

13. *Маянский Д. Н.* Роль макрофагов в репаративных процессах // *Механизмы патол. реакций.*— Томск : Изд-во Томск. ун-та, 1981.— С. 56—62.
14. *Серов В. В., Шехтер А. Б.* Соединительная ткань.— М. : Медицина, 1984.—171 с.

Ин-т орг. химии АН УССР, Киев

Получено 04.07.88

THE POSSIBILITY OF THE TISSUE REGENERATION INTENSIFICATION
BY AN INCREASE IN THE DIFFERENTIATION DEGREE OF CELL ELEMENTS
AND CONDITIONS OF TISSUE DEFECT

M. A. Galatenko, G. A. Pkhakadze, E. S. Savitskaya, N. N. Bufius

Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Polymeric levamisole-containing drug of the prolonged action has been studied for its effect on regeneration processes of two types of connective tissues. It is shown possible to accelerate the regeneration processes by an increase in the cell differentiation in the place of implantations.

УДК 576.813.12:577.23

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

**К ВОПРОСУ О НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
НУКЛЕОИДОВ ЭУКАРИОТ**

Свойства нуклеоидов, выделенных из клеток лейкоза L1210 мышей, исследовали методами капиллярной эластовискозиметрии и седиментации. Изучалось действие на нуклеоиды тиолов (2-меркаптоэтанола, дитиотреитола), проназы Р, РНКазы А, этанола, трихлорацетата натрия, нагревания до 60 и 95°C. Показано, что повреждение каркаса нуклеоидов тиолами и проназой вызывает декомпактизацию комплекса без потери доменами ДНК суперспиральной конформации. Декомпактизация структуры комплекса наблюдается также в том случае, если выделенные нуклеоиды подвергаются действию РНКазы А в среде с низкой ионной силой; в других вариантах ферментных обработок декомпактизирующего действия РНКазы А на нуклеоид не обнаружено.

Показано, что нагревание препаратов нуклеоидов до температуры плавления двойной спирали ДНК приводит к полной релаксации суперспиральных доменов и деградации комплекса.

Введение. Проблеме суперспирально-доменной организации хроматина эукариот и функционального значения явления суперспирализации ДНК посвящен ряд обзоров последних лет [1—3]. В настоящее время доказано наличие в геноме эукариотической клетки относительно обособленных областей — петлевых доменов ДНК, — прикрепленных к элементам ядерного скелета (фибрилярно-гранулярной сети интерфазного ядра и фиброному слою ядерной стенки — «ламине») [1—4].

Удобным объектом для исследования данного уровня организации клеточного ядра являются нуклеоиды — остаточные ядерные структуры, состоящие из всей ядерной ДНК, белкового ядерного матрикса, фиброзной «ламины» и небольших количеств РНК, липидов и полисахаридов [1, 5, 6]. Нуклеоиды получают при обработке изолированных ядер или целых клеток неионными детергентами и концентрированными растворами солей, что приводит к последовательной сольubilизации мембран и экстракции большинства растворимых белков [7, 8]. Если процедура лизиса предусматривает подавление эндогенной нуклеазной и протеолитической активности, то полученные нуклеоиды, как правило, содержат суперспиральную ДНК в виде сверхскрученных петель (доменов) [1, 8—10].

В предыдущем сообщении мы показали влияние условий выделения нуклеоидов на структуру и свойства полученных препаратов [11]. В настоящей работе сделана попытка оценить роль отдельных компонентов этого комплекса в поддержании его компактной структуры и суперспиральной конформации ДНК.

Материалы и методы. В работе использованы клетки перевиваемого лимфобластного лейкоза *L1210*, выделенные из асцитной жидкости мышей линии *DBA/2* на 6-е сут после внутрибрюшинной перевивки 10^6 опухолевых клеток.

