

В. Т. Соловьян, И. О. Андреев, В. А. Кунах

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК ЭУКАРИОТ В ПУЛЬСИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ.

1. ЯДЕРНАЯ ДНК КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Приведены результаты исследований по влиянию различных воздействий на распределение дискретных фрагментов ДНК, появляющихся при фракционировании препаратов интактных ядерных ДНК в инвертируемом электрическом поле.

Показано, что дискретное расщепление ядерной ДНК зависит от $DS-Na$ в Mg^{2+} -содержащем буфере и не зависит от него в Ca^{2+} -содержащей среде. Ингибиторы топоизомеразы II тенипозид (VM-26) и амсакрин (*m*-AMSA) усиливают упорядоченное расщепление ядерной ДНК, в то время как NaCl стимулирует лигирование расщепленной ДНК.

Предложенные данные позволяют рассматривать ДНК в клеточном ядре как составную часть ДНК-топоизомеразного комплекса, основное свойство которого состоит в способности осуществлять равновесную реакцию разрыва — воссоединения. Подобное представление открывает дополнительные возможности для исследования роли топоизомераз II типа в реализации структурных и функциональных характеристик эукариотического генома.

Введение. Основой выполнения многочисленных физиологических функций топоизомеразой II является ее способность осуществлять реакцию разрыва — воссоединения двуцепочечной ДНК. На модельных системах механизм этой реакции в достаточной степени изучен. Предполагается, что ковалентный расщепляемый комплекс ДНК — фермент служит ключевым интермедиатом в опосредованных топоизомеразой превращениях ДНК и находится в равновесии с нерасщепляемым комплексом [3, 4]. В отличие от других комплексов ДНК — белок, а также от нерасщепляемого ДНК-топоизомеразного комплекса обработка белок-денатурирующими агентами расщепляемого комплекса приводит к появлению двуцепочечных разрывов ДНК. Характерной особенностью этой реакции является то, что субъединицы фермента остаются ковалентно связанными с 5'-концами расщепленной ДНК [4, 5].

К настоящему времени известен ряд ингибиторов топоизомеразы II типа, эффект которых коррелирует с их возможностью стабилизировать расщепляемый ДНК-топоизомеразный комплекс [6—9]. Как установлено в опытах *in vitro*, эти ингибиторы увеличивают опосредованное топоизомеразой II расщепление ДНК, сдвигая равновесную реакцию разрыва — воссоединения в сторону разрыва ДНК [4, 9].

С другой стороны, понижение температуры реакции, а также добавление NaCl или ЭДТА к установившемуся *in vitro* равновесному ДНК-топоизомеразному комплексу сдвигает равновесие в сторону лигирования расщепленной ДНК [10—12].

В предыдущем сообщении нами показано, что набор дискретных фрагментов ДНК, выявляемый фракционированием препаратов лизированных ядер с помощью гель-электрофореза в инвертируемом электрическом поле, является результатом специфической $DS-Na$ -зависимой деградации ядерной ДНК [1]. Зависимый от тенипозидов характер распределения дискретных фрагментов, а также наличие блок-ассоциированных разрывов ДНК предполагают непосредственное участие ДНК-топоизомеразы II в упорядоченном расщеплении интактной ядерной ДНК [2].

Топоизомераза II является основным компонентом ядерного матрикса и остова хромосом [13—15]. Из этого следует, что ядерная ДНК может быть частью ДНК-топоизомеразного комплекса, свойства которого, по-видимому, сходны с таковыми, описанными для систем *in vitro*. В настоящей работе мы приводим данные, подтверждающие это предположение.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 5-дневные проростки кукурузы.

Препараты интактных ядер получали, как описано ранее [1, 2], в буфере, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (Mg-ядра) или 5 мМ $CaCl_2$ (Ca-ядра).

Для изучения функционирования ДНК-топоизомеразного комплекса в ядрах последние, заплавленные в агарозу, инкубировали в течение 10 мин при 30 °С в присутствии 10 мМ Mg^{2+} , 50 мкМ тенипозиды, 10 мМ ЭДТА, 250 мМ NaCl, приготовленных на TE-буфере (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА).

