

Н. Б. СТРАЖЕВСКАЯ, Н. Л. КРУГЛОВА, В. А. СТРУЧКОВ,
З. И. КРАСИЧКОВА, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

СТРУКТУРА НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДНК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В наших предыдущих работах было показано (¹⁻³), что надмолекулярная ДНК (НМ ДНК), выделенная мягким фенольным методом из тимуса и печени крыс, имеет очень высокую эластовязкость и содержит несколько процентов негистонового остаточного белка (о.б.), РНК и липидов. На этом основании было высказано предположение, что НМ ДНК является ДНК-мембранным комплексом (³). Представляло интерес выяснить, какую роль играют обнаруженные нами липиды в организации НМ ДНК, критерием нативности которой служит величина эластовязкости, чему и посвящена настоящая работа.

Работу проводили на самцах белых крыс «Вистар» весом 120–140 г и на кроликах породы Шиншилла весом 2–2,5 кг. НМ ДНК из тимуса и печени крыс выделяли после мягкой гомогенизации вручную в стеклянном гомогенизаторе, а из лейкоцитов крови кролика — без гомогенизации с помощью мягкого фенольного метода, как описано ранее (^{1, 3}). В диализованных против 0,14 М NaCl рН 7 препаратах определяли содержание ДНК по дифениламину.

Как нами было показано (³), осаждение растворов НМ ДНК 96% этанолом (1:2) приводило к частичной экстракции липидов в этанол, что сопровождалось значительным уменьшением ее молекулярного веса. Мы предположили, что этанолабильные липиды могут принимать участие в организации НМ ДНК. Поэтому было решено экстрагировать липиды из НМ ДНК в мягких условиях, исключающих гидродинамический сдвиг и осаждение препаратов. С этой целью исходный раствор НМ ДНК (в 0,14 М NaCl рН 7, 40–50 мкг ДНК на 1 мл) смешивали с перегнанным 96% этанолом-ректификатом до конечной концентрации этанола 35%. Во избежание осаждения НМ ДНК медленно вливали в этанол, а не наоборот. Так как НМ ДНК очень чувствительна к гидродинамическому сдвигу, то перемешивание проводили путем очень осторожного 20-кратного переливания из колбы в колбу. Затем колбы герметично закрывали стеклянными пробками и инкубировали 24 часа при 37 или 50° С. При соблюдении оптимальных условий эксперимента (стерильная посуда, сохранение НМ ДНК в темноте и использование пипеток с широким носиком диаметром 2–3 мм) эластовязкость исходной НМ ДНК (без спирта) практически не менялась даже при инкубации в течение 3 суток. После термостатирования пробы НМ ДНК диализовали от этанола в стерильных диализных мешочках против 0,14 М NaCl при 4° в течение суток (3 смены, каждая по 4 л), определяли содержание ДНК. Об эффекте судили по изменению эластовязкости НМ ДНК до и после инкубации с 35% этанолом.

Эластовязкость 0,002% растворов НМ ДНК в 0,14 М NaCl рН 7 измеряли в капиллярном эластовискозиметре Стручкова (при 25°) и выражали в дл/г приведенной вязкости. Параметры эластовискозиметра: градиент 2300 сек⁻¹, длина капилляра 95 мм, диаметр капилляра 0,55 мм, объем верхнего шарика 7 см³, расстояние между шариками 15 мм. Характеристическую вязкость 0,002% растворов ДНК в 0,14 М NaCl рН 7 изме-

ряли при 25° в низкоградиентном трехшариковом вискозиметре с градиентами для 0,14 М NaCl 25; 36 и 50 сек⁻¹, градуированном по ротационному вискозиметру Зимма (4). Молекулярный вес ДНК рассчитывали на основании величин характеристической вязкости по формуле Эйтнера и Доти (5). Определение липидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии по ранее описанной методике (3). В каждый опыт брали тимус или печень от 3–4 крыс, а лейкоциты от 1–2 кроликов.

