

2. *Drabkin D.* The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species // *Ibid.*—1946.—164.— P. 703—706.
3. *Davis B.* Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Annu. N. Y. Acad. Sci.*—1964.—121, N 11.— P. 404—406.
4. *Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н.* Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // *Лаб. дело.*—1985.— № 12.— С. 712—714.
5. *Шорохов Ю. А.* Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатураторов // *Физиол. журн.*—1974.—9, № 4.— С. 654—657.
6. *Benesch R. E., Benesch R., Yung S.* Egnations for the spectrophotometric analysis for haemoglobin mixtures // *Anal. Biochem.*—1973.—55, N 3.— P. 245—248
7. *Аксенов С. И.* Исследование динамической структуры глобулярных белков импульсными методами ядерного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*—1983.—17, № 3.— С. 475—483.
8. *Вацман А. А., Пронин И. С.* Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия.— М.: Энергоатомиздат, 1986.—232 с.
9. *Иванников А. И., Абрамов В. М., Волков В. П., Завьялов В. П.* Сравнительное исследование динамических конформационных свойств миеломных иммуноглобулинов G человека разных подклассов импульсным методом ЯМР // *Молекуляр. биология.*—1983.—17, № 4.— С. 734—740.
10. *Федотов В. Д.* Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // Там же.— № 3.— С. 493—504.

Симферопольский гос. ун-т

Получено 09.10.92

УДК 575.113/577.21

В. Т. Соловьян, И. О. Андреев

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК ЭУКАРИОТ В ПУЛЬСИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ. ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА В ПРЕПАРАТАХ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР

*Изучены свойства ДНК-топоизомеразного комплекса в препаратах изолированных ядер. Показано, что комплекс ядерная ДНК—топоизомераза II функционирует одинаково как в Mg^{2+} , так и в Ca^{2+} -содержащей среде. В отличие от комплекса в условиях *in vivo*, ядерный ДНК-топоизомеразный комплекс, обработанный ЭДТА, способствует не лигированию, а возрастанию расщепления ядерной ДНК. Зависимое от ЭДТА усиленное расщепление ДНК наблюдается в случае, если ядра, инкубируемые в $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ -содержащей среде, были обработаны ЭДТА или при инкубации $MgЭ(CaЭ)$ -ядер в присутствии ионов Mg^{2+} . Показано, что ядерный комплекс, обработанный $DS-Na$, приобретает свойство $DS-Na$ -независимо расщеплять ядерную ДНК.*

*Особенности поведения комплекса топоизомераза II — ядерная ДНК могут быть связаны с участием фермента в поддержании высших уровней структурной организации хроматина, что приводит к модификации комплекса в условиях *in vivo*. Высказано предположение о наличии в клетках различных вариантов ДНК-топоизомеразного комплекса, имеющих физиологическое значение.*

Введение. В предыдущем сообщении [1] мы привели данные, показывающие, что ДНК в клеточном ядре является составной частью ДНК-топоизомеразного комплекса. Свойства его сходны с таковыми модельного комплекса, описанными для системы *in vitro*, главное из которых заключается в способности внутриядерной топоизомеразы II осуществлять равновесную реакцию разрыва — воссоединения ядерной ДНК [1].

В настоящей работе мы приводим данные, касающиеся особенностей функционирования ядерного ДНК-топоизомеразного комплекса.

Материалы и методы. Препараты интактных ядер 5-дневных проростков кукурузы получали, как описано ранее [3], в буфере для выделения, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (Mg -ядра) или 5 мМ $CaCl_2$ (Ca -

© В. Т. Соловьян, И. О. Андреев, 1993

ядра). Непосредственно перед заплыванием в агарозу к суспензии ядер добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ (соответственно MgЭ- и CaЭ-ядра).

Равновесное состояние между «расщепляемым» и «нерасщепляемым» ДНК-топоизомеразным комплексом получали, инкубируя заплывленные в агарозу ядра в течение 20 мин при 30 °С в инкубационном буфере (20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ NaCl), содержащем 10 мМ Mg²⁺ или 10 мМ ЭДТА. В некоторых случаях в инкубационный буфер добавляли NaCl и тенипозид (VM-26) до конечных концентраций 250 мМ и 50 мкМ соответственно.