Препараты лизированных ядер фракционировали по методу [2], используя постоянный режим инверсии электрического поля (24 с «вперед» и 8 с «назад»).

ДНК из заплавленных в агарозу образцов ядер после фракционирования их импульсным гель-электрофорезом выделяли, инкубируя расплавленные образцы при 55 °С в присутствии 1 %-го DS-Na и 200 мкг/мл портеиназы K с последующим анализом их с помощью обычного гель-электрофореза.

Результаты и обсуждение. Как уже упоминалось, обработка комплекса топоизомеразы II — ДНК белок-денатурирующими агентами (DS-Na) является непременным условием выявления двуцепочечных разрывов ДНК, катализируемых топоизомеразой [3—5].

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что появление дискретных фрагментов ДНК из препаратов интактных ядер DS-Na-зависимо. Инкубация ядер в присутствии ингибитора топоизомеразы II тенипозиды приводит к усилению DS-Na-опосредуемого расщепления ядерной ДНК, что проявляется в гидролизе крупных фрагментов размером ~ 300 тыс. п. о. на мелкие и в уменьшении количества ДНК, оставшейся на старте (рис. 2).

Исходя из того факта, что при фракционировании препаратов лизированных ядер лишь часть ядерной ДНК перераспределяется в гель, можно предположить, что ДНК, оставшаяся на старте, представляет собой нерасщепленную ядерную ДНК, присутствие которой отражает существующее равновесие между реакцией разрыва — воссоединения, катализируемой топоизомеразой II. Действительно, инкубация препаратов ядерной ДНК в условиях, предотвращающих лигирование, приводит к практически полному переходу ядерной ДНК в гель при первом цикле фракционирования (рис. 3).

Из данных рис. 4 следует, что добавление NaCl к ядрам, инкубируемым в присутствии ионов Mg^{2+} , вызывает лигирование расщепленной ДНК. Это проявляется в восстановлении крупных фрагментов ДНК размером ~ 300 тыс. п. о. и в увеличении количества ДНК, оставшейся на старте.

Сходный эффект наблюдается и при инкубации Mg-ядер в присутствии ЭДТА (рис. 5).

Представленные данные показывают, что ДНК в клеточном ядре является составной частью ДНК-топоизомеразного комплекса, способного осуществлять реакции разрыва — воссоединения.

Недавно предложен метод, позволяющий разъединить равновесную реакцию расщепления — воссоединения ДНК, катализируемую топоизомеразой II. Такой подход основывался на наблюдении, что обработка ДНК-топоизомеразного комплекса в Ca^{2+} -содержащей среде ЭДТА приводит не к лигированию расщепленной ДНК, а к стабилизации комплекса в расщепленном состоянии подобно тому, как это происходит с комплексом в системе Mg^{2+} —Ds-Na [10]. Подобный комплекс оставался кинетически компетентным и при последующем добавлении ионов Mg^{2+} был способен к лигированию расщепленной ДНК [10].

Мы воспользовались этим приемом для изучения распределения дискретных фрагментов ДНК, появляющихся при фракционировании препаратов интактных Ca-ядер (ядер, полученных в присутствии ионов

Ca²⁺). Как следует из рис. 6, в Ca-ядрах наряду с DS-Na-зависимым происходит и независимое от DS-Na расщепление ядерной ДНК. Инкубация Ca-ядер в присутствии ЭДТА стимулирует независимое от DS-Na расщепление крупных фрагментов на мелкие (рис. 6, б, дорожка 1), а в условиях, способствующих лигированию, мелкие DS-Na-независи-