Препараты нуклеоидов для эластовискозиметрических исследований получали лизисом целых клеток в течение 60 мин в растворе, содержащем 2 моля/л NaCl в буфере TET (10 мМ трис-основание, 100 мМ Na_2 -ЭДТА, pH 7,6, 0,5 %-ный тритон X-100), по методике, описанной нами ранее [11, 12]. В зависимости от цели эксперимента в состав лизирующего раствора вносили дополнительно 2-меркаптоэтанол («Serva», ФРГ) — до 250 мМ; дитиотреитол (ДТТ, «Calbiochem», США) — до 20 мМ; этанол — до 250 мМ; трихлорацетат натрия («Serva») — до 100 мМ. В ряде экспериментов после 60 мин лизиса при 20 °С образцы помещали на 5 мин в водяную баню (60 или 95 °С), после чего быстро охлаждали и использовали для эластовискозиметрии.

Обработку нуклеоидов ферментами проводили, лизируя клетки в растворах с меньшим содержанием солей: 1,0 М NaCl в буфере TET при инкубации с проназой Р (из *Streptomyces griseus*, удельная активность 45000 ед/г, «Serva») и 0,05–2,0 М NaCl в буфере TET при инкубации с панкреатической РНКазой А («Schuchardt», ФРГ).

Капиллярную эластовискозиметрию образцов проводили, как описано ранее [11, 12]. Во всех случаях для эластовискозиметрического титрования суперспиральной ДНК в состав лизирующего раствора вносили бромистый этидий («Merck», ФРГ), дробно повышая его конечную концентрацию до 40 мкг/мл [11, 12].

Седиментацию нуклеоидов вели в 5–20 %-ном градиенте концентрации сахарозы, содержащем 2,0 М NaCl, 50 мМ цитрат натрия, 20 мМ Na_2 -ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 0,05 % азиды натрия, в пробирках бакет-ротора «6×16,5» («MSE», Англия) в течение 2 ч при 22500 об/мин (20 °С), центрифуга «High Speed-25» («MSE»). Клетки лизировали на поверхности градиентов [12, 13]. Положение нуклеоидов определяли фотометрически, используя описанную ранее автоматизированную систему обработки седиментограмм [14]. В ряде случаев между сахарозным градиентом и слоем лизирующего раствора помещали зону с низкой ионной силой (0,5 мл буфера ТКМ: 25 мМ трис-HCl, pH 7,6, 25 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , плотность которого доведена до $\rho = 1,092$ г/см³ добавлением сахарозы), содержащую 0–400 мкг/мл РНКазы А [13].

Белковый состав нуклеоидов анализировали методом электрофореза в однородном полиакриламидном геле ($T=12,5$ %, $C=2,6$ %) в присутствии DS-Na по Леммли [15]. Для этого нуклеоиды отделяли от диссоциировавших белков седиментацией в ступенчатом градиенте сахарозы, анализировали против буфера ТКМ с добавлением 1 мМ ФМСФ и 0,02 % азиды натрия в течение 2 сут при 4 °С (4×200 мл), проводили ферментативный гидролиз ДНК (5 ед. Кунитца/мл ДНКазы 1+20 ед/мл бактериальной эндонуклеазы в буфере ТКМ с добавлением 1 мМ ФМСФ) в течение 3 ч при 37 °С и отделяли осадок, содержащий скелетные структуры ядра, центрифугированием при 5000 *g* в течение 30 мин (20 °С).

Результаты и обсуждение. Наличие белкового каркаса предполагает высокую чувствительность структуры и свойств нуклеоидов к действию протеолитических ферментов. На рис. 1 показаны изменения эластовязкости (ЭВ) клеточных лизатов при повышении протеолитической активности лизирующего раствора. ЭВ возрастает пропорционально увеличению количества фермента (проназа Р) до некоторого предельного значения (около 250 % от контроля), соответствующего, видимо, исчерпывающей обработке в выбранных условиях (1,0 М NaCl в буфере TET+1 мг/мл проназы Р, лизис 60 мин, 20 °С). Аналогичные результаты получены многими авторами, применявшими седиментационный анализ нуклеоидов [1, 16–19].

