

зано с отмеченной Хиллманом неопределенностью биохимических методов определения структур. Допустим ее структурную трансформацию в другую аминокислоту, мы предполагаем, что ей принадлежит некая важная функциональная роль в организации биологических процессов, как в случае превращения тимина в урацил.

Факты варьирования кодонов аминокислот и результаты проведенных исследований диктуют необходимость вести целосистемный поиск действительных принципов и механизмов кодирования, исходя из реального параметра (СЭП) количественной оценки химико-биологической информации, строения биомолекул фенотипа и кодирующих оснований генотипа, взаимодействие и связь между которыми формирует и реализует все виды биологической памяти, лежащие в основе процесса восприятия, анализа, синтеза и резонансной модуляции, индукции и дедукции воли мысли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов И. М. Основы теории чисел. М., 1972.
2. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 28, 3, 216, 1985.
3. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 10, 11, 958, 1987.
4. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 11, 7, 613, 1988.
5. Давидян Д. Б. Биолог. ж. Армении, 11, 8, 710, 1988 (Деп. в ВИНИТИ, № 6958-Б88 от 31.X.1988 г.)
6. Кедров Б. М., Трифонов Л. П. О современных проблемах периодической системы. М., 1974.
7. Шамаков В. Великие Арканы Таро. М., 1916.

Поступило 10.III 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 6 (42), 1989

УДК 577.1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ХРОМАТИНА КАК ФАКТОР, ПОВЫШАЮЩИЙ ЧАСТОТУ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК HeLa Ca-ДНК pSV2neo

Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что обработка Na-бутиратом, ДМСО, ди-РНК, дб-цАМФ повышает частоту трансформации клеток HeLa Ca-принципием ДНК pSV2 neo. У всех изученных стабильных трансформантов ген neo интегрирован в ДНК хроматина и сцеплен с фрагментами ДНК, относящимися к повторяющимся последовательностям генома. Указанные стимуляторы ДНК-опосредованной трансформации клеток HeLa значительно повышали в ядре активность Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы и долю хроматина, чувствительной к ДНКазе; деконденсированные участки хроматина были обогащены повторяющимися последовательностями генома.

Сокращения: ДМСО—диметилсульфат, дб-цАМФ—дibuтирил-п-АМФ, ди-РНК—двунивая РНК.

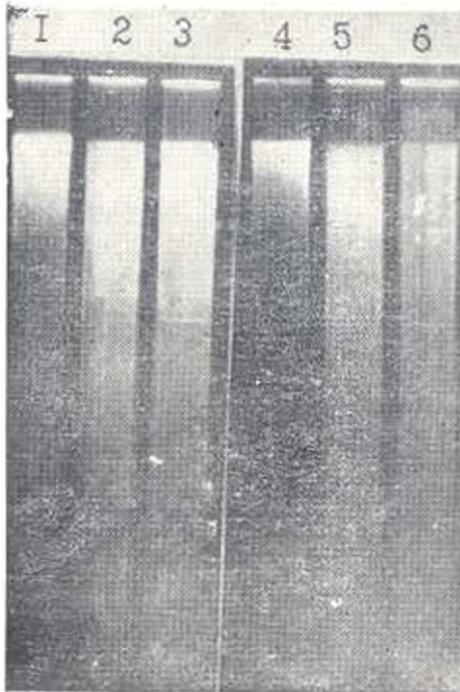


Рис. 1. Расщепление хроматина ДНК азой 1: 1,4—хроматин, полученный из шпактных HeLa; 2, 3, 5, 6—хроматин клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом, пАМФ, ДМСО, ди-РНК соответственно. Электрофорез ДНК проведен в 1,2% геле агарозы.

