

Г. Н. ЗАЙЦЕВА, А. А. КОЛЕСНИКОВ, И. А. ЯЦЕНКО,  
М. Д. КИРНОС, Б. Ф. ВАНЮШИН

## О ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ ДНК КИНЕТОПЛАСТА *CRITHIDIA ONCORPELTI*

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 VII 1974)

Среди простейших особое внимание привлекают представители отряда кинетопластид, обладающие единым митохондрионом клетки, частью которого является кинетопласт. В кинетопласте трипанозомид сосредоточено большое количество ДНК (10–25% от общеклеточной), молекулы которой представлены циркулярными и линейными формами. Циркулярные молекулы кинетопласта и митохондрий по многим свойствам сходны между собой (1, 2). Однако в противоположность митохондриальным ДНК, имеющим у всех изученных представителей животных стандартные размеры молекул (периметр 5 нм, мол. вес 9–10 млн дальтон), циркулярные молекулы кинетопластной ДНК у разных трипанозомид значительно варьируют по размерам (0,20, —0,80 нм, мол. вес. 0,55–1,50 млн дальтон) (1, 3, 4). Молекулы ДНК в кинетопласте имеют строго упорядоченную укладку, образуя единый структурированный комплекс (1, 5). Гетерогенность молекулярных форм К-ДНК\* и их ассоциация в виде «хромосомоподобной» структуры может указывать на более высокий уровень организации кинетопластной генетической системы — мезокариотный — по сравнению с митохондриальной системой прокариотного типа (4). Наши данные о синтезе белка в клетках *C. oncorpelti* также свидетельствуют о большей автономности кинетопластной генетической системы трипанозомид сравнительно с митохондриальной у других эукариот (6).

В данной работе проводилось сравнение ДНК кинетопласта и ядра *Crithidia oncorpelti* по нуклеотидному составу и содержанию пиримидиновых изоплит разной длины. В этом отношении кинетопластные ДНК совершенно не изучены.

Выращивание культуральной формы *C. oncorpelti* и процедура выделения ядер описана ранее (7). Выделение кинетопластов проводили по методу (8). Фракцию кинетопластов для дополнительной очистки обрабатывали ДНКазой (100 мкг/мл, 20 мин., 37° С) и центрифугировали в градиенте концентраций сахарозы от 1,2 до 2,0 М. Кинетопласты лизировали (30 мин. 18° С) путем последовательного добавления додецилсульфата натрия, тритона X-100 и дезоксихолата натрия до конечной концентрации 3, 2, 1% соответственно. Лизат кинетопластов обрабатывали проназой (200 мкг/мл, 12 час. 18° С, Pronase E). ДНК из ядер и из лизата кинетопластов получали по методу (8). Полученные фракции ДНК гидролизовали 0,7 N NaOH (18 час., 37° С) для удаления возможных прочно связанных с ДНК примесей РНК. Нуклеотидный состав ДНК определяли хроматографией гидролизатов (57% HClO<sub>4</sub>, 1 час., 100° С) в тонком слое целлюлозы (Filtrac, ГДР) в щелочном (*n*-бутанол : вода : аммиак, 60 : 10 ; 0,1) или кислом (изопропанол : HCl : вода, 170 : 45 : 35) растворителях (9). ДНК гидролизовали по Баргону (10) до пиримидиновых изоплит, ко-

\* К-ДНК — ДНК кинетопластов, Я-ДНК — ДНК ядер, М-ДНК — ДНК митохондрий.

торые разделяли и количественно определяли по ранее описанной методике (9). Плавление препаратов ДНК проводили по (11).

Спектральные свойства препаратов ДНК, выделенных из кинетопластов и ядер *S. oncoselti* ( $E_{260}/E_{230}=1,97$  и  $1,95$ ;  $E_{260}/E_{280}=2,11$  и  $2,00$ , соответственно) указывают на достаточно высокую степень их очистки от белков и полисахаридов. Из анализа кривых плавления следует, что Я-ДНК представлена популяцией относительно гомогенных молекул, тогда как препарат К-ДНК гетерогенен и содержит, по крайней мере, две разных группы молекул.

Таблица 1

Нуклеотидный состав кинетопластной и ядерной ДНК клеток *S. oncoselti* (мол.%)

Источник ДНК	A ± σ	T ± σ	G ± σ	C ± σ	G + C
ДНК кинетопласта	30,31 ± 0,32	26,81 ± 0,42	21,13 ± 0,45	21,74 ± 0,35	42,87 ± 0,38
ДНК ядра	24,81 ± 0,42	23,81 ± 0,30	25,66 ± 0,38	25,49 ± 0,33	51,14 ± 0,36

Таблица 2

Содержание пиримидиновых изооплит в кинетопластной и ядерной ДНК *S. oncoselti* (в мол.%)

Источник	моно-±σ	ди-±σ	три-±σ	тетра-±σ	пента-±σ	высшие ±σ
К-ДНК	15,75 ± 0,29	12,52 ± 0,19	9,95 ± 0,26	5,73 ± 0,21	2,89 ± 0,14	3,16 ± 0,23
Я-ДНК	12,73 ± 0,34	11,15 ± 0,39	7,18 ± 0,08	5,51 ± 0,17	3,97 ± 0,22	9,46 ± 0,38

Нуклеотидный состав кинетопластной и ядерной ДНК приведен в табл. 1. В отличие от Я-ДНК (ГЦ=51,1 мол.%) К-ДНК значительно обогащена АТ-парами (ГЦ=42,9% мол.%). Это хорошо совпадает с результатами, полученными ранее (12) при анализе состава ДНК непосредственно в кинетопластах *S. oncoselti* по методу Шмидта и Тангаузера. Следует отметить, что согласно данным, рассчитанным по  $T_{пл}$  и плавучей плотности, К-ДНК всех изученных представителей трипанозомид характеризуется более высоким АТ-типом, чем соответствующие Я-ДНК (1, 4, 13, 14).