Таблица 1

Физико-химические параметры ДНК тканей животных до и после инкубации с 35% этанолом *in vitro* (инкубация 24 час.) *

| Объект выделения НМ ДНК | Температура при инкуба- ции, °С | Эластовязкость, дл/г | | Характеристи- ческая вяз- кость, дл/г Б |
|-------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-----------|--|
| | | А | Б | |
| Лейкоциты крови кро- ликов | 37 | 800±50(10) | 176±17(7) | 353±13(6) |
| Тимус крыс | 37 | 740±44(6) | 128±6(5) | 335±25(4) |
| | 50 | 810±52(3) | 196±18(3) | 318±40(3) |
| Печень крыс | 37 | 420±40(2) | 340±40(2) | 346±20(2) |
| | 50 | 435±15(3) | 216±6(3) | 292±25(3) |

* А — инкубация в 0,14 М NaCl и затем диализ; Б — инкубация в 0,14 М NaCl + 35% этанол и затем диализ; в скобках — число опытов.

В табл. 1 представлены основные результаты работы. Оказалось, что эластовязкость НМ ДНК лейкоцитов крови кроликов и тимуса крыс падает в 4 раза, а печени — в 2 раза после инкубации растворов НМ ДНК с 35% этанолом. Причем для препаратов НМ ДНК лейкоцитов кроликов и тимуса крыс достаточно температуры 37°, тогда как для НМ ДНК печени крыс необходима инкубация при 50°, что можно объяснить большим содержанием о.б. и липидов в НМ ДНК печени крыс (2, 3). Изучение кинетики инкубации показало, что эластовязкость НМ ДНК начинает снижаться только спустя 1 час после инкубации и достигает нижнего предела к 20–24 час. Кроме того, эффект падения эластовязкости НМ ДНК носит необратимый характер и не восстанавливается после удаления этанола диализом. Эти данные свидетельствуют о том, что эффект падения эластовязкости НМ ДНК в 35% этаноле, по-видимому, не связан с конформационными изменениями ее структуры.

Следует подчеркнуть, что независимо от различной исходной эластовязкости НМ ДНК в разных тканях этанол снижает ее до уровня ~200 дл/г для всех трех объектов (табл. 1). По-видимому, этанол нивелирует тканеспецифичность НМ ДНК. Значительное падение эластовязкости НМ ДНК после инкубации с этанолом предполагает субструктурную организацию ДНК в хроматине эукариотов, которая обусловлена ненуклеотидными связями. Анализ этанолабильных липидов показал, что они составляют только 0,1–0,2 от общих липидов (1–3%) в НМ ДНК и содержат фосфолипиды, холестерин, эфиры холестерина, жирные кислоты, моно- и диглицериды. Важно отметить, что в противоположность чувствительности к этанолу эластовязкость НМ ДНК крыс была устойчива к мягкой обработке РНКазой, трипсином, проназой и додецилсульфатом натрия (1, 2).

Характеристическая вязкость препаратов ДНК лейкоцитов кролика, тимуса и печени крыс после обработки 35% этанолом оказалась одного порядка — 353; 318 и 292 дл/г, что соответствует молекулярному весу 1–2·10⁸ дальтон. Как показали наши опыты, эти субъединицы не являются результатом гомогенизации тканей. Таким образом, приходим к выводу, что НМ ДНК, извлекаемая мягким фенольным методом (1, 2), пред-

ставляет сложный комплекс, основным структурным элементом которого является субъединица ДНК с молекулярным весом $1-2 \cdot 10^8$ дальтон и отражает, по-видимому, прижизненность дискретной организации ДНК в хроматине эукариотов.

В литературе пока нет определенного мнения о том, представлена ли хромосома животных одной непрерывной молекулой ДНК, подобно фагам и бактериям, или ДНК в хромосоме животных состоит из субъединиц, соединенных не нуклеотидными связями. Радиоавтографическое изучение показало (⁶, ⁷), что ДНК животных имеет молекулярный вес $1 \cdot 10^9 - 5 \cdot 10^{10}$ дальтон, который близок к размеру хромосомы. Однако изучение репликации ДНК в животных клетках обнаружило, что отдельные участки ДНК реплицируются одновременно (⁸), т. е. огромные молекулы ДНК, по-видимому, составлены из субъединиц — репликонов, и это дает основание предполагать дискретный характер организации ДНК в хромосоме животных.