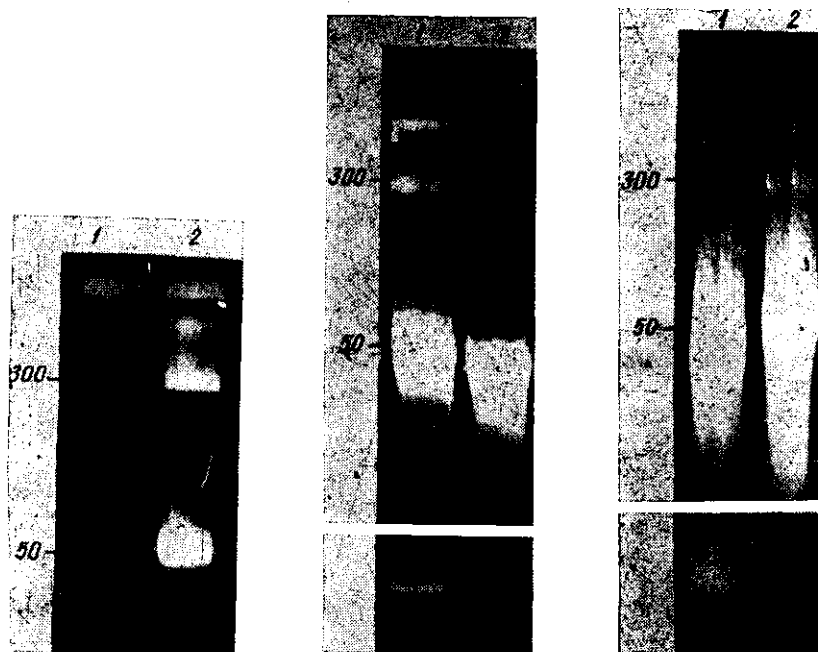


Рис. 1. Зависимое от DS-Na дискретное расщепление ядерной ДНК. Препараты заплывленные в агарозу ядер (1) обрабатывали DS-Na (2) и фракционировали в инвертируемом электрическом поле (здесь и на рис. 2—7 цифры слева — размеры фрагментов в тыс. п. о.)

Рис. 2. Влияние тенипозиды на набор дискретных фрагментов ДНК. Ядра проростков кукурузы, полученные в Mg²⁺-содержащем буфере, инкубировали в отсутствие (1) или в присутствии тенипозиды (2), заплывляли в агарозу, лизировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле. Здесь и на рис. 3, 4: верхняя и нижняя панели — ДНК, полученная из ядер и оставшаяся на старте соответственно

Рис. 3. Опосредуемое топоизомеразой II расщепление ядерной ДНК. Данные свидетельствуют в пользу осуществления реакции разрыва — воссоединения. Ядра проростков кукурузы, выделенные в Mg²⁺-содержащем буфере, инкубировали в отсутствие (1) или в присутствии (2) 10 мкМ амсакрина. Ядра заплывляли в агарозу, обрабатывали 1 %-м саркозилатом Na без (1) или с добавлением (2) протеиназы K

мые фрагменты превращаются в более крупную ДНК или вовсе не входят в гель (рис. 6, г, дорожка 1). Наконец, финальная обработка ЭДТА вновь стимулирует DS-Na-независимое расщепление ядерной ДНК (рис. 6, д, дорожка 1).

Представленные данные показывают, что поведение DS-Na-независимого продукта расщепления ядерной ДНК напоминает поведение ДНК-топоизомеразного комплекса в системе *in vitro* [10].

Поведение DS-Na-зависимого продукта расщепления отличается от такового, независимого от DS-Na. Из рис. 6 следует, что в Ca-ядрах первый представлен фрагментами ДНК размером 50 тыс. п. о., ясно указывая на способность крупных (300 тыс. п. о.) DS-Na-независимых ДНК-фрагментов распадаться до мелких (50 тыс. п. о.) в присутствии DS-Na (рис. 6, а). Обработка Ca-ядер ЭДТА приводит к появлению крупных фрагментов (рис. 6, б) и к увеличению доли ДНК, оставшейся на старте (рис. 7), свидетельствуя об ингибировании ЭДТА DS-Na-зависимого расщепления ядерной ДНК. Дальнейшая инкубация Ca-ядер в присутствии ионов Mg²⁺ способствует расщеплению крупных фрагментов ДНК на мелкие (рис. 6, в), а добавление NaCl предотвращает этот процесс (рис. 6, г).