После инкубации ядра обрабатывали 1 %-м DS-Na и фракционировали, как описано ранее [2].

ДНК из заплывленных в агарозу образцов ядер после фракционирования их импульсным гель-электрофорезом выделяли, инкубируя

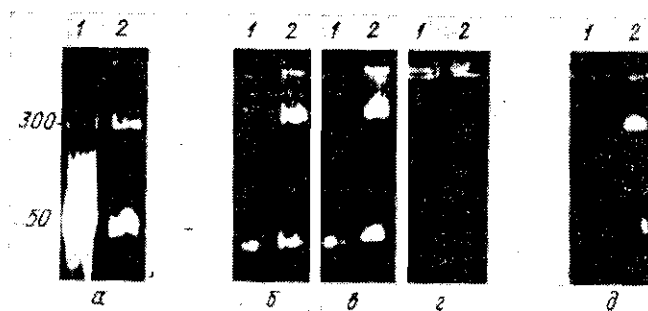


Рис. 1. Влияние ЭДТА на распределение дискретных фрагментов ДНК (предотвращение расщепления ядерной ДНК): а — ядра, выделенные в присутствии ионов Mg²⁺, инкубировали в течение 20 мин при 30 °С с 10 мМ Mg²⁺ (1) или 10 мМ ЭДТА (2), лизировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле; б — препараты, оставшиеся на старте, инкубировали 20 мин при 30 °С с 10 мМ Mg²⁺, обрабатывали 1 %-м DS-Na и фракционировали в инвертируемом поле; в — те же препараты, не обработанные DS-Na перед вторым фракционированием; г — препараты незлизованных ядер, подвергшиеся второму циклу инкубации — фракционирования в отсутствие DS-Na; д — ДНК, полученная из оставшихся на старте образцов (в) после второго цикла инкубации — фракционирования (здесь и на рис. 2—6 цифры слева — размеры фрагментов в тыс. п. о.)

расплавленные образцы при 55 °С в присутствии 1 %-го DS-Na и 200 мкг/мл протеиназы К с последующим анализом их с помощью обычного гель-электрофореза.

Результаты и обсуждение. В предыдущем сообщении мы показали, что равновесие между реакциями разрыва — воссоединения ядерной ДНК может быть смещено в сторону разрыва при инкубации заплывленных в агарозу ядер в присутствии ингибитора топоизомеразы II тенипозида. С другой стороны, инкубация ядер в среде с NaCl смещает установившееся равновесие в сторону лигирования ядерной ДНК [1].

Подобно NaCl, инкубация ядер с ЭДТА также приводит к уменьшению дискретного расщепления ядерной ДНК [1]. Однако влияние ЭДТА на ядерный ДНК-топоизомеразный комплекс гораздо более сложно.

Как было показано ранее, инкубация Mg-ядер как в присутствии ионов Mg²⁺, так и ЭДТА, в отличие от Ca-ядер, не вызывает выхода в гель фрагментов ДНК до тех пор, пока ядра не обработаны лизирующими агентами [1, 2]. Обработка ядер DS-Na приводит к переходу в гель типичного набора фрагментов ДНК [1, 2]. При этом инкубация ядер в присутствии ЭДТА изменяет качественный и количественный состав фрагментов ДНК, увеличивая долю крупных фрагментов и уменьшая количество ДНК, входящее в гель (рис. 1, а).

Повторное фракционирование оставшихся на старте образцов после реинкубации их в присутствии ионов Mg²⁺ снова приводит к распределению в гель ДНК-фрагментов, причем лизирующие агенты уже

не являются необходимым условием для их появления (рис. 1, в). При этом общее количество ДНК, полученное из MgЭ-ядер при повторном фракционировании, значительно превышает таковое из Mg-ядер даже после двух циклов инкубации — фракционирования (рис. 1). Представленные данные показывают, что ЭДТА подавляет дискретное расщепление ядерной ДНК. Это проявляется как в сохранении крупных ДНК-фрагментов, так и в уменьшении количества ДНК, переходящей в гель.