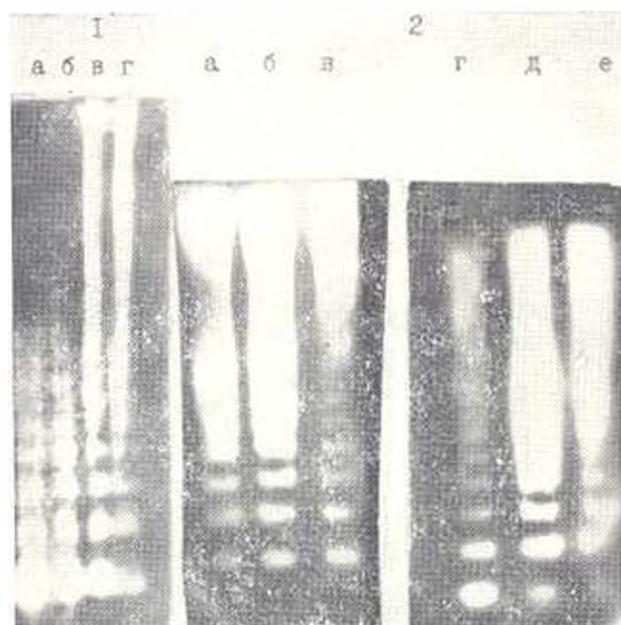


Рис. 2. Распределение хроматина клеток HeLa Ca^{2+} и Mg^{2+} зависимой гидролизацией (1), микрококковой нуклеазой (2). 1 а, б — хроматин клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом и цАМФ соответственно; 1 в, г — хроматин интактных клеток HeLa, 2 а, б, в, г — хроматин клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом, цАМФ, д-РНК соответственно; 2 д, е — хроматин интактных клеток HeLa.

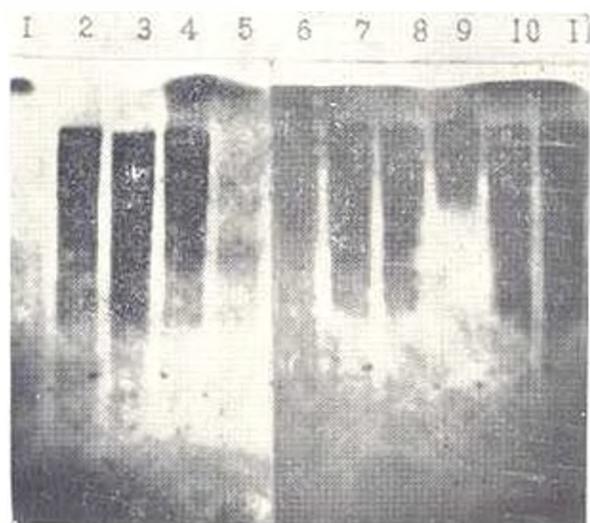


Рис. 3. Гибридизациямицели ДНК интактных клеток HeLa, обработанных гидролизацией Hind III ^{32}P -ДНК плазмид: 2, 3—p11; 4—p12; 6, 7—p28; 8—p36; 9—p105; 10, 11—p107; 15—pSV 2 neo.

Յույց է արված, որ Na-բուտիրատով, DMSO-ով, կրկնէլ-ԿՆՔ-ով, դր-ցԱՄՖ-ով մշակումը բարձրացնում է HeLa Ca^{2+} -արևելցիպիտատով ԳՆՔ-pSV2 նեո ԳՆՔ-ների տրանսֆորմացիոն արձագանքները: Ենթադրվում է, որ ստամոքսի խոռոչում կայուն տրանսֆորմանսներում նեո գենը ինտեգրացված է ջրածառիկի ԿՆՔ-ում և միացած է ԳՆՔ-ի ալն նստերին, որոնք վերակերպում են գենոմի կրկնվող հաշորդակառույցներ: HeLa բջիջների ԳՆՔ-հարողական տրանսֆորմացիայի վերը նշված ստիմուլյատորները զգալիորեն բարձրացնում են կորիզում Ca^{2+} -Mg-փոխկապակցված էնդոնուկլեոզայի և քրոմատինի բաժնի ակտիվությունը, որը զգալուն է ԳՆՔ-ի նկատմամբ: Քրոմատինի ղեկնղննուցված տեղամասերը հարստացվում են գենոմի կրկնվող հաշորդակառույցներին միջոցով:

It has been shown that the treatment with Na-butyrate, DMSO, ds-RNA, db-cAMP increases the frequency of the transformation of HeLa cells with Ca^{2+} -precipitated DNA of pSV2neo. All studied stable transformants have gene "neo", integrated into chromatin DNA and cohesive with DNA fragments, corresponding to the repetitive sequences of genome. Mentioned stimulators of HeLa cells DNA-mediated transformation considerably enhance the activity of Ca^{2+} -dependent endonuclease in nucleus and the part of chromatin, which is sensitive to DNase I: Decondensed regions of chromatin have been enriched with the repetitive sequences of genome.