Наблюдающиеся изменения ЭВ лизатов не связаны с релаксацией суперспиральной ДНК, поскольку при всех исследованных концентрациях проназы сохраняется бифазная форма кривой титрования нуклеоидов бромистым этидием (рис. 1, вставка), что позволяет предположить

проназоустойчивую природу конформационных ограничений суперспирализованных доменов ДНК. С этим предположением согласуются результаты других авторов, использовавших протеолитическую обработку ядер для выделения суперспиральной ДНК [1, 20—22]. Пока не яс-

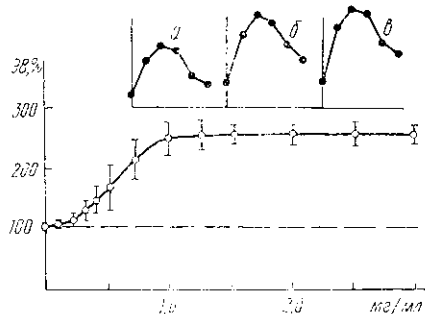


Рис. 1. Зависимость ЭВ препаратов нуклеондов от концентрации проназы Р в составе лизирующего раствора (1 М NaCl в буфере TET). Лизис 60 мин, 20°C. Вставка: кривые титрования бромистым этидием [11] нуклеондов, полученных при лизисе клеток 1 М NaCl в буфере TET без проназы (а), с 1,0 (б) и 3,0 мг/мл (в) проназы Р

Fig. 1. Dependence of nucleoid preparations viscoelasticity (VE) on the pronase P concentration in the lysis solution (1 M NaCl in TET buffer). Lysis — 60 min, 20°C. Cut-in: Ethidium bromide (EtBr) titration curves [11] of nucleoids obtained during cell lysis with 1 M NaCl in TET buffer without pronase (a), with 1.0 mg/ml (b) and 3.0 mg/ml (c) of pronase P

но, следует ли из этого наблюдения вывод о небелковой природе конформационных ограничений либо участвующие в этих ограничениях белки устойчивы к протеиназам [1, 23]. Для ответа на этот вопрос мы

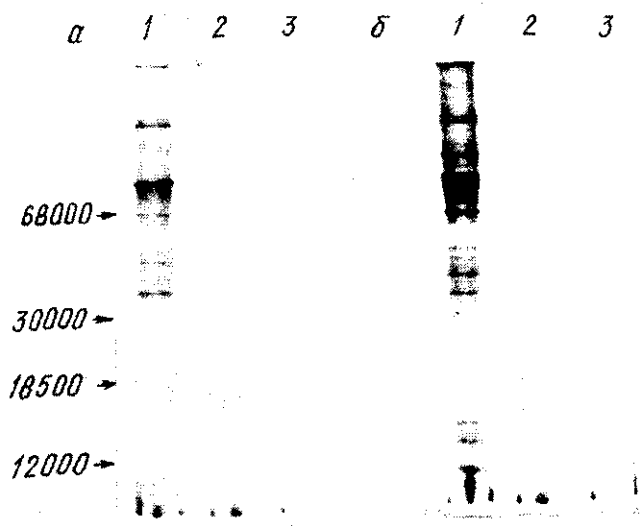


Рис. 2. Электрофорезграммы белков нуклеондов, полученных по обычной методике (1) и с применением 1,0 (2) или 3,0 мг/мл (3) проназы Р. Электрофорез в ПААГ, содержащем DS-Na по [15]. Двухстадийная окраска кумасем G-250 (а) и серебрением (б). Слева — стандарты молекулярных масс

Fig. 2. Electrophoregrams of nucleoid proteins obtained by the standard method (1) and using 1.0 mg/ml (2) or 3.0 mg/ml (3) of pronase P. DS-Na-PAGE according to Laemmli [15]. Two-stage staining with Coomassie G-250 (a) and silvering (b). Left — standard molecular weights (Da)

провели электрофоретический анализ белков нуклеондов, полученных в стандартных условиях и с применением проназы Р. На рис. 2 приведены результаты этих исследований: ни стандартной окраской электрофорезграмм кумасем, ни высокочувствительной окраской серебрением [24] нам не удалось обнаружить белковых компонентов в нуклеоидах, выделенных с применением проназы. Нельзя, однако, исключить, что примененная для выделения каркаса нуклеондов обработка их перед электрофорезом нуклеазой приводит к потере прочно связанных с ДНК белков вместе с фрагментами отщепившейся ДНК либо они ут-

рачиваются вследствие остаточной протеолитической активности, присутствующей в образцах. Для окончательного выяснения данного вопроса необходимы дальнейшие исследования.