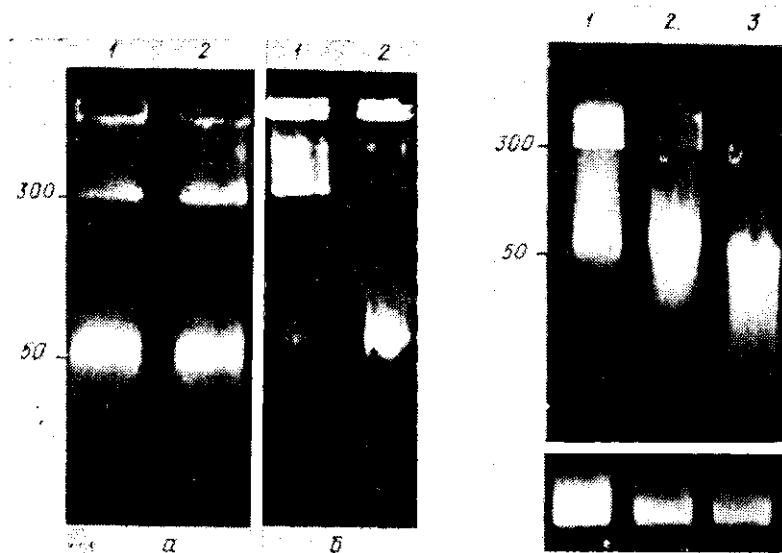


Рис. 2. Влияние тенипозида (VM-26) на распределение дискретных фрагментов ДНК в MgЭ-ядрах: а — ядра, полученные в присутствии ионов Mg^{2+} , обрабатывали ЭДТА, инкубировали в течение 20 мин при $30^{\circ}C$ с 10 мМ ЭДТА без (1) и с тенипозидом (2), лизировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле; б — образцы, оставшиеся на старте, инкубировали 20 мин при $30^{\circ}C$ с 10 мМ Mg^{2+} и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

Рис. 3. Влияние ЭДТА на распределение дискретных фрагментов ДНК (увеличение расщепления ядерной ДНК). Ядра, выделенные в присутствии ионов Mg^{2+} инкубировали в буфере, содержащем 10 мМ Mg^{2+} , на холоду (1) и при $30^{\circ}C$ (2, 3). После инкубации ядра обрабатывали 20 мМ ЭДТА (3), лизировали и фракционировали, как описано в тексте. Здесь и на рис. 4—6 верхняя и нижняя панели — ДНК, полученная из ядер и оставшаяся на старте соответственно

Появление набора ДНК-фрагментов при повторном фракционировании в отсутствие белок-денатурирующих агентов свидетельствует о том, что сохранение на старте ДНК не является следствием неполного лизиса ядер, а вновь появляющиеся фрагменты представляют собой результат повторного расщепления оставшейся на старте ДНК. Интересной особенностью этого расщепления является то, что из MgЭ-образцов выделяются преимущественно крупные фрагменты ДНК, несмотря на отсутствие ЭДТА при повторном цикле инкубации — фракционирования. Это справедливо также и для образцов CaЭ-ядер, которые продуцируют крупные фрагменты ДНК при повторном цикле инкубации — фракционирования в отсутствие ЭДТА [1]. Обработка MgЭ-ядер тенипозидом не устраняет эффекта ЭДТА, однако влияет на распределение дискретных фрагментов ДНК при повторном фракционировании оставшихся на старте образцов, приводя к распаду крупных фрагментов на мелкие (рис. 2).

Представленные данные показывают, что обработка Mg-ядер ЭДТА уменьшает не только дискретное расщепление ДНК в ядрах, но и в оставшихся на старте образцах даже при инкубации их в отсутствие ЭДТА. Крупные фрагменты, являющиеся мажорным типом фрагментов при повторном фракционировании MgЭ-образцов, способны,

тем не менее, распадаться до мелких при условии, если интактные ядра прежде были обработаны ингибиторами топоизомеразы II.