Клетки HeLa—трансформация—хроматин.

Трансформация клеток млекопитающих путем введения чужеродной ДНК индивидуальных генов сопровождается интеграцией вводимого гена в геном клетки, его экспрессией, стабильно и наследуемо сохраняемым изменением и фенотипе реципиентных клеток [5, 11, 12]. Вместе с тем частота стабильной трансформации, выявляемая в условиях селективного отбора, обычно низкая, и механизмы, способствующие интеграции внеклеточной ДНК в геном реципиентной клетки, недостаточно изучены. Ранее было показано, что Na-бутират [7], DMSO [10], db-РНК повышают частоту стабильной трансформации клеток высших эукариот.

Материал и методы. Для трансформации клетки HeLa культивировали Ca-преципитатом ДНК плазмиды pSV2neo или ДНК pSV2neo, рекапсулированной в нуклеосома-РН [1], из расчета 10 мкг ДНК на 5×10^6 клеток. Эта плазида обладает устойчивостью к антибиотик у-418, токсичному для клеток эукариот [14]. После 24 ч инкубации с ДНК pSV2neo и глициринового шока [6] в среде добавляли одно из следующих соединений: Na-бутират 5 мМ, дибутрил-дАМФ (или 8 бром-дАМФ) 0,2 мМ, диметилсульфоксид (DMSO)—100 мМ или db-РНК—50 мкг; после 12 ч инкубации клетки HeLa (по 10^7 клеток) пересевали в чашки с новой селективной ростовой средой, к которой к 48 часу инкубации добавляли среду, содержащую 1 мг/мл антибиотика G-418 (Shering). Через 36 ч клетки HeLa высеивали в чашки со свежей средой с 1 мг/мл G-418. Среду меняли через каждые 3 дня, выростные колонии подсчитывали через 18 дней.

Клетки, выделенные из клеток HeLa, суспендировали в растворе с 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $NaCl$, 10 мМ трис-HCl (рН 7,4) из расчета 1 мг ДНК/мл и обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) 5 мин при 37°. Электрофорез экстрагированной ДНК (50 мкг) проводили в 1%ном агарозном геле. ДНК в геле окрашивали этидиум-бромидом, выявляли ДНК проводили на UV-иллюминаторе (ФРГ).

Электродинамическую активность Ca^{2+} -Mg-зависимой эндонуклеазы определяли при инкубации с клетками HeLa в концентрации 75 ед./мл в буфере (50 мМ трис-HCl (рН 7,6), 25 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,2 мМ фенолметилсульфонилфторид), содержащем 0,25 М сахарозы и 1 мМ $CaCl_2$. Реакцию останавливали 15 мМ ЭДТА (рН 7,5).

Ядра в концентрации $75 A_{260}$ мл гидролизуют микрококковой нуклеазой (1 ед на 50 мкг ДНК) в течение 5 мин в буфере, содержащем 0,25 М сахаразы, 50 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 15 мМ 2-морфоллинсульфоновой кислоты, 0,1 мМ фептасульфоклорид (рН 6,6). Реакцию останавливают добавлением EDTA до конечной концентрации 10 мМ. О глубине гидролиза хроматина судили по степени вывождения кислоторастворимых олигонуклеотидов в пределах 1—1,5%.

«Ник»-трансляцию ядер клеток HeLa проводили по описанному методу [8].

Ренатурацию ДНК проводили методом, описанным в работе [10]. ДНК, изолированную после реакции «ник»-трансляции, смешивали с немеченой ядерной ДНК, обрабатывали ультразвуком до получения фрагментов с мол. массой $500-800 \times 10^3$, денатурировали. Ренатурацию полученных фрагментов ДНК и отделение реассоциированных фрагментов ДНК от денатурированных фрагментов проводили на колонке с гидроксипатитом.