В литературе имеются сведения о том, что надмолекулярные комплексы типа нуклеоидов чувствительны к действию восстанавливающих агентов: тиолов, аскорбиновой кислоты, гидрохинона; в связи с этим обсуждается роль дисульфидных связей белков в поддержании струк-

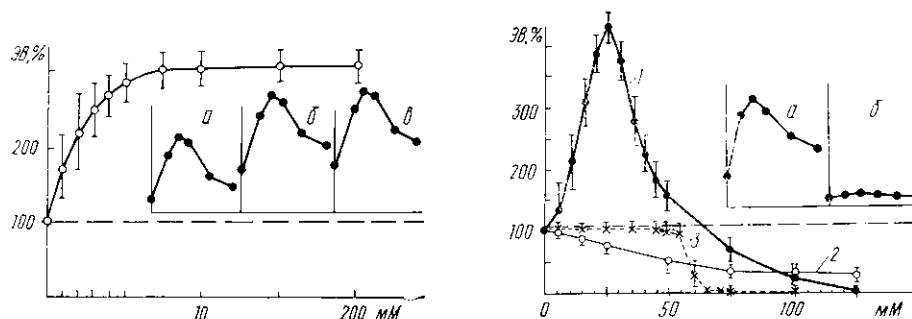


Рис. 3. Зависимость ЭВ препаратов нуклеоидов от содержания в составе лизирующего раствора ДТТ. Вставка: кривые титрования бромистым этидием [11] нуклеоидов, полученных при лизисе клеток 2 М NaCl в буфере TET без ДТТ (а), с 5 (б) и 20 ммоль/л (в) ДТТ

Fig. 3. Relationship between the dithiothreitol contents in the lysic solution and VE of nucleoid preparations. **Cut-in:** EtBr titration curves of nucleoids obtained during cell lysis with 2 M NaCl in TET buffer without dithiothreitol (a), with 5 (b) and 20 mmol/l (c) of dithiothreitol

Рис. 4. Зависимость ЭВ препаратов нуклеоидов от содержания в составе лизирующего раствора 2-меркаптоэтанола (1), этанола (2) или трихлорацетата натрия (3). Вставка: кривые титрования бромистым этидием [11] нуклеоидов, полученных при лизисе клеток 2 М NaCl в буфере TET с 20 (а) и 100 ммоль/л (б) 2-меркаптоэтанола

Fig. 4. Relationship between nucleoid preparations VE and the contents in the lysic solution of 2-mercaptoethanol (1), ethanol (2) or sodium trichloroacetate (3). **Cut-in:** EtBr titration curves of nucleoids obtained during cell lysis with 2 M NaCl in TET buffer with 20 mmol/l (a) and 100 mmol/l (b) of 2-mercaptoethanol

туры комплекса [17, 18, 22], а И. В. Филиппович рассматривает эти связи как возможные конформационные ограничения суперспиральной ДНК [1].

Мы провели лизис клеток лейкоза *L1210* в стандартных условиях выделения нуклеоидов (2,0 М NaCl в TET-буфере, лизис 60 мин, 20 °С), но с добавлением в лизаты ДТТ. Оказалось, что его действие в общих чертах аналогично протеолизу: наблюдающаяся декомпактизация комплекса (повышение ЭВ) не связана с релаксацией суперспиральных доменов ДНК (рис. 3). Однонаправленность эффектов проназы и 2-меркаптоэтанола отмечена еще в ранней работе Андо и Иде [17].

Однако в наших экспериментах 2-меркаптоэтанол в отличие от ДТТ проявлял двухстадийное действие на структуру нуклеоида в зависимости от его концентрации в лизирующем растворе. Мягкое воздействие относительно небольших концентраций агента (до 25 мМ) приводит к резкому повышению ЭВ образцов с сохранением суперспиральной конформации ДНК, как и в случае применения ДТТ; более энергичная обработка вызывает экспоненциальное падение ЭВ до нуля (рис. 4). Седиментационный анализ нуклеоидов на этой стадии выявляет значительное снижение их подвижности в сахарозном градиенте и размывание симметричного пика (рис. 5), что следует интерпретировать как деградацию комплекса с утратой суперспиральной конформации ДНК. К аналогичному заключению приходят другие авторы, анализируя процесс линейаризации квазизамкнутых петель ДНК под действием 2-меркаптоэтанола [25].