Уменьшения дискретного расщепления ядерной ДНК, опосредуемого ЭДТА, не наблюдается, если ядра были обработаны ЭДТА после инкубации их в присутствии ионов Mg^{2+} . Наоборот, в этих условиях ЭДТА стимулирует фрагментацию ядерной ДНК (рис. 3).

По сравнению с Mg -ядрами в $Mg\Delta$ -ядрах зависимое от ЭДТА усиление фрагментации ядерной ДНК гораздо более выражено (рис. 4). Оно наблюдается при инкубации $Mg\Delta$ -ядер в присутст-

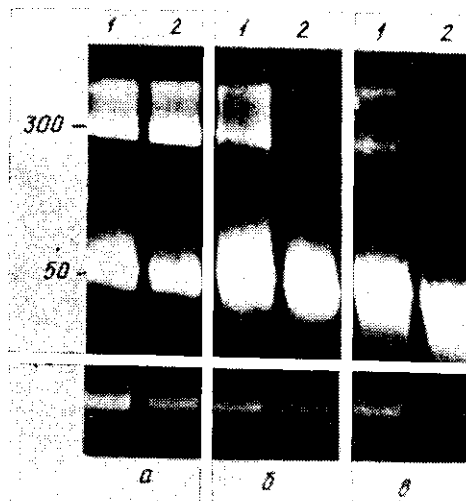


Рис. 4. Зависимое от ЭДТА усиление расщепления ДНК в Mg - и $Mg\Delta$ -ядрах. Ядра выделяли в присутствии 5 мМ Mg^{2+} (1) и обрабатывали 5 мМ ЭДТА (2). Образцы инкубировали на холоду (а) с 10 мМ Mg^{2+} (1) или 10 мМ ЭДТА (2); а также при 30°C (б, в) с 10 мМ Mg^{2+} . После инкубации ядра обрабатывали 20 мМ ЭДТА (в), лизировали и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

вни ионов Mg^{2+} (рис. 4, б) и наиболее отчетливо проявляется в тех же ядрах при повторной обработке их ЭДТА вслед за инкубацией в Mg^{2+} -содержащем буфере (рис. 4, в).

Из данных, представленных на рис. 5, следует, что определяемое ЭДТА увеличение деградации ДНК сопровождается утратой способ-

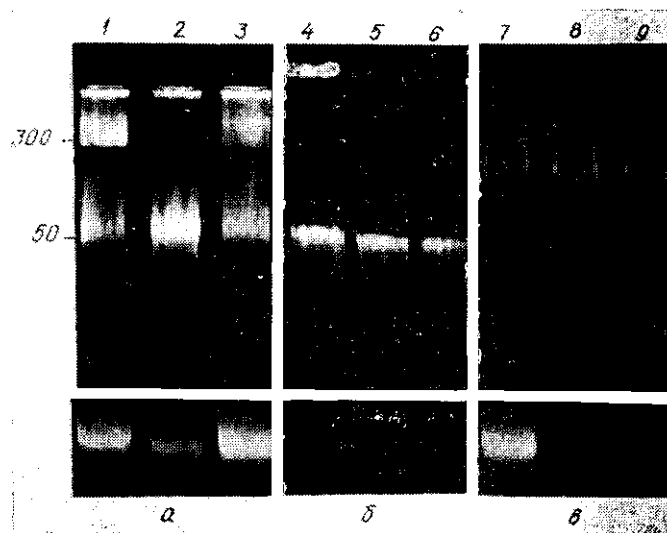


Рис. 5. Влияние $NaCl$ на распределение дискретных фрагментов ДНК в Mg - (а, б) и $Mg\Delta$ - (в) ядрах. Условия инкубации (длительность каждого этапа 10 мин): 1, 7—0°C, 10 мМ $MgCl_2$; 2, 8—30°C, 10 мМ $MgCl_2$; 3, 9—то же, что 2+250 мМ $NaCl$; 4—30°C, 10 мМ $MgCl_2$ +10 мМ ЭДТА; 5—то же, что 4+250 мМ $NaCl$; 6—то же, что 5+20 мМ $MgCl_2$. После инкубации образцы ядер обрабатывали 1%-м $DS-Na$ и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

ности ДНК-топоизомеразного комплекса осуществлять лигирование расщепленной ДНК, стимулируемое $NaCl$.