Ген neo был изолирован в составе фрагментов Bgl II/Sma I транспозона Tn-5. Для гибридизации [15] использованы меченные ³²P-Bgl II/Sma I фрагменты со специфической активностью 10^6 имп/мин на 1 мкг ДНК.

Клетки HeLa, предварительно меченные ¹⁴C-тимидином, 0,1 мКи/мл, после инкубации в течение 12 ч с Na-бутиратом, дибутирил-цАМФ, ДМСО, ди-РНК, анализировали в линейном градиенте щелочной сахаразы (5—20% сахаразы и 0,9 М NaCl)/0 мМ EDTA/0,3 N NaOH) согласно [11]. 150 мкг клеточной ДНК расщепляли в объеме 0,5 мл эндонуклеазой Hind-III. Лигирование проводили в течение 18 ч при 16° в присутствии 5×10^3 единиц ДНК-лигазы фага T₄. ДНК выделяли стандартным методом фенольной депротенинизации, осаждали и промывали этанолом.

Полученная ДНК была ресуспендирована в 0,5 мл 10 мМ три-НСl (рН 8,0), 1 мМ EDTA и использована в трансформации *E. coli*. Трансформированные клетки суспендировали в 5 мл питательной среды и по 150 мкг суспензии высевали в чашках Петри на питательный агар, содержащий 150 мкг/мл ампициллина. В среднем на 8—5 мкг ДНК формировалась одна ампициллин-резистентная колония neo⁺.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл., обработка клеток HeLa в условиях трансформации pSV2neo Na-бутиратом, дибутирил-цАМФ, ДМСО, а также ди-РНК существенно повышали число стабильных трансформантов HeLa neo⁺.

Эффективность трансформации HeLa pSV2neo

pSV2neo	Контроль	Обработка клеток HeLa			
		Na-бутират	ди-бутирил-цАМФ	ДМСО	ди-РНК
ДНК Са-пренингит	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}
Реконструированная нуклеосома (P11)	$6 \cdot 10^{-4}$	0	$1 \cdot 10^{-3}$	—	—

Полагая, что структура хроматина клеток, обработанных соединениями, повышающими частоту трансформации, изменяется таким образом, что становится возможной интеграция pSV2neo в геном относительно большего числа клеток, мы исследовали доступность хроматина клеток HeLa к ДНКазе I в условиях нашего эксперимента.

Полученные результаты (рис. 1, см вкл. I) свидетельствуют, что все использованные стимуляторы существенно увеличивают долю хроматина, гидролизуемого ДНКазой I [13]; при этом также возрастает количество ДНК, высвобождаемой в виде кислоторастворимой ДНК

Выявленные изменения в структуре хроматина клеток HeLa отражают индуцированную, возможно, избирательно в зависимости от соединения, деконденсацию хроматина с появлением участков хроматина, гиперчувствительных к ДНКазе I. Одновременно в ядрах клеток HeLa, трансформацию которых рSV2neo проводили в присутствии Na-бутирата, ДМСО, цАМФ, дн-РНК, относительно высока активность Са/Mg-зависимой эндонуклеазы, повышена доступность хроматина и к расщеплению по мононуклеосомным участкам микрококковой нуклеазой (рис. 2, см. вкл. I).

Уменьшение чувствительности хроматина обработанных клеток HeLa к ДНКазе I наступало через 48 ч после удаления Na-бутирата, ДМСО, цАМФ и замены среды на свежую. Соответственно снижалась эффективность трансформации клеток HeLa рSV2neo в 4—5 раз: 10^{-4} для ДНК Са-преципитата и 3×10^{-4} для ДНК рSV2neo, реконструированной в РН.

Аналогичным образом уменьшалась доступность хроматина HeLa к Са/Mg-зависимой эндонуклеазе и микрококковой нуклеазе.

В ряде работ было показано, что в реакции «ник-трансляции» преимущественно метятся ДНКазы I-гиперчувствительные участки хроматина [8].