Повторное фракционирование образцов Са- и СаЭ-ядер, оставшихся на старте после первого фракционирования, снова приводит к DS-Na-независимому появлению набора фрагментов ДНК, однако только из тех образцов, которые прежде были им обработаны (см. рис. 7). При этом количество ДНК из СаЭ-образцов значительно превышает тако-

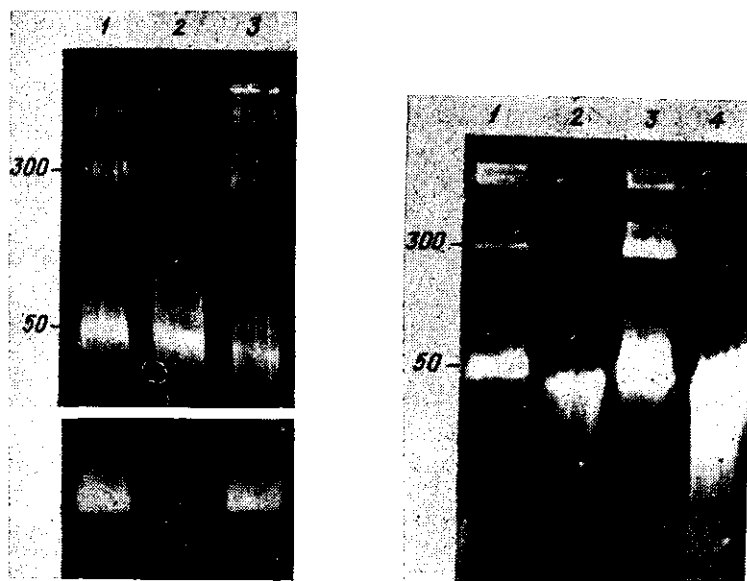


Рис. 4. Опосредуемое топоизомеразой II лигирование расщепленной ядерной ДНК. Заплавленные в агарозу ядра, полученные в Mg^{2+} -содержащем буфере, инкубировали в присутствии 10 мМ Mg^{2+} на холоду (1) и при 30 °С (2, 3). После инкубации ядра обрабатывали 250 мМ NaCl (3), лигировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

Рис. 5. Влияние ЭДТА на распределение дискретных фрагментов ДНК. Ядра из проростков кукурузы, выделенные в присутствии 5 мМ ЭДТА (1) или 5 мМ $MgCl_2$ (4) инкубировали соответственно с добавлением 20 мМ $MgCl_2$ (Mg-ядра, 2) или 20 мМ ЭДТА (MgЭ-ядра, 3). Ядра заплывали в агарозу, лигировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

вое из Са-ядер (см. рис. 7), подтверждая способность ЭДТА уменьшать DS-Na-зависимое расщепление ДНК в интактных ядрах.

Приведенные данные показывают, что ионы Ca^{2+} стимулируют дискретное расщепление ядерной ДНК, приводя к DS-Na-независимому появлению ДНК-фрагментов. Остаются неясными, однако, резкие отличия в свойствах зависимых от DS-Na и независимых от него продуктов расщепления: первые не распадаются на мелкие фрагменты ДНК в присутствии ЭДТА, но способны к этому в случае добавления ионов Mg^{2+} , в то время как последние могут распадаться до мелких под действием ЭДТА, но последующее добавление ионов Mg^{2+} стимулирует лигирование расщепленной ДНК.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что организация ДНК в клеточном ядре может быть описана в терминах функционирующего ДНК-топоизомеразного комплекса.

Представляется вероятным, что в клеточном ядре ДНК-топоизомеразный комплекс может находиться как в расщепленном, так и в нерасщепленном состоянии. Обработка расщепляемого комплекса белокденатурирующими агентами приводит к появлению расщепленного продукта, перераспределяющегося в гель в виде дискретных фрагментов ДНК. Нерасщепляемый комплекс не способен образовывать DS-Na-зависимые разрывы, и часть ядерной ДНК, оставаясь нерасщепленной, не входит в гель. Ингибиторы топоизомеразы II, вероятно, сдвигают установившееся равновесие в сторону расщепляемого комплекса, увеличивая количество расщепленного продукта, в то время как NaCl сти-

мулирует обратную реакцию, способствуя возрастанию доли нерасщепленной ДНК.