Вопрос о деградации надмолекулярных комплексов ДНК до структур низшего порядка организации при действии тиолов уже обсуждался в литературе, однако одни авторы связывают эту деградацию с диссоциацией некоего линкерного белка (предположительно с молекулярной массой около 52 000), осуществляющего прочное взаимодействие ДНК с ядерным матриксом [26, 27], другие — с распадом ДНК на tandemно связанные субъединицы [28]. Наконец, недавно высказана точ-

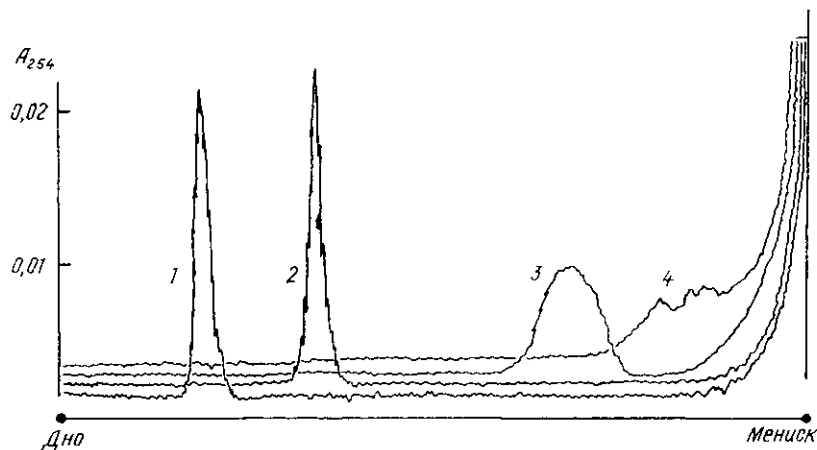


Рис. 5. Профили седиментации в 5—20 %-ном градиенте концентрации сахарозы (рН 7,6) нуклеоидов, выделенных по обычной методике (1), в присутствии 20 (2), 100 ммоль/л (3) 2-меркаптоэтанола или 100 ммоль/л трихлорацетата натрия (4)
 Fig. 5. Sedimentation profiles in 5-20 % gradient of sucrose concentration (pH 7.6) of nucleoids isolated using standard method (1), in the presence of 20 mmol/l (2) or 100 mmol/l (3) of 2-mercaptoethanol, or 100 mmol/l of sodium trichloroacetate (4)

ка зрения, согласно которой деградация комплекса наступает вследствие повышения хелатирующей способности ЭДТА в присутствии 2-меркаптоэтанола, приводящей к удалению двухвалентных катионов (предположительно ионов меди и цинка) [2]. Данная концепция приводилась и ранее [29].

На основании полученных в настоящей работе результатов и данных других авторов следует заключить, что дисульфидные связи белков принимают определенное участие в поддержании компактной структуры нуклеоидов, однако не участвуют в конформационных ограничениях суперспиральной ДНК. Деградация же нуклеоидов при воздействии высоких концентраций 2-меркаптоэтанола может быть связана с более сложными процессами, чем простое восстановление дисульфидных групп. Известно, что добавление к водным растворам белков органических растворителей, в частности низших спиртов, изменяет степень их ионизации, вызывает дегидратацию молекул и нарушение электростатических и гидрофобных взаимодействий. В условиях разрушения дисульфидных связей такие изменения межмолекулярных контактов могут вызывать распад комплекса на субчастицы. Возможно, наконец, и действие 2-меркаптоэтанола в качестве липидного растворителя, экстрагирующего структурные липиды комплекса [30].

Действительно, присутствие этанола в составе лизирующего раствора заметно снижает ЭВ лизатов (рис. 4), однако ДНК сохраняет суперспиральную конформацию при всех исследованных концентрациях агента, чем действие этанола отличается от необратимо денатурирующего нуклеоид влияния трихлорацетата натрия: в присутствии последнего ЭВ лизатов падает до нуля (рис. 4), а на седиментограмме регистрируется фрагментация ДНК (рис. 5).