Для определения природы ДНКазы I-гиперчувствительных участков хроматина была проведена реакция «ник-трансляции» хроматина клеток HeLa, необработанных и обработанных индукторами в стандартных условиях трансформации рSV2neo.

Контрольные эксперименты показали, что в отсутствие экзогенной ДНКазы реакция «ник-трансляции» протекает достаточно выраженно, по-видимому, за счет активности эндогенных нуклеаз, вызывающих единичные разрывы в ДНК. При этом в условиях воздействия Na-бутирата, цАМФ, ДМСО доступность хроматина к эндогенным нуклеазам существенно повышается.

Для характеристики природы ДНКазы I-гиперчувствительных участков «ник-транслированную» ДНК хроматина клеток HeLa (использована ДНК хроматина, «ник-трансляция» которой проводилась за счет активности эндогенных нуклеаз) смешивали с немеченой ДНК тотального хроматина, обрабатывали ультразвуком, денатурировали и использовали в реакции реассоциации.

Обнаружено, что при Cot-10 около 30% радиометки ^{32}P находится в двуспиральной форме (в контроле), около 50% — в двуспиральной форме в ДНК хроматина клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом, цАМФ, ДМСО, при этом уровень «ник-трансляции» ДНК в 5 раз выше, чем в контроле.

Таким образом, под воздействием указанных соединений происходит активация последовательности ДНК, обогащенных повторяющимися генами.

Из данных литературы известно, что при Cot-10 реассоциируют последовательности ДНК, относящиеся к семействам высокоповторяющихся и умеренных повторов генома, составляющие для приматов 30% ДНК хроматина. Полученные результаты показывают, что

ДНК-аза I гиперчувствительные участки хроматина, индуцированные использованными соединениями, обогащены повторами относительно тотальной ДНК хроматина приблизительно в 4 раза.

С целью выяснения наличия единичных разрывов в ДНК хроматина клеток HeLa в условиях трансформации клетки HeLa после 24 ч инкубации с Na-бутиратом, дб-цАМФ, ДМСО и ди-РНК замораживали в жидком азоте и затем анализировали в линейном градиенте щелочной сахарозы (см. методы).

Практически весь меченый материал (^{14}C -ДНК) имел коэффициент седиментации около 130. В условиях же инкубации с одним из указанных соединений имела место некоторая фрагментация ДНК и в районе менее чем 40S появлялся достаточно четко выраженный пик фрагментированной ДНК. После замены инкубационной среды на свежую (см. метод трансформации HeLa) и инкубации клеток в течение 48—72 ч низкомолекулярная фракция ДНК в градиенте щелочной сахарозы исчезала из зоны низкомолекулярной ДНК, что свидетельствует о возможной репарации и лигировании, образовавшихся разрывов в ДНК. Проверка физиологического состояния клеток HeLa показала, что в условиях эксперимента менее чем один процент клеток окрашивался трипановым синим.

Для характеристики участков интеграции гена neo в геномной ДНК, мы провели трансформацию E. coli ДНК клеток HeLa-neo^r, трансформированных в условиях обработки HeLa Na-бутиратом или цАМФ (см. методы); были выделены и изучены по 5 плазмидных рекомбинантных ДНК из каждой группы трансформантов E. coli, обозначенных соответственно как p11-15 и p28, 36, 105—107. ДНК этих плазмид с мол. массой в пределах $1,5\text{--}2 \times 10^5$ была использована после обработки ультразвуком до мол. массы $7\text{--}5 \times 10^5$ в гибридизации по Саутерну [13] с ДНК хроматина HeLa, гидролизованной эндонуклеазой (рис. 3, см. вкл. I).

Из рис. 3 видно, что практически все изученные рекомбинантные ДНК содержат последовательности, повторяющиеся в геноме HeLa с достаточно высокой частотой: ДНК плазмиды pSV2neo после обработки ультразвуком до $7\text{--}5 \times 10^5$ не гибридизуется с геномной ДНК HeLa.