Возможно, что ДНК-топоизомеразный комплекс в ядрах, функционирующий подобно таковому в системе *in vitro*, реально существует в клетках, а не является искусственным образованием, полученным в результате приготовления образцов ядер. Недавно Филипски и соавт. [16] показали, что набор фрагментов ДНК, полученный из заплавлен-

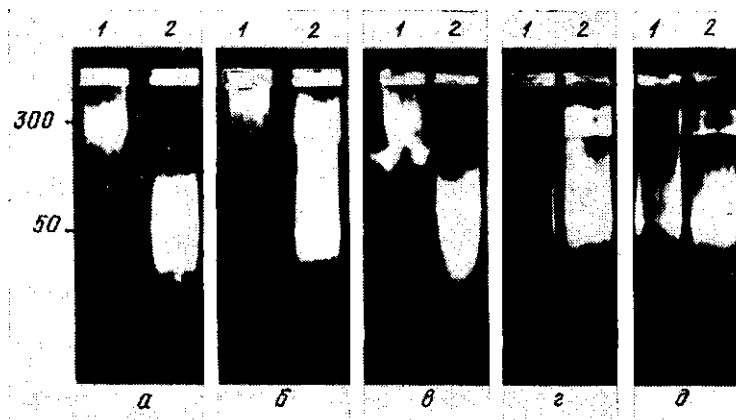


Рис. 6. Влияние ЭДТА на распределение дискретных фрагментов ДНК в Ca^{2+} -содержащей среде: а — ядра, выделенные в присутствии 5 мМ Ca^{2+} (Са-ядра), заплывали в агарозу и фракционировали в инвертируемом электрическом поле; б — Са-ядра обрабатывали 10 мМ ЭДТА перед фракционированием (СаЭ-ядра); в — СаЭ-ядра инкубировали в присутствии 20 мМ Mg^{2+} перед фракционированием (СаЭ-Мг-ядра); г — СаЭ-ядра инкубировали в присутствии 250 мМ NaCl с последующей инкубацией в 20 мМ Mg^{2+} (СаЭ-Мг-На-ядра); д — СаЭ-Мг-На-ядра инкубировали в присутствии 20 мМ ЭДТА перед фракционированием. Инкубацию ядер на каждом этапе проводили в течение 20 мин при 20 °С; 1 и 2 — соответственно необработанные и обработанные DS-На ядра непосредственно перед фракционированием

ных в агарозу образцов клеток, существенно зависит от тенипозиды. Наши опыты, проведенные на культивируемых клетках млекопитающих, также подтвердили влияние тенипозиды на характер распределения дискретных фрагментов ДНК (результаты не представлены).

Несмотря на сходство в поведении ДНК-топоизомеразного комплекса в ядрах и в условиях *in vitro*, все же существуют некоторые отличия.

Как было упомянуто ранее, добавление ЭДТА к комплексу в системе *in vitro* приводит к лигированию расщепленной ДНК и диссоциации ДНК-топоизомеразного комплекса [10—12]. Это, однако, справедливо для комплексов, функционирующих в Mg^{2+} -содержащей реакционной среде.

В присутствии ионов Ca^{2+} добавление ЭДТА вызывает не лигирование, а стабилизацию ДНК-топоизомеразного комплекса в расщепленном состоянии [12].

В нашем случае вследствие обработки ДНК-топоизомеразного комплекса ЭДТА фрагменты ДНК не исчезают при последующем фракционировании препаратов лизированных ядер, а лишь уменьшается количество расщепленной ДНК, что проявляется в увеличении доли крупных фрагментов, входящих в гель, и в возрастании количества ДНК, оставшейся на старте. Это относится к комплексам, формирующим DS-На-зависимые разрывы ДНК в Са-ядрах (см. рис. 6). Обработка же ЭДТА комплексов, способных к DS-На-независимым разрывам ДНК, приводит к дальнейшему расщеплению ядерной ДНК (см. рис. 6). То же происходит в результате инкубации в присутствии ионов Mg^{2+} «СаЭ-комплексов», производящих DS-На-зависимые разрывы ДНК (см. рис. 6).

