

А. В. АЛЕСЕНКО, Е. Б. БУРЛАКОВА

РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ В СИНТЕЗЕ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 23 II 1976)

В настоящее время большое внимание уделяется роли ДНК-мембранного комплекса в процессе репликации ДНК. Но если в первоначальных исследованиях в основном изучали взаимодействие ДНК с белковыми компонентами мембраны, то в настоящее время все большее внимание привлекает изучение связи ДНК с мембраной, осуществляемой посредством липидов.

Существование структурной связи между фосфолипидами и ДНК впервые обнаружено при рентгеноструктурном анализе нуклеогистонов (^{1, 2}). О прочности этого комплекса можно судить по тем трудностям, которые сопровождают процесс выделения чистых препаратов ДНК, требующий использования органических растворителей, удаляющих липиды.

Доказательством важности ДНК-мембранного взаимодействия для репликации служит наличие множественных мест прикрепления хромосом к ядерной мембране (^{3, 4}). Показано, что реплицирующая «вилка» является мембранным липопротеиновым комплексом (⁵⁻⁷).

При исследовании синтеза ДНК в синхронизированной культуре клеток HeLa обнаружено, что ДНК обогащена фосфолипидами в фазе S (⁸). Установлено, что фосфолипиды не только структурно связаны с ДНК, но и влияют на ее функциональную активность. Так, было установлено, что удаление фосфолипидов из хроматина приводит к падению его матричной активности, которая может быть восстановлена добавлением исходных количеств фосфолипидных компонентов (⁹).

Кроме экспериментов, проведенных *in vivo*, существует ряд данных, указывающих на образование комплексов ДНК с различными фракциями фосфолипидов в системе *in vitro* (^{10, 11}). В зависимости от концентрации фосфолипидов обнаружен противоположный эффект на стабильность молекулы ДНК. На эффект взаимодействия ДНК с фосфолипидами оказывает влияние состав жирных кислот. В модельных системах насыщенные длинноцепочечные жирные кислоты (C_{18:0}, C_{24:0}) дестабилизируют спираль ДНК. Ненасыщенные жирные кислоты обладают стабилизирующим действием (¹¹).

В связи с вышеизложенным представляло интерес исследование изменения состава фосфолипидов ядер в процессе синтеза ДНК.

В качестве моделей нами выбраны синхронизированная тимидином культура клеток HeLa и регенерирующая печень мышей. Степень синхронизации клеток HeLa двойным тимидиновым блоком составляет 96—98% по фазе S. При удалении ²/₃ печени клетки оставшегося органа делятся на начальных стадиях регенерации с определенной степенью синхронности. В опытах использованы мыши-самцы линии СВА весом 20—22 г. Мыши перед операцией содержались на общевиварном рационе. Оперирование животных проводили с таким расчетом, чтобы исключить влияние суточного ритма митозов и синтеза ДНК. Клетки HeLa снимали трипсином со стеклянной подложки и центрифугировали, трижды промывая физиологическим раствором. Ядра из клеток печени получали по методу

Шово (¹²). Липиды из ядер и клеток HeLa извлекали по методу Фолча. Состав фосфолипидов определяли с помощью двумерной тонкослойной хроматографии в смеси растворителей хлороформ : метанол : 28% водный аммиак 65:35:5 по горизонтали и хлороформ : ацетон : метанол : уксусная кислота : вода 50:20:10:10:5 по вертикали на пластинках размером 6×6 см². Количество фосфолипидов определяли по содержанию фосфора спектрофотометрически (¹³).

Результаты экспериментов и их обсуждение. На синхронизированной культуре клеток HeLa мы обнаружили, что общее

количество фосфолипидов увеличивается при прохождении клеток по фазам цикла. В стадии G₁ общее количество липидного фосфора составляет $65,1 \pm 1,5\%$, а в фазе синтеза ДНК оно равно $83,7 \pm 1,3\%$. При определении фосфолипидного состава было найдено, что в S-фазе происходит увеличение минорных фракций (фосфатидилинозита, фосфатидилсерина и сфингомиелина) фосфолипидов (табл. 1).

Поскольку вышеприведенные данные получены на куль-

туре опухолевых клеток, то важно было рассмотреть, сохраняется ли такая же закономерность и в клетках, деление которых контролируется со стороны интактного организма. В связи с этим мы изучили изменение состава фосфолипидов в ядрах клеток регенерирующей печени после частичной гепатэктомии. На рис. 1 представлено изменение процента меченых ядер клеток печени на ранних этапах ее репаративной регенерации. В течение 26–28 час. синтез ДНК в регенерирующей печени практически не регистрируется. Через 30 час. появляется небольшое количество клеток, синтезирующих ДНК. Далее число меченых ядер нарастает, достигая максимума к 43 час. Максимальное число клеток, одновременно синтезирующих ДНК, равно 55%. Таким образом, в наших экспериментах фазы G₀+G₁ занимают интервал до 30 час., затем наступает фаза синтеза ДНК.