Все эти результаты показывают, что ЭДТА способен не только уменьшать, но и усиливать дискретную фрагментацию ядерной ДНК. Опосредуемое ЭДТА усиление деградации ДНК наблюдается в случа-

ях, когда ЭДТА добавляли после инкубации Mg- или MgЭ-ядер в Mg²⁺-содержащем буфере, или при последующей инкубации MgЭ-ядер в присутствии ионов Mg²⁺.

Аналогичные эффекты обнаружены также на модели Са-ядер (рис. 6). Как и в случае Mg-ядер, усиление дискретной фрагментации ядерной ДНК отмечено при обработке Са-ядер ЭДТА после инкубации их в среде с ионами Са²⁺ (или Mg²⁺), а также при инкубации СаЭ-ядер в присутствии ионов Mg²⁺ (см. рис. 6).

Из вышеизложенного следует, что эффект ЭДТА на препараты Mg- и Са-ядер однотипен и сводится к усилению фрагментации ядерной ДНК после инкубации их в присутствии ионов Mg²⁺.

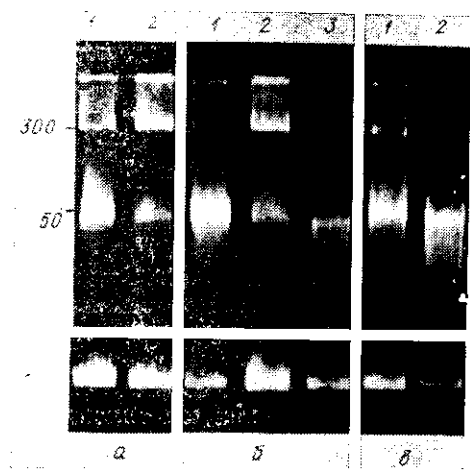


Рис. 6. Зависимое от ЭДТА усиление расщепления ДНК в Са- и СаЭ-ядрах: а — образцы Са- (1) и СаЭ- (2) ядер инкубировали в присутствии ионов Са²⁺ (1) или ЭДТА (2) на холоду (0°C); б — те же образцы инкубировали в течение 10 мин при 30°C с 5 mM СаCl₂ (1) или 5 mM ЭДТА (2). После инкубации ионы Са²⁺ замещали на 5 mM ЭДТА (3) и продолжали инкубацию еще 10 мин; в — образцы Са- (1) и СаЭ- (2) ядер инкубировали 10 мин при 30°C в присутствии 10 mM MgCl₂. Затем ядра обрабатывали 1%-м DS-Na и фракционировали в инвертируемом электрическом поле

Данные, представленные нами, свидетельствуют о том, что поведение ДНК-топоизомеразного комплекса, функционирующего в ядрах, имеет особенности, отличающие его от такового, функционирующего *in vitro*. Одна из них связана с влиянием ЭДТА на равновесную реакцию разрыва — воссоединения, катализируемую топоизомеразой II.

Как было показано в опытах *in vitro*, понижение температуры реакции или обработка комплекса ЭДТА приводит к лигированию расщепленной ДНК и диссоциации ДНК-топоизомеразного комплекса [4—6]. Это, однако, справедливо для комплексов, функционирующих в Mg²⁺-содержащей реакционной среде. В присутствии ионов Са²⁺ добавление ЭДТА вызывает не лигирование, а стабилизацию ДНК-топоизомеразного комплекса в расщепленном состоянии, что приводит к появлению двуцепочечных разрывов ДНК в отсутствие DS-Na [6]. Такой комплекс остается способным к дальнейшему функционированию и при последующем добавлении ионов Mg²⁺ может осуществлять лигирование расщепленной ДНК [6, 7].

