790—8795.
 20. *Гаузе Г. Г.* Митохондриальная ДНК.— М.: Наука, 1977.— 288 с.
 21. *Обратная транскриптаза из печени крыс: происхождение и вероятные функции / В. П. Томсон, Г. Б. Пыринова, Н. П. Корохов и др. // Докл. АН СССР.— 1983.— 272, № 6.— С. 1498—1501.*
 22. *Тульчинский Е. М., Григорян М. С., Луконин Е. М.* Экстрахромосомные кольцевые молекулы ДНК, содержащие гены интраистральных А-частиц // Структура и функция генома: Тез. IV симпозиум СССР — ФРГ.— Ленинград, 1985.— С. 1—39.
 23. *Vid H. M., Kelly D. G.* An electron microscope study of partially lysed baculovirus nucleocapsids: intranucleocapsid packaging of viral DNA // *J. Ultrastruct. Res.*— 1980.— 73, N 3.— P. 361—368.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 03.09.86

(Окончание. Начало см. на с. 139—144.)

34. *Цветков В. М., Эскин В. Е., Френкель С. Я.* Структура макромолекул в растворах.— М.: Наука, 1964.— 719 с.
35. *Боуэн Т.* Введение в ультрацентрифугирование.— М.: Мир, 1973.— 248 с.
36. *Chernyak V. Ya., Magretova N. N.* An «all-speed» autocalibration method for sedimentation equilibrium in dilute homogeneous and multicomponent solutions. 1. Theory, a computational scheme and verification by computer-simulated experiments // *Anal. Biochem.*— 1982.— 123, N 2.— P. 101—109.
37. *Тенфорд Ч.* Физическая химия полимеров.— М.: Химия, 1965.— 625 с.
38. *Kuntz I. D.* Hydration of macromolecules. 3. Hydration of polypeptides // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1971.— 93, N 2.— P. 514—516.
39. *Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия.— М.: Мир, 1984.— Т. 2.— 315 с.
40. *The chemistry of keratins / W. G. Grewther, R. D. Fraser, F. G. Lennox, M. Lindley // Adv. in protein chem. / Eds C. B. Anfinsen et al.— New York: Acad. press, 1965.— Vol. 20.— P. 191—346.*

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Отд-ние биоорг. химии Ин-та орг. химии АН УССР, Киев

Получено 30.06.86