Ядра из клеток печени были выделены через 20, 26, 37, 42 и 48 час. после операции, т. е. в интервалы, предшествующие синтезу ДНК (20–26 час.), в момент ее интенсивного синтеза (37–42 час.) и в сроки, когда наблюдается уменьшение числа ДНК-синтезирующих клеток. Из табл. 2 видно, что основное изменение в составе фосфолипидов ядер происходит во фракции сфингомиелина, фосфатидилинозита и фосфатидилсерина.

Важно отметить, что эти изменения носят фазовый характер и связаны с прохождением клеток по циклу. Так, например, количество фосфатидилсерина и фосфатидилинозита в конце пресинтетической фазы заметно снижается, но затем в процессе синтеза ДНК происходит их постепенное нарастание, так что уровень фосфатидилинозита превосходит контрольный почти в 1,8 раза.

Уровень фосфатидилхолина в пресинтетической фазе изменяется незначительно: через 20 час. после операции снижается в 1,5 раза и вновь достигает контрольных значений через 26 час. после операции. В последующие сроки обнаруживается его прогрессирующий спад (с $48,0 \pm 1,8\%$ в контроле до $22,6 \pm 1,9\%$ через 48 час. после операции). Количество лизофосфатидилхолина через 20 час. после операции значительно увеличивается, а через 26 час. уменьшается почти в 2 раза, но в фазе синтеза ДНК вновь возрастает.

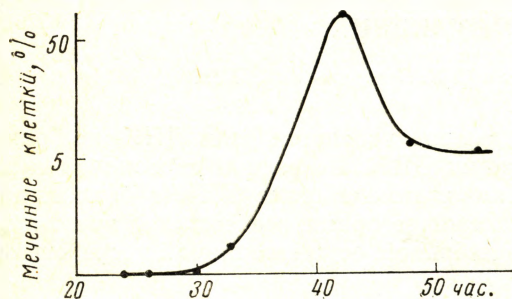


Рис. 1. Изменение меченых ядер клеток печени

Важно отметить, что эти изменения концентрации лизофосфатидилхолина и фосфатидилхолина происходят в противоположных направлениях.

Фракция кардиолипина нарастает в пресинтетической фазе (до 26 час. после операции), в фазе синтеза ДНК тенденция к увеличению ослабевает, однако уровень кардиолипина по-прежнему значительно превышает исходные значения. Аналогичные данные получены в работе (14).

Таблица 1

Изменение состава фосфолипидов клеток HeLa на разных стадиях клеточного цикла (% фосфора от суммы фосфолипидов)

Фракция фосфолипидов	Стадия цикла		
	G ₁	S	G ₂
Кардиолипин	3,6±0,3	2,6±0,2	4,4±0,5
Фосфатидилэтаноламин	27,6±1,4	20,4±0,7	29,5±1,3
Фосфатидилхолин	45,8±2,7	42,8±1,7	36,0±1,8
Сфингомиелин	5,8±0,3	11,9±0,5	12,3±0,7
Фосфатидилсерин	9,4±0,4	11,3±0,5	8,3±0,2
Фосфатидилинозит	7,8±0,8	11,0±0,8	9,5±0,6

Таблица 2

Изменение состава фосфолипидов в ядрах клеток регенерирующей печени мышей (% фосфора от суммы фосфолипидов)

Фракция фосфолипидов	Время регенерации (часы)					
	контроль	20	26	37	42	48
Кардиолипин	3,6±0,3	5,8±0,6	11,5±0,9	9,7±0,8	9,0±0,6	8,7±0,4
Фосфатидилэтаноламин	27,1±0,9	25,1±1,4	24,2±1,3	27,6±1,3	26,6±0,9	18,2±1,6
Фосфатидилхолин	48,0±1,8	31,1±1,7	47,8±2,1	32,8±1,7	31,7±2,1	22,6±1,9
Сфингомиелин	4,5±0,4	8,2±0,4	5,3±0,4	7,8±0,6	8,8±0,6	15,7±0,9
Фосфатидилсерин	5,8±0,8	8,5±0,6	7,7±0,2	9,4±0,4	9,1±0,4	12,4±0,6
Фосфатидилинозит	7,0±1,1	10,1±0,5	3,4±0,4	5,7±0,3	7,7±0,6	12,5±0,4
Лизофосфатидилхолин	4,0±0,5	10,5±0,7	4,6±0,3	7,0±0,3	7,1±0,3	10,0±0,5