Недавно Кавенов и Зимм (⁹) предложили эластовискозиметрический метод для измерения молекулярного веса ДНК непосредственно в клетках и определили, что молекулярный вес ДНК дрозофиллы равен $2-8 \cdot 10^{10}$ дальтон и соразмерен ее хромосоме. Однако авторы не исключают возможности, что эти огромные молекулы ДНК могут состоять из фракций мелких молекул, связанных между собой детергентпроназоустойчивыми связями. Наряду с этим, имеются работы (¹⁰⁻¹²), из которых следует, что ДНК в хромосоме животных состоит из субъединиц, молекулярный вес которых для различных клеток эукариотов (фибробласты мыши, лимфома, HeLa, китайский хомяк, почка обезьяны) колеблется в пределах $2-6 \cdot 10^8$ дальтон.

Таким образом, полученный нами и другими авторами (¹⁰⁻¹²) с помощью различных методов и на различных клетках одинаковый порядок величин молекулярного веса субъединиц ДНК, по-видимому, не случаен и свидетельствует об определенных закономерностях организации структурных ансамблей хромосомальной ДНК млекопитающих.

Важное место в обсуждаемой проблеме занимает и изучение природы связи между субъединицами (¹³⁻¹⁵). Так как в пространственной организации ДНК-мембранных комплексов животных принимают участие липиды (липопротеиды) (¹³⁻¹⁵), то с нашей точки зрения последние могут быть теми «линкерами», которые связывают субъединицы ДНК в надмолекулярный комплекс ДНК, либо являются местами прикрепления ДНК к мембране. В пользу такой возможности свидетельствует работа Элкайна (¹³), в которой показано, что ДНК-мембранный комплекс клеток китайского хомяка чрезвычайно лабилен и легко разрушается под влиянием низких доз радиации.

Выражаем благодарность Л. В. Сложеникиной за предоставление препаратов лейкоцитов крови кроликов.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцдино-на-Оке

Поступило
23 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Стручков, Биофизика, т. 7, 5, 538 (1962). ² Н. Б. Стражевская, Симпозиум. Механизмы радиационного поражения и восстановления ДНК, Пуцдино-на-Оке, 1972, стр. 96. ³ С. Д. Беляев, Н. Б. Стражевская и др., ДАН, т. 214, № 5, 1189 (1974). ⁴ В. Н. Zimm, D. M. Crothers, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 48, 965 (1962). ⁵ J. Eigner, P. Doty, J. Mol. Biol., v. 12, 549 (1965). ⁶ J. A. Huberman, A. D. Riggs, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 55, 599 (1966). ⁷ M. S. Sasaki, A. Norman, Exp. Cell Res., v. 44, 642 (1966). ⁸ J. A. Huberman, A. D. Riggs, J. Mol. Biol., v. 32, 327 (1968). ⁹ R. Kavenoff, B. H. Zimm, Chromosoma (Berl.), v. 41, 1 (1973). ¹⁰ T. Andoh, T. Ide, Exp. Cell Res., v. 73, 1, 122 (1972). ¹¹ J. T. Lett, E. S. Klucis, C. San, Biophys. J., v. 10, 3, 277 (1970). ¹² M. Gross-Bellard, P. Oudet, P. Chambon, Europ. J. Biochem., v. 36, 1, 32 (1973). ¹³ M. M. Elkind, Chin-Mei Chang-Liu, Int. J. Rad. Biol., v. 22, 1, 75 (1972). ¹⁴ M. G. Ormerod, A. R. Lehman, Biochim. et biophys. acta, v. 228, 2, 331 (1971). ¹⁵ C. E. Hildebrand, R. A. Tobey, Biochim. et biophys. acta, v. 331, 165 (1973).