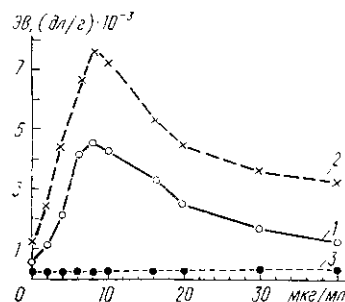
Известно, что как в состав нуклеоида, так и ядерного матрикса входит небольшая часть РНК, причем не только РНК транскриптов и

остаточного ядрышка [1, 2, 5, 6, 31]. Возможная роль РНК в поддержании структуры нуклеонда и (или) ядерного матрикса в течение ряда лет обсуждается в литературе, однако данные разных авторов противоречивы [9, 16, 31—33]. Так, имеются сведения о снижении седиментационной подвижности нуклеондов после обработки РНКазой А [1, 33], но в других работах подобного эффекта не наблюдали [16, 19].

Мы провели лизис клеток лейкоза *L1210* в буфере ТЕТ с различным содержанием хлорида натрия и РНКазы А: в низко- (0,05 М NaCl), средне- (1,0 М NaCl) и высокосолевым (2,0 М NaCl) растворах, а также в растворах с изменяющейся в процессе лизиса ионной силой (0,05—1,0 и 1,0—2,0 М NaCl). Во всех случаях ЭВ лизатов не изменялась

Рис. 6. Кривые титрования бромистым этидилом [11] нуклеондов, выделенных при лизисе клеток 2 М NaCl в буфере ТЕТ: 1 — в течение 60 мин при 20 °С; 2 — то же с последующим прогревом 5 мин при 60 °С; 3 — то же при 95 °С. Среднее из трех независимых измерений

Fig. 6. EtBr titration curves of nucleoids isolated during cell lysis with 2 M NaCl in TET buffer: 1 — for 60 min at 20 °С; 2 — for 60 min at 20 °С with subsequent heating for 5 min at 60 °С; 3 — for 60 min at 20 °С plus heating for 5 min at 95 °С. Each value is a mean of three independently obtained measurements



при варьировании концентраций РНКазы А в составе лизирующего раствора от 0 до 1,0 мг/мл (лизис 60 мин, 20 °С), а ДНК сохраняла суперспиральную конформацию (результаты не представлены). Однако при седиментационном анализе нуклеондов в сложном градиенте концентрации сахарозы, содержащем зону низкосолевого среды с РНКазой А между лизатом и вершиной линейного градиента, наблюдается достоверное снижение относительной седиментационной подвижности (S_r) комплекса (панкреатическую РНКазу А, освобожденную от примеси ДНКаз и протеиназ предварительным прогревом (5 мин, 75 °С, рН 5,5), растворяли в буфере ТКМ с добавлением сахарозы (см. «Материалы и методы»), раствор насланвали на вершину сахарозного градиента под слой лизирующего раствора):

РНКазы А, мкг/мл	S_r
0	1,00
50	0,84±0,12
100	0,61±0,08
200	0,47±0,05
300	0,44±0,06
400	0,46±0,05

Видимо, концентрация фермента, превышающая 200 мкг/мл, в выбранных условиях эксперимента соответствует исчерпывающему гидролизу той фракции РНК, которая вовлечена в процесс поддержания компактной структуры комплекса.

Связан ли этот эффект с релаксацией суперспиральной ДНК либо обусловлен (как в случае обработки проназой и тополами) декомпактизацией каркаса нуклеонда, остается неясным.

В предыдущем сообщении приведены данные о снятии конформационных ограничений суперспиральной ДНК нуклеондов при обработке последних щелочью [11]. Подобный же эффект оказывает кратковременное нагревание образцов до 95—100 °С, т. е. до температуры плавления ДНК, в то время как при более низких температурах инкубации (60 °С) релаксации суперспиральных доменов не наблюдается (рис. 6). Эти результаты позволяют предположить, что суперспиральная конформация доменов ДНК стабилизируется силами комплексов

тарного взаимодействия нитей молекулы, т. е. они играют роль конформационных ограничений.