Эти данные показывают, что влияние ЭДТА на Са-ядра неоднозначно: с одной стороны, он ингибирует DS-Na-зависимое, с другой — стимулирует DS-Na-независимое расщепление ядерной ДНК.

Вторая особенность функционирования ДНК-топоизомеразного комплекса в ядрах связана с его способностью DS-Na-независимо расщеплять ядерную ДНК.

Вполне вероятно, что высвобождение фрагментов ДНК из Са- и СаЭ-ядер в отсутствие DS-Na действительно обусловлено независимым от DS-Na расщеплением ядерной ДНК, а не связано с самопроизвольным разрушением части интактных ядер. На это указывает отсутствие ДНК-фрагментов при фракционировании интактных Mg-ядер (см. рис. 1), а также Э-ядер (рис. 1, 1), несмотря на то, что обработка ядер ЭДТА может привести к их разрушению. Появление DS-Na-независимого продукта расщепления в Са-ядрах не является столь уж неожиданным. По-видимому, оно обусловлено тем, что ионы

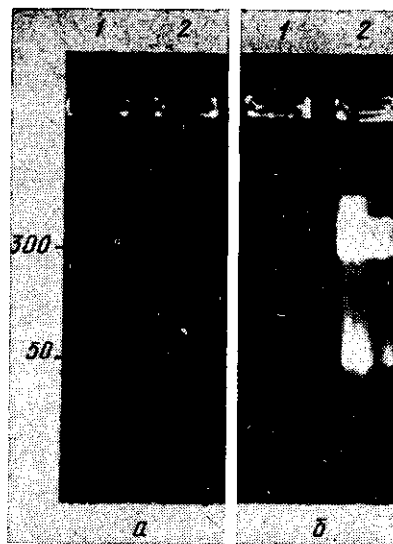


Рис. 7. Распределение фрагментов ДНК при повторном фракционировании образцов Са-ядер. Оставшиеся на старте образцы Са (а) и СаЭ (б) ядер после первого фракционирования (см. рис. 6, а, б) инкубировали в присутствии ионов Mg^{2+} с последующим фракционированием в инвертируемом электрическом поле в отсутствие Ds-Na. Обозначения см. на рис. 6, а, б

Ca^{2+} , как и в системе *in vitro*, стабилизируют ДНК-топоизомеразный комплекс в расщепленном состоянии, когда ДНК, как полагают, разорвана [12]. Обработка такого комплекса ЭДТА, очевидно, усиливает этот процесс, приводя к расщеплению крупных фрагментов ДНК на мелкие (см. рис. 6). Однако, как следует из наших данных, доля DS-Na-независимого расщепления ядерной ДНК незначительна по сравнению с DS-Na-зависимым (см. рис. 6). Вероятно, только часть ДНК-топоизомеразных комплексов, функционирующих в ядрах, способна индуцировать DS-Na-независимое появление фрагментов ДНК. Гораздо более неожиданным свойством ДНК-топоизомеразного комплекса в Са-ядрах, связанным с DS-Na-независимым расщеплением ДНК, является приобретенная им способность DS-Na-независимо фрагментировать ядерную ДНК после того, как комплекс обработан DS-Na. Так, обработка СаЭ-ядер этим агентом приводит к гораздо более интенсивному DS-Na-независимому расщеплению ядерной ДНК при повторном цикле инкубации/фракционирования (см. рис. 7). Создается впечатление, что DS-Na «замораживает» ДНК-топоизомеразный комплекс, который остается кинетически компетентным и способен к дальнейшей DS-Na-независимой фрагментации ядерной ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} .