В настоящее время митохондриальная природа кинетопласта не подлежит сомнению (1, 4). Однако обнаруженные по ряду свойств различия (размеры, гетерогенность молекул и их пространственная организация) не позволяют отождествлять К-ДНК с митохондриальной. В связи с этим представлялось важным сравнить характер распределения пиримидиновых изооплит в К-ДНК трипанозомид и в митохондриальных ДНК других эукариот. Известно, что митохондриальные ДНК высших эукариот по характеру распределения в них пиримидиновых изооплит разной длины весьма сходны между собой и существенно отличаются от соответствующих ядерных ДНК. Так, сблоченность пиримидинов в М-ДНК разных видов животных значительно ниже, чем в Я-ДНК тех же животных (9). По этому признаку М-ДНК высших животных напоминают М-ДНК дрожжей и сходны с ДНК большинства микроорганизмов (13).

Содержание пиримидиновых изооплит в ДНК кинетопласта и ядра *S. oncoselti* приведено в табл. 2. Из представленных результатов видно, что в К-ДНК суммарное количество моно- и дипиримидинов почти в 1,5 раза больше, а количество длинных ( $n \geq 6$ ) полипиримидиновых последовательностей примерно в 3 раза меньше, чем в соответствующей Я-ДНК. Следовательно, К-ДНК *S. oncoselti* определенно имеет меньшую сблоченность пиримидинов, чем Я-ДНК.

Интересно, что характер распределения пиримидиновых блоков оказался сходным как для кинезластной, так и для типичной митохондриальной ДНК. Это может косвенно указывать на единый принцип организации циркулярных молекул ДНК митохондрий и кинетопластов что, по-видимому, обусловлено общностью их генетической функции в клетке.

Сравнивая полученные данные с данными литературы (<sup>9</sup>), можно отметить, что по сравнению с М-ДНК многоклеточных эукариот, сблоченность К-ДНК *S. oncorhynchus* все же несколько выше. Не исключено, что это является следствием гетерогенности популяции молекул К-ДНК, представленных не только циркулярными, но и сложными линейными формами, которые могут отличаться по нуклеотидному составу и последовательности нуклеотидов.

Как уже указывалось, по уровню структурной организации кинетопластную ДНК можно отнести к мезокариотному типу. В этой связи обращает на себя внимание обнаруженный нами факт существования определенного параллелизма между характером распределения пиримидиновых блоков в ДНК и уровнем организации генома: прокариотный тип (М-ДНК) — мезокариотный тип (К-ДНК) — эукариотный тип (Я-ДНК). Это согласуется с нашими представлениями о том, что степень сблоченности пиримидинов в ДНК увеличивается по мере эволюции организмов (<sup>15</sup>).

Выражаем благодарность В. Д. Калининской и Г. Е. Сулимовой за полезное обсуждение результатов настоящей работы.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
16 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> L. Simpson, Intern. Rev. Cytol., v. 32, 140 (1972); J. Protozool., v. 20, 2 (1973).  
<sup>2</sup> P. Borst, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 333 (1972). <sup>3</sup> H. C. Renger, D. R. Wolstenholme, J. Cell Biol., v. 47, 689 (1970); v. 50, 533 (1971); v. 54, 346 (1972). <sup>4</sup> В. Д. Калининская, Журн. общ. биол., т. 35, 228 (1974). <sup>5</sup> M. Laurent, S. van Assel, M. Steinert, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 43, 278 (1971). <sup>6</sup> G. N. Zaitseva, A. T. Shirshov, Progress in Protozoology, Clermont-Ferrand, 1973, p. 521. <sup>7</sup> Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., Биохимия, т. 35, 565 (1970). <sup>8</sup> J. Marmur, J. Mol. Biol., v. 3, 208 (1964). <sup>9</sup> В. Ф. Ванюшин, М. Д. Кириос, FEBS Letters, v. 39, 195 (1974). <sup>10</sup> K. Burton, G. B. Petersen, Biochem. J., v. 75, 17 (1960). <sup>11</sup> М. Мандель, Дж. Мармур, В кн. Методы исследования нуклеиновых кислот, М., 1970, стр. 183. <sup>12</sup> Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., ДАН, т. 180, № 4 (1968). <sup>13</sup> M. Mandel, In: Chemical Zoology, v. 1, Protozoa, N. Y.—London, 1967, p. 541. <sup>14</sup> В. Г. Риоу, Р. Паурицелл, J. Protozool., v. 16, 509 (1969). <sup>15</sup> А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Молек. биол., т. 3, 846 (1969).