Биолог. ж. Армении, № 9—10 (42) 1989 УДК 577.1

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЦЕПЦИЯ МОЛЕКУЛ ДНК И ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

Р. А. ЗАХАРЯН, В. А. ОНСЕПЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Методом аффинной хроматографии выделены и идентифицированы ДНК- и РНК-связывающие белки плазматической мембраны печени крыс; показано, что взаимодействие ДНК и РНК с клетками печени высокоспецифично и что трансмембранный перенос молекул ДНК в клетки печени происходит в составе клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

Աֆֆինային քրոմատոգրաֆիայի նշանակով անջատվել և ի հայտ են բերվել առնանեների լյարդի պլազմատիկ թաղանթներում ԴՆԹ- և ՌՆԹ-կապող սպիտակուցներ։ Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի փոխազդեցությունը լյարդի բջիջների հետ ունի բարձր սպեցիֆիկություն և որ ԴՆԹ-ի ու ՌՆԹ-ի մոլեկուլների միջմեմբրանային փոխադրումը լյարդի բջիջներում կատարվում է կլատրին-պարունակող ենթբջջային վեզիկուլների կազմում։

Both DNA- and RNA-binding proteins of rat liver plasmatic membrane have been isolated and identified using affinity chromatography technique. It has been shown that DNA and RNA interactions with liver cells are highly specific, and DNA/RNA transmembrane transfer in liver cells takes place due to clatrine-containing endocytes vesicules.

Мембрана—ДНК- и РНК-связывающие белки—клатрин

Перенос молекул ДНК через плазматическую мембрану обеспечивает процесс генетической трансформации.

Молекулы ДНК, РНК успешно пересекают клеточную мембрану, и транзиторная экспрессия введенного генетического материала может достигать 10% от числа обработанных клеток [9, 11]. Получены данные, свидетельствующие об участии ДНК и РНК-связывающих белков плазматических мембран клеток как про-, так и эукариот в процессе трансмембранного переноса ДНК и РНК [2—4, 6, 7].

Целью работы было показать, что взаимодействие ДНК и РНК с клетками печени высокоспецифично и трансмембранный перенос молекул ДНК и РНК в клетках печени происходит в составе клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

Материал и методики. Манипуляции с животными проводили под наркозом 0.5%-ным нембуталом из расчета 10/мкл/г веса. В экспериментах были использованы крысы линии Вистар и белые мыши. Клетки печени препарировали из срезов в сбалансированном солевом растворе Хенкса, содержащем 0,05%-ную коллагеназу, по описанному методу [8]. Взаимодействие нуклеиновых кислот с клетками печени и суспензией осуществлялось в сбалансированном растворе Хэнкса в присутствии 5 мМ $CaCl_2$, 10 мМ HEPES (pH 7,1) при 4°. В экспериментах использовано 10^7 клеток. Плазматические мембраны клеток печени крыс получали по известному методу [1].

Сокращения: РН—реконструированные нуклеосомы.

Использовали ДНК печени крыс с М. в 20·10⁶ Дальтон и активностью 8·10⁴ имп/мин/мкг. ДНК и РНК-вызывающие белки из плазматических мембран клеток печени получали методом аффинной хроматографии на колонке сефарозы 4В с иммобилизованными ДНК и РНК.

Солюбилизацию мембранных белков проводили в присутствии тритона Х-100, сорбцию — в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,2), 100 мМ NaCl; сорбированные белки элюировали 0,5 М NaCl в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,2). Полученные образцы белков идентифицировали электрофорезом в 7—10%-ном ПААГ.

Плазмидную ДНК pBR 322 реконструировали в нуклеосомы после предварительного пикирования ДНК S-1 нуклеазой [12]. Процесс интернализации ДНК pBR322, реконструированной в нуклеосомы, в клетках печени мыши изучали в условиях in vivo: через 45 мин после внутривенного введения 100 мкг ДНК в составе РН из печени мыши были выделены ДНК-содержащие эндоцитарные везикулы по методу, описанному [12], везикулы были проанализированы на содержание белка клатрина [14], интактной молекулы ДНК. Для гибридизации использована меченая ДНК pBR322 со специфической активностью 10⁸ имп/мин на 1 мкг ДНК. Электрофорез ДНК проводили в 0,6%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Чтобы определить, насколько специфично взаимодействие ДНК и РНК [13] с плазматической мембраной клеток печени, мы изучали процесс сорбции ДНК и дсРНК на клетках печени в суспензии.

На рис. 1 приведены кривые насыщения связывания молекул ДНК и РНК с поверхностной мембраной клеток печени.

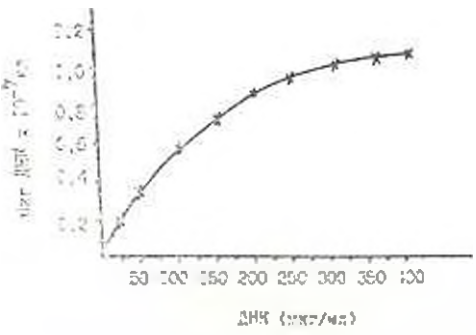

Рис. 1.