Количество фосфатидилэтаноламина существенно не меняется, и лишь через 48 час. после операции мы обнаружили его уменьшение в 1,5 раза. Наиболее выраженные изменения наблюдаются для фракции сфингомиелина. В фазе синтеза ДНК его количество значительно увеличивается и максимальный уровень превышает контрольный почти в 3,5 раза. Интересно сопоставить наблюдаемые нами изменения в фосфолипидном составе ядер с его изменениями в микросомах и митохондриях, полученными в работе (15).

Фракция кардиолипина в митохондриях через 12, 30, 48 и 96 час. после операции снижается на фоне незначительных ее изменений в гомогенате. В наших же экспериментах уровень кардиолипина возрастает. Напротив, количество фосфатидилэтаноламина в гомогенате, так же как и в ядрах, заметно не меняется. Изменение его содержания в микросомах и митохондриях происходит в противоположных направлениях. Эти сопоставления дают основание предположить перераспределение фосфолипидов между субклеточными фракциями.

Наибольшей устойчивостью характеризуется фракция фосфатидилхолина, количество которого незначительно колеблется как в ядрах, так и в гомогенате, микросомах и митохондриях. Изменения фосфатидилсерина и фосфатидилинозита, как и в ядрах, носят фазовый характер.

Таким образом, мы приходим к выводу, что в процессе синтеза ДНК для всех органелл и для целых клеток на примере синхронизированных клеток HeLa характерно повышение количества минорных фракций фосфолипидов, причем особенного увеличения достигает фракция сфингомиелина в ядрах.

В работе Манзоли и соавторов ⁽¹¹⁾ указывалось, что увеличение концентрации фосфолипидов приводит к дестабилизации спирали молекулы ДНК. Особенно быстрым и глубоким дестабилизирующим действием обладает сфингомиелин, который образует прочные комплексы с основаниями ДНК. В наших экспериментах получено, что увеличение концентрации сфингомиелина происходит в тот период, когда по времени молекула ДНК должна «расплетаться». Возможно, что в процессе репликации, когда хромосомы имеют контакты с мембраной, сфингомиелин, внедряясь в хроматин, вызывает дестабилизацию молекулы ДНК, тем самым способствуя процессу расплетания. Поскольку сфингомиелин способен оказывать дестабилизирующий эффект на молекулу ДНК в меньших концентрациях по сравнению с другими липидами, то можно говорить о более выраженном сродстве некоторых участков ДНК именно к сфингомиелину. Мы полагаем, что этот эффект может быть связан с наличием в молекуле сфингомиелина сфингозинового остатка, который по своей структуре комплементарен к пуриновым основаниям.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 II 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. H. F. Wilkins, G. Zubay, H. R. Wilson, J. Mol. Biol., v. 1, 179 (1959). ² J. F. Pardon, M. H. F. Wilkins, J. Mol. Biol., v. 68, 115 (1972). ³ D. E. Comings, Am. J. Human Gen., v. 20, 440 (1968). ⁴ D. E. Comings, T. A. Okada, Exp. Cell Res., v. 62, 293 (1970). ⁵ R. Knippers, Nature, v. 228, 1050 (1970). ⁶ E. F. Baril, M. D. Jenkins et al., Science, v. 169, 87 (1970). ⁷ E. F. Baril, O. E. Brown et al., Biochemistry, v. 10, 1981 (1971). ⁸ D. E. Comings, T. Kakefuda, J. Mol. Biol., v. 33, 225 (1968). ⁹ H. G. Rose, D. H. Frenster, Biochim. et biophys. acta, v. 106, 577 (1965). ¹⁰ F. A. Manzoli, H. J. Muchmore et al., ibid., v. 277, 251 (1972). ¹¹ F. A. Manzoli, J. H. Muchmore et al., ibid., v. 340, 1 (1974). ¹² J. Chauveav, J. Moule, Ch. Rouiller, Exp. Cell Res., v. 11, 317 (1956). ¹³ F. Lucena-Conde, L. Prat, Anal. chim. acta, v. 16, 473 (1957). ¹⁴ M. Bornens, Bull. Soc. chim. biol., v. 50, 591 (1968). ¹⁵ Э. В. Дятловицкая, Б. Д. Малере и др., Биохимия, т. 38, 2, 351 (1973).