В отличие от системы *in vitro* инкубация образцов ядер с ЭДТА не устраняет DS-Na-зависимого расщепления ДНК (см. рис. 1). Это означает, что обработка препаратов ядер ЭДТА (равно как и понижение температуры инкубации, рис. 3) не вызывает диссоциации ДНК-топоизомеразного комплекса. Нам не удалось предотвратить DS-Na-зависимое расщепление ДНК даже в Э-ядрах (т. е. в ядрах, выделенных в присутствии ЭДТА). Таким образом, неспособность к диссоциации в присутствии ЭДТА представляет собой первую особенность ДНК-топоизомеразного комплекса в препаратах изолированных ядер.

Вторая особенность ядерного ДНК-топоизомеразного комплекса связана с его однотипным поведением в Mg²⁺- и в Са²⁺-содержащей среде. Как видно, инкубация ядер с ЭДТА в обоих случаях уменьшает количество расщепленной ДНК. Однако количественный и качественный состав фрагментов ДНК, полученных при инкубации Mg(Са)-ядер в присутствии ЭДТА на холоду, практически не отличается от тако-

вого, выделенного из Mg(Ca)-ядер на холоду в отсутствие ЭДТА (рис. 4, а; 6, а). Эти данные означают, что уменьшение количества расщепленной ядерной ДНК при инкубации ядер с ЭДТА не связано с лигированием расщепленной ДНК. Вероятней всего, эффект ЭДТА обусловлен ингибированием реакции расщепления вследствие отсутствия ионов Mg^{2+} в реакционной среде. В то же время подавления расщепления ядерной ДНК не происходит, если Mg(Ca)-ядра обрабатывали ЭДТА после инкубации их в буфере для расщепления. В отличие от системы *in vitro* ЭДТА в этих условиях стимулирует фрагментацию ядерной ДНК, причем как в Mg^{2+} -, так и в Ca^{2+} -содержащей среде (см. рис. 3, б). Опосредуемое ЭДТА усиление фрагментации ядерной ДНК наблюдается также и при последующей инкубации MgЭ(CaЭ)-ядер в присутствии ионов Mg^{2+} (см. рис. 4, б). В обоих вариантах зависимое от ЭДТА усиление фрагментации ядерной ДНК может быть объяснено модификацией ЭДТА ДНК-топоизомеразного комплекса, приводящей к неспособности топоизомеразы II эффективно осуществлять равновесный цикл разрыва — воссоединения. Вследствие этого, возможно, реакция расщепления становится превалирующей. Это предположение подтверждается тем фактом, что ядерный ДНК-топоизомеразный комплекс, обработанный ЭДТА, теряет способность к лигированию расщепленной ДНК в присутствии NaCl (рис. 5).

Таким образом, в отличие от системы *in vitro* обработка ядерного ДНК-топоизомеразного комплекса ЭДТА приводит не к лигированию расщепленной ДНК, а к модификации свойств комплекса, способствующей более эффективному расщеплению ядерной ДНК.

Следующая особенность функционирующего ДНК-топоизомеразного комплекса в ядрах связана с приобретенной способностью производить DS-Na-независимые разрывы ДНК после того, как комплекс обработан DS-Na. Действительно, появление фрагментов ДНК при повторном фракционировании оставшихся на старте образцов, наблюдаемое в отсутствие белок-денатурирующих агентов (см. рис. 1), ясно показывает, что вновь образующиеся фрагменты представляют собой результат повторного расщепления оставшейся на старте ДНК, а не являются следствием неполного лизиса ядер.

Вызывает удивление, но тем не менее кажется правдоподобным то обстоятельство, что в ядрах ДНК-топоизомеразный комплекс не утрачивает способности к дальнейшему расщеплению ДНК даже после его обработки DS-Na. Создается впечатление, что DS-Na, подобно ЭДТА, способен модифицировать комплекс топоизомеразы II — нерасщепленная ДНК, придавая ему способность к дальнейшей фрагментации ядерной ДНК DS-Na-независимым способом (см. рис. 1).