Из приведенного выше следует, что фракционирование препаратов «интактных ядерных ДНК» вызывает появление двух основных типов дискретных фрагментов ДНК размером ~ 50 и 300 тыс. п. о. В свою очередь, последние способны дискретно расщепляться до фрагментов размером 50 тыс. п. о. в присутствии ионов Mg^{2+} и тенипозиды (см. рис. 2, 4). После обработки ядер NaCl крупные ДНК-фрагменты восстанавливаются (см. рис. 5), а ЭДТА, вероятно, предотвращает Mg^{2+} -зависимую конверсию крупных фрагментов в мелкие (см. рис. 4, 6). Последнее обстоятельство указывает на двойственную природу крупных фрагментов ДНК размером ~ 300 тыс. п. о.: будучи продуктом расщепления ядерной ДНК, они в дополнение к этому представ-

ляют собой интермедиаты, которые либо способны, либо не способны превращаться в мелкие фрагменты размером 50 тыс. п. о. Иными словами, фрагменты размером ~ 300 тыс. п. о. могут быть либо расщепляемым, либо нерасщепляемым ДНК-топоизомеразным комплексом по отношению к расщепленному продукту размером 50 тыс. п. о.

С такой точки зрения становится понятным распределение дискретных фрагментов ДНК в Са-ядрах. Так, продукт DS-Na-независимого расщепления ядерной ДНК размером ~ 300 тыс. п. о. является, очевидно, расщепляемым комплексом, который в присутствии DS-Na распадается на мелкие фрагменты ДНК размером 50 тыс. п. о. (см. рис. 6, а).

Обработка Са-ядер ЭДТА, вероятно, превращает крупные фрагменты в нерасщепляемые интермедиаты, стабильные при воздействии DS-Na (см. рис. 6, б). Дальнейшая инкубация СаЭ-ядер в среде с ионами Mg^{2+} , возможно, делает нерасщепляемые интермедиаты расщепляемыми, которые в присутствии DS-Na распадаются на мелкие фрагменты ДНК (см. рис. 6, в), а добавление NaCl предотвращает этот процесс (см. 6, г).

Тем не менее, остается неясным противоположный эффект Mg^{2+} и ЭДТА на DS-Na-зависимое и DS-Na-независимое расщепление ДНК в Са-ядрах. Возможно, это связано с наличием в ядрах различных вариантов ДНК-топоизомеразных комплексов, по-разному осуществляющих реакции разрыва — воссоединения.

Суммируя изложенное, можно заключить, что ДНК в клеточном ядре организована в виде ДНК-топоизомеразного комплекса, основные закономерности функционирования которого сходны с таковыми, описанными для модельных систем. Это открывает дополнительные возможности для исследования роли топоизомеразы II в реализации структурных и функциональных характеристик эукариотического генома.

Резюме. Викладено результати досліджень з впливу різних чинників на розподіл дискретних фрагментів ДНК, які з'являються при фракціонуванні препаратів інтактних ядерних ДНК в інвертованому електричному полі.

Показано, що дискретне розщеплення ядерної ДНК залежить від DS-Na у буфері з вмістом Mg^{2+} і не залежить від нього у середовищі з Ca^{2+} . Інгібітори топоізомераз II теніпозид (VM-26) та аmsакрин (m-AMSA) посилюють впорядковане розщеплення ядерної ДНК, тоді як NaCl стимулює лігування розщепленої ДНК.

Отримані дані дозволяють розглядати ДНК у клітинному ядрі як складову частину ДНК-топоізомеразного комплексу, головна властивість якого полягає у здатності здійснювати рівноважну реакцію розривання — з'єднання. Таке уявлення відкриває додаткові можливості для дослідження ролі топоізомераз II типу в реалізації структурованих та функціональних характеристик еукариотичного геному.

Summary. We investigated the pattern variation of discrete DNA fragments resulted from fractionation of nuclear DNA preparations by field inversion gel electrophoresis in response to different influences. The discrete cleavage of nuclear DNA has been shown to be SDS-dependent in Mg^{++} -containing medium and SDS-independent in Ca^{++} -containing one. Topoisomerase II specific poisons teniposide (VM-26) and amsacrine (m-AMSA) have been shown to increase the SDS-dependent nuclear DNA cleavage while NaCl promotes to rejoining of cleaved DNA.