На основании полученных экспериментальных данных мы заключаем следующее.

1. Происходящая при повреждении белкового каркаса протеиназами или тиолами декомпактизация нуклеоидов не связана с релаксацией суперспиральной ДНК.

2. Ядерная РНК, видимо, принимает участие в организации нуклеоидов и поддержании их компактной структуры, однако ее роль в обеспечении конформационных ограничений суперспиральных доменов ДНК остается неясной.

3. Суперспиральная конформация ДНК нуклеоидов обладает выраженной щелоче- и термолабильностью, что дает основания предполагать участие в обеспечении конформационных ограничений сил элементарного взаимодействия нитей дуплекса.

Авторы выражают благодарность А. К. Белоусовой и Н. Б. Стражевской за ценные критические замечания, высказанные при обсуждении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филиппович И. В., Сорокина Н. И. Суперспиральная ДНК клеточного ядра // Успехи соврем. биологии.— 1983.—95, № 2.— С. 163—180.
2. Глазков М. В. Структурно-функциональная организация ДНК в интерфазном ядре. Структурный аспект // Молекуляр. биология.— 1988.—22, № 1.— С. 16—30.
3. Nicolini C. Chromatin structure: from nuclei to genes. (Review) // Anticancer Res.— 1983.— N 3.— P. 63—86.
4. Igo-Kemenes T., Zachau H. G. Domains in chromatin structure // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1978.—42.— P. 109—118.
5. Збарский И. Б. Белковый состав и организация ядерного матрикса // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 1.— С. 26—32.
6. Igo-Kemenes T., Hörz W., Zachau H. G. Chromatin // Annu. Rev. Biochem.— 1982.— 51.— P. 89—121.
7. Cook P. R., Brazell I. A. Conformational constraints in nuclear DNA // J. Cell Sci.— 1976.—22, N 2.— P. 287—302.
8. Benyajati C., Worcel A. Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster* // Cell.— 1976.—9, N 2.— P. 393—407.
9. Cook P. R., Brazell I. A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // J. Cell Sci.— 1976.—22, N 2.— P. 303—324.
10. Cook P. R., Brazell I. A. The superhelical density of nuclear DNA from human cells // Eur. J. Biochem.— 1977.—74, N 2.— P. 527—531.
11. Блохин Д. Ю., Стручков В. А. Капиллярная эластовискозиметрия нуклеоидов эукариот // Биополимеры и клетка.— 1988.—4, № 4.— С. 203—211.
12. Блохин Д. Ю. Повреждение надмолекулярного комплекса ДНК в механизме действия противоопухолевых препаратов // Вопр. онкологии.— 1985.—31, № 11.— С. 60—66.
13. Блохин Д. Ю. Нуклеоиды опухолевых клеток: структурная организация, свойства и повреждение при химиотерапии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1986.— 23 с.
14. Володин Ю. Ю., Бергольц В. В., Блохин Д. Ю. Обработка данных седиментационного анализа с помощью автоматизированной системы на базе микро-ЭВМ // Хим.-фармац. журн.— 1988.—22, № 11.— С. 1381—1385.
15. Lammli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.
16. Andoh T., Ide T. A novel DNA-protein complex in cultured mouse fibroblasts, strain L-P3 // Exp. Cell Res.— 1972.—73, N 1.— P. 122—128.
17. Andoh T., Ide T. Disulfide bridges in proteins linking DNA in cultured mouse fibroblasts, strain L-P3 // Ibid.— 74, N 2.— P. 525—531.
18. Hartwig M. Organization of mammalian chromosomal DNA: supercoiled and folded circular DNA subunits from interphase cell nuclei // Acta biol. et med. ger.— 1978.— 37, N 2.— P. 421—432.
19. Pinon R., Salts Y. Isolation of folded chromosomes from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.—74, N 7.— P. 2850—2854.
20. Бреслер С. Е., Носкин Л. А., Сулов А. В. Изучение индукции и репарации двуни-тевых разрывов ДНК в клетках про- и эукариот. 1. Примененне эластовискозиметра Зинма для изучения индукции индукции двуни-тевых разрывов ДНК в γ -облученных клетках *Escherichia coli* // Молекуляр. биология.— 1980.—14, № 6.— С. 1289—1300.
21. Нечаевский Ю. В., Стражевская Н. Б. γ -Индукцированное повреждение суперспира-лей ДНК спермы выюна // Повреждение и репарация ДНК / Под ред. А. И. Газиева.— Пуццано, 1980.— С. 107—114.