Полученные результаты показывают, что использованные при трансформации HeLa pSV2neo Na-бутират, дибутирил-цАМФ, ДМСО, ди-РНК повышают в клетках долю активного деконденсированного хроматина, индуцируют в нем единичные разрывы и в связи с этим, по-видимому, и активацию репарационных процессов; отмечается относительно большая доступность хроматина к ДНКазе I, микрококковой нуклеазе и Ca/Mg -зависимой эндонуклеазе; структурные изменения в хроматине коррелируют с повышением эффективности трансформации HeLa pSV2neo.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарян Р. А., Галстян Г. Г., Геворкян Н. Р., Галстян М. Г., Амирханови Л. А. Биоплимеры и клетка. 1, 48—53, 1988.
2. Захарян Р. А., Азарян И., Арутюнян Дж. ДАН СССР, 5, 1251—1253, 1986.

3. Berger N. A., Petrolid S. J. Johnson E. S. Biochem. Biophys. Acta 478, 44—58, 1977.
4. Bloom R. S., Anderson J. N. Cell, 15, 141—150, 1978.
5. Cepcechi M. R. Cell, 22, 2, 179—188, 1980.
6. Frost E., Williams J. Virology, 91, 39—50, 1978.
7. Gorman C. M., Howard R. H. Nucleic Acids Research, 11, 21, 7631—7648, 1983.
8. Javaherian K., Fasman G. D. J. of Biological Chemistry, 259, 5, 3345—3349, 1984.
9. Kuo M. T., Iyer R., Schwartz R. J. Nucleic Acids Research, 10, 4565—4578, 1982.
10. Lewis W. H., Srinivasan P. R., Stokoe N. Somatic Cell Genetics, 6, 3, 333—347, 1980.
11. Peilceer A., Wigler M., Axel R. Cell, 14, 1, 133—141, 1978.
12. Stilaty S. N., Apoashlan H. V. Science, 220, 4 8, 725—727, 1983.
13. Southern E. M. J. Mol. Biol., 98, 3, 503—517, 1975.

Поступило 2.11.1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 6.(42).1989

УДК 577.352.315

ДВУХКООРДИНАТНАЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Г. А. МНАЦАКЯНИ, А. С. КАЛАЧЯН, К. А. ШАГИНЯН,
Т. Н. АКОЛЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

На основании изучения выхода белка из скелета мембраны в раствор при разных комбинациях концентраций компонентов экстракционной смеси составлены особые диаграммы. По форме так называемой линии полувыхода, проведенной на диаграмме по точкам 50%-ной экстракции белка, выявлены характерные группы среди изученных белков. Для первой группы белков характерна рН-независимость выхода. Для белков второй группы переход зависит как от рН, так и от ионной силы раствора. Линия полувыхода имеет характерную ступеньку. Переход белков третьей группы носит сложный характер зависимости как от рН, так и от ионной силы, линия полувыхода имеет множественные ступени.

Ըստ ճանաչող խառնուրդների կոնցենտրացիաների տարբեր օպտակաբյուրների ազդեցության տակ մեմբրանի բազուկաբյուրային բաժանումը անհավասարապես կազմակերպվող յուրաքանչյուր սպիտակուցի նամար կազմվում էն աստիճանի դիագրամները Այսպես կոչված կեսափած դիր օպտակաբյուր, որը անցկացվում է սպիտակուցի 50% էլըի կետերով, ի նախ ևն ընդհանրապես անհասկանալի խմբեր Առաջին խմբի սպիտակուցների նամար ընթաց է ընդհանրապես անցումը թայանթի բազուկաբյուրային լուծույթի ն կրող խմբի սպիտակուցները ցուցաբերում են անցում, որը կախված է ինչպես ընդհանրապես էլ լուծույթի խմային ուժից: Արդյոք խմբի անցումը լուծույթի ցուցաբերում է բարդ կախիմանքային ընդհանրապես էլ ինչպես էլ խմային ուժից: Գրանցվող դիրը ընտրում են բազուկաբյուրի բեկումներ:

Special diagrams are constructed on the basis of study of solubilization of proteins from the membrane in case of different combinations of concentrations of the extraction mixture components. According to the form of the so-called half exit line on the diagrams formed by points of 50 per cent extraction of proteins, the characteristic groups are revealed among the tested proteins. A pH-independent passage is determined for