Особенности функционирования ДНК-топоизомеразного комплекса, обсуждаемые выше, очевидно, связаны с тем, что топоизомеразы II, как полагают, может выполнять в клетке не только каталитическую, но и структурную роль [8—11], принимая участие в прикреплении ядерной ДНК к скелетным образованиям интерфазного ядра и метафазных хромосом [12—16]. Из этого следует, что ДНК-топоизомеразный комплекс в клеточном ядре должен существовать постоянно, представляя собой основу для высших уровней компактизации хроматина. С такой точки зрения он изначально «уловлен», и различные агенты, такие, например, как ЭДТА, способны лишь стабилизировать его, но не вызывать диссоциации. Стабилизация комплекса, в свою очередь, нарушает устанавливаемое равновесие между расщепляемыми и нерасщепляемыми состояниями, вызывая усиление DS-Na-зависимой фрагментации ядерной ДНК.

В пользу того, что по меньшей мере часть ДНК-топоизомеразных комплексов в ядрах действительно является изначально «стабилизированной», свидетельствует факт появления типичного набора дискретных фрагментов ДНК при обработке ядер не только DS-Na, но и протеиназой K при полном отсутствии белок-денатурирующих агентов

(см. [2]). Подобное явление отмечено для «стабилизированных» (trapped) ДНК-топоизомеразных комплексов *in vitro* [6].

Приведенные данные показывают, что в отличие от системы *in vitro* обработка комплекса топоизомеразы II — ядерная ДНК ЭДТА приводит к модификации его свойств, выражающейся в нарушении равновесного цикла разрыва — воссоединения ДНК. Это обстоятельство позволяет высказать предположение о том, что в условиях *in vivo* могут существовать различные варианты ДНК-топоизомеразного комплекса, отличающиеся по способности осуществлять равновесную реакцию разрыва — воссоединения. На это указывают также обнаруженные нами резкие отличия в поведении DS-Na-независимых и DS-Na-зависимых продуктов расщепления в Ca-ядрах, демонстрирующие неспособность последних лигировать расщепленную ДНК в условиях, при которых лигирование DS-Na-независимого продукта расщепления происходит (рис. 6, предыдущее сообщение).

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что функционирование ДНК-топоизомеразного комплекса в ядрах имеет свои особенности, отличающие его от комплекса в условиях *in vitro*. Вероятно, эти различия связаны со структурной ролью топоизомеразы II, которая вместе с другими белками формирует основу для прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу [12—16], что изначально сказывается на свойствах ДНК-топоизомеразного комплекса. Способность ядерной топоизомеразы II с различной эффективностью осуществлять равновесный цикл расщепления — воссоединения ДНК свидетельствует о многообразии взаимодействий фермента с ядерной ДНК, выражающемся в существовании различных вариантов комплекса ДНК — топоизомеразы. Не исключено, что вариации во взаимодействии топоизомеразы II и ядерной ДНК, ведущие к модификации равновесного цикла разрыва — воссоединения ядерной ДНК, могут иметь физиологическое значение, которое еще предстоит выяснить.

Резюме. Досліджено властивості ДНК-топоізомеразного комплексу в препаратах ізольованих ядер. Показано, що комплекс ядерна ДНК — топоізомеразы II функціонує однаково як у середовищі з Mg^{2+} , так і з Ca^{2+} . На відміну від комплексу за умов *in vitro*, ядерний ДНК-топоізомеразний комплекс, оброблений ЕДТА, сприяє не лігуванню, а посиленню розщеплення ядерної ДНК. Залежне від ЕДТА посилене розщеплення ДНК спостерігається, коли ядра, інкубовані у середовищі з Mg^{2+} (Ca^{2+}), були оброблені ЕДТА або за інкубації MgE (CaE) ядер у присутності іонів Mg^{2+} . Показано, що ядерний комплекс, оброблений $Ds-Na$, набуває властивості $Ds-Na$ -незалежного розщеплення ядерної ДНК.