22. *Supercoiled DNA folded by non-histone proteins in cultured mammalian cells* / T. Ide, M. Nakane, K. Anzai, T. Andoh // *Nature*.— 1975.—258.— P. 445—447.
23. Юхис П. П., Сирота Н. П., Газиев А. И. Исследование белков, связанных с ДНК, клеток асцитного рака Эрлиха // *Повреждение и репарация ДНК* / Под ред. А. И. Газиева.— Пушкино, 1980.— С. 190—202.
24. Блохин Д. Ю. Локализация белковых зон в полнакриламидном геле методом серебряного окрашивания // *Лаборатор. дело*.— 1988.— № 8.— С. 30—33.
25. Пимонов В. Д., Сигора Г. А., Радько С. И. Структурная гетерогенность препаратов хроматина на уровне топологии ДНК // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*.— 1987.— № 11.— С. 557—561.
26. Белки, особо прочно связанные с ДНК в участках ее прикрепления к матриксу интерфазного ядра / С. В. Разин, В. В. Чернохостов, А. В. Рудин и др. // *Докл. АН СССР*.— 1982.—263, № 4.— С. 1019—1021.
27. Збарский И. Б. Структурная организация и функциональная роль ядерного матрикса // *Структурно-функциональные аспекты репликации и репарации ДНК: Материалы Всесоюз. симпоз.*— Пушкино, 1983.— С. 3—21.
28. Lange C. S. The organization and repair of mammalian DNA // *FEBS Lett.*— 1974.—44, N 2.— P. 153—156.
29. Welsh R. S., Vyska K. Organization of highly purified calf thymus DNA // *Biochim. et biophys. acta*.— 1981.—655, N 3.— P. 291—306.
30. Алесенко А. В., Пантас Э. А. Различия в составе фосфолипидов ядра и хроматина в ходе пролиферации клеток печени крысы после частичной гепатэктомии // *Биохимия*.— 1983.—48, № 2.— С. 275—281.
31. Чернохостов В. В. Ядерный матрикс эукариотической клетки: некоторые вопросы выделения, структуры и функционирования // *Успехи соврем. биологии*.— 1985.—99, № 3.— С. 371—384.
32. Granules 25-30 nm diameter: basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold and nuclear envelope / P. Engelhardt, U. Plogens, I. B. Zbarsky, L. S. Filatova // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1982.—79, N 22.— P. 6937—6940.
33. Cook P. R., Brazell I. A. Spectrofluorometric measurements of the binding of ethidium to superhelical DNA // *Eur. J. Biochem.*— 1978.—84, N 2.— P. 465—477.

Всесоюз. онкол. науч. центр АМН СССР, Москва

Получено 14.06.88

A PROBLEM ON THE SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION OF EUKARYOTIC NUCLEOIDS

D. Yu. Blokhin, V. A. Struchkov

All-Union Cancer Research Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Properties of the nucleoids isolated from murine leukemia *L1210* cells were studied using capillary viscoelastometry and sedimentation methods. Thiols (2-mercaptoethanol, dithiothreitol), pronase P, RNase A, ethanol, sodium trichloroacetate, as well as heating to 60 °C and 95 °C have been studied for their effects on nucleoids. Nucleoid cage damage by thiols or pronase has been shown to cause decompactization of the complex without loss of superhelical conformation by DNA domains. Decompactization of the complex structure is also observed when isolated nucleoids are exposed to RNase A in the medium with low ionic strength; no decompactizing effect of RNase A on the nucleoid structure has been revealed in other variants of enzyme treatments.

Heating of the nucleoid preparations up to the «melting temperature» of the DNA double helix is shown to induce total relaxation of superhelical domains and degradation of the complex.