The data presented allow to consider the nuclear DNA organization as constituent component of topoisomerase II/DNA complex the main property of which is its ability to mediate the cleavage/rejoining equilibrium reactions. The involvement of nuclear DNA in functioning topoII/DNA complex offers the possibility to investigate the role of topoII enzyme in structural organization and functioning of eukaryotic genome.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьян В. Т., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. Обнаружение и свойства дискретных фрагментов ДНК // Молекуляр. биология. — 1991. — 25, № 4. — С. 1071—1079.

2. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. II. Дискретные фрагменты ДНК и уровни структурной организации хроматина // Там же.— № 6.— С. 43—51.
3. Nelson F. M., Tewey K. M., Liu L. F. Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-*n*-anisidide // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81.— P. 1361—1365.
4. Liu L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs // Annu. Rev. Biochem.— 1989.— 58.— P. 351—375.
5. Italligan B. D., Edwards K. A., Liu L. F. Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus // J. Biol. Chem.— 1985.— 260.— P. 2475—2482.
6. Zwelling L. A. DNA topoisomerase II as a target of anticoplastic drug therapy // Cancer Metastasis Rev.— 1985.— 4.— P. 263—276.
7. Glisson B. S., Ross W. E. DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy // Pharm. Ther.— 1987.— 32.— P. 89—106.
8. Ross W. E. DNA topoisomerases as target for cancer therapy // Biochem. Pharm.— 1984.— 34.— P. 4191—4195.
9. Osheroff N. Effect of anticoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide // Biochemistry.— 1989.— 28.— P. 6157—6160.
10. Sander M., Hsieh T.-S. Double-strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster* // J. Biol. Chem.— 1983.— 258.— P. 8421—8428.
11. Liu L. F., Rowe T. C., Yang L. et al. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II // Ibid.— P. 15365—15370.
12. Osheroff N., Zechiedrich E. L. Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form // Biochemistry.— 1987.— 26.— P. 4303—4309.
13. Earnshaw W. C., Heck M. M. S. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes // J. Cell. Biol.— 1985.— 190.— P. 1716—1725.
14. Gasser S. M., Laemmli U. K. The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site // EMBO J.— 1986.— 5.— P. 511—518.
15. Berrios M., Osheroff N., Fisher P. A. *In situ* localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of *Drosophila* nuclear matrix fraction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82.— P. 4142—4146.
16. Filipitsky J., Leblanc J., Youdale T. et al. Periodicity of DNA folding and higher order chromatin structures // EMBO J.— 1990.— 9.— P. 1319—1327.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев

Получено 11.12.92

УДК 577.161.2

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА Са И РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ СОЕДИНЕНИЙ D-ВИТАМИННОЙ ПРИРОДЫ НА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ КОЛЛАГЕНОВ I ТИПА КОЖИ ЦЫПЛЯТ

В опытах на цыплятах изучено влияние избытка Са и различных доз соединений D-витаминовой природы на изоэлектрические спектры коллагенов I типа кожи.

Установлены значения рI коллагенов I типа кожи цыплят и показано, что при рахите коллагеновая спираль имеет более сильный положительный заряд, чем в случае нормального белка. Избыток Са в рационе не оказывал заметного воздействия на рI молекул коллагенов I типа кожи. Влияние производных витамина D₃, хотя и было аналогичным по характеру его действия, но отличалось степенью выраженности.

Введение. Одним из основных путей обеспечения животного организма витамином D является его фотобиогенез в коже под влиянием ультрафиолетовых лучей. Регуляторами этого процесса выступают концентрация Са и метаболитов витамина D₃ в плазме крови, интенсивность УФ-облучения, пигментированность кожных покровов [1].

Нельзя исключить также вклада в регуляторный процесс коллагеновых структур, служащих ориентиром для клеток кожи и своеобразным «триггерным механизмом», возможно, непосредственно влияющим на обменные процессы, в том числе обмен Са и витамина D₃ в

© Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, 1993