Особливості поведінки комплексу топоізомеразы II — ядерна ДНК можуть бути пов'язані з участю фермента у підтримці вищих рівнів структурової організації хроматину, що призводить до модифікації комплексу за умов *in vivo*. Зроблено припущення про наявність в клітинах різних варіантів ДНК-топоізомеразного комплексу, що може мати фізіологічне значення.

Summary. The properties of topoisomerase II/DNA complex in nuclear preparations have been investigated.

It has been shown that topoII/nuclear DNA complex functions untypically both in Mg^{++} - and in Ca^{++} -containing media. Unlike to the *in vitro* assay the treatment of topoII/nuclear DNA complex with EDTA resulted in increase of nuclear DNA cleavage rather than its rejoining. The nuclear topoII/DNA complex treated with SDS was found to acquire the capacity to subsequent SDS-independent nuclear DNA cleavage.

The salient features of topoisomerase II/nuclear DNA complex are supposed to be due to the topoII enzyme involvement in higher levels chromatin compactization leading to the initial stabilization of topoII/nuclear DNA complex *in vivo* conditions.

The availability in cells the different topoII/DNA complex variants of possible physiological value has been proposed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. 1. Ядерная ДНК как составная часть ДНК-топоизомеразного комплекса.—// Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 5.—С. 44.
2. 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.
3. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. 2. Дискретные фрагменты ДНК и уровни структурной организации хроматина // Там же.— № 6.—С. 43—51.
4. 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.
5. Liu L. F., Rowe T. C., Yang L. et al. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II // Ibid.—P. 15365—15370.
6. 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.
7. Osheroff N. Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide // Ibid.—1989.—28.—P. 6157—6160.
8. Farnshaw W. C., Heck M. M. S. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes // J. Cell. Biol.—1985.—109.—P. 1716—1725.
9. Gasser S. M., Laemmli U. K. The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site // EMBO J.—1986.—5.—P. 511—518.
10. 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.
11. Cockerill P. N., Garrard W. T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites // Cell.—1986.—44.—P. 273—283.
12. Earnshaw W. C., Halligan B., Cooke L. A. et al. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds // J. Cell. Biol.—1985.—100.—P. 1706.
13. Uemura T., Ohkura H., Adachi Y. et al. DNA topoisomerase II is required for condensation and segregation of mitotic chromosomes in *S. pombe* // Cell.—1987.—50.—P. 917—925.
14. Newport J. Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA // Ibid.—48.—P. 205—217.
15. Sperry A. O., Blasquez V. C., Garrard W. T. Disfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association region and topoisomerase II // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 5497—5501.
16. Adachi Y., Kas E., Laemmli U. K. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associate regions // EMBO J.—1989.—8, N 13.—P. 3997—4006.

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

Получено 11.12.92

УДК 535.34:615.015

А. Е. Болдескул, А. Н. Величко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУР СТРУКТУРНО-ФАЗОВЫХ ПЕРЕСТРОЕК В МОДЕЛЬНЫХ И БИОМЕМБРАНАХ ПО СПЕКТРАЛЬНЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ МЕРОЦИАНИНА 540

Изучены спектры поглощения и флуоресценции цианинового красителя мероцианина 540 (M540) в органических растворителях, липосомах из различных классов липидов, в микросомах печени крыс и эритроцитах. Показано, что наряду с известным способом определения температур фазовых переходов T_n по спектрам поглощения M540 возможно определение этого показателя по изменению квантового выхода мономеров, причем предлагаемый метод является более простым. Проведено сопоставление обоих методов.

Введение. Среди структурных перестроек биомембран различной природы, вызываемых множеством физико-химических факторов, термоиндуцированные структурно-фазовые переходы являются наиболее неблагоприятными, а иногда и губительными для организма [1]. Изучение механизмов переходов и динамической структуры бислоя воз-

© А. Е. Болдескул, А. Н. Величко, 1993