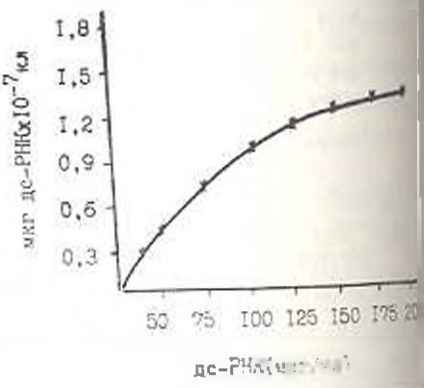

Рис. 2.

Рис. 1. Связывание [¹⁴C] ДНК с клетками печени (10^{-7} клеток). На оси ординат — количество связавшихся молекул ДНК в мкг, на оси абсцисс — количество добавленной ДНК в мкг/мл.

Рис. 2. Связывание [³H] дсРНК с клетками печени (10^{-7} клеток). На оси ординат — количество связавшихся молекул дсРНК в мкг, на оси абсцисс — количество добавленной РНК в мкг/мл.

Kd для ДНК и дсРНК составил около $2{,}03\times10^{-7}$ и 10^{-8} М соответственно. Присутствие «холодной» РНК или ДНК не влияло на связывание соответственно [C¹⁴] ДНК или [³H] РНК (рис. 2).

Предварительная обработка клеток печени трипсином (150 мкг/мл) практически полностью снимала ДНК и дс-РНК-связывающую способность клеток печени; обработка ДНКазой (100 мкг/мл и РНКазой (50 мкг/мл) не влияла на сорбцию ДНК и РНК на клетках. Полученные данные свидетельствуют, что фактор связывания на поверхности клеток представлен белками и взаимодействие молекул ДНК и РНК с белками плазматической мембраны специфично.

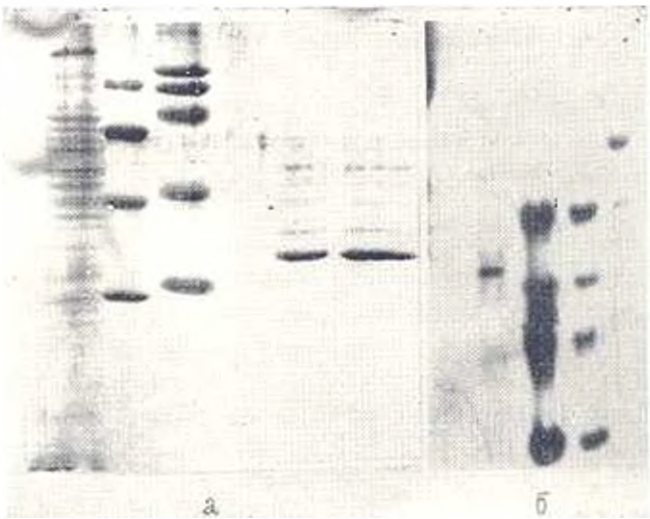

Рис. 3. а) Гель-электрофорез в 7% ном ПААГ белков, элюированных 0,5 М NaCl с колонки ДНК-сефароза—4 В. Слева направо: 1—белки плазматической мембраны клеток печени, 2, 3—маркеры, 4—ДНК-связывающиеся белки. б) Гель-электрофорез в 7%-ном ПААГ белков, элюированных 0,5 М NaCl с колонки РНК-сефароза—4В. Слева направо: 1—РНК-связывающиеся белки, 2, 3, 4—маркеры.

Рис. 4. а) Гель-электрофорез в 7,5%-ном ПААГ белков эндоцитарных везикул, содержащих ДНК, выделенных из печени крыс через 45 мин после внутривенной инъекции 100 мкг ДНК pBR322 в составе РНП. 1—белки мембраны с М. в. 180×10^3 и 90×10^3, 2—белки клатрин-содержащих везикул, изолированных из печени крыс (см. в тексте); 3—белки-маркеры с М. в. 48×10^3 и 38×10^3. б) Идентификация экзогенной ДНК pBR322 в клатрин-содержащих эндоцитарных везикулах, выделенных из печени крысы. ДНК фракционировали в 0,6%-ном агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозные фильтры по Саудерну и гибридизовывали с [^{32}P] ДНК pBR322. Слева—ДНК pBR322, изолированная из везикул, справа—маркер, суперспирализованная форма молекулы ДНК pBR322

Далее был проведен анализ белков плазматической мембраны клеток печени, избирательно связывающихся с ДНК или дсРНК. Солюбилизованная в присутствии Тритона X-100 очищенная фракция плазматических мембран клеток печени была сорбирована на дсРНК или ДНК, иммобилизованных на сефарозе -4В [10].

Гель-электрофорез сорбированных белков, элюированных 0,5 М NaCl, показал, что с молекулами ДНК связывался в основном белок с М.в. около 35 kd, с молекулами дсРНК — в основном белки с М.в. 52—48 kd (рис. 3а, б, см. вклейку).

С целью выяснения возможной роли клатрин-содержащих эндоцитарных везикул в процессе трансмембранного переноса и интернализации молекул ДНК в клетки печени мы изолировали клатрин-содержащие везикулы из клеток печени через 45 мин после внутривенной инъекции 100 мкг ДНК в составе РН.

Гель-электрофорез белков выделенных эндоцитарных везикул показал, что они содержат белок клатрин с М.в. 180×10^3 и $33—36\times10^3$ Дальтон, а также белки с М.в. около 110×10^3 и $50—55\times10^3$ Дальтон (рис. 4а, см. вклейку).

Вместе с тем в составе выделенных клатрин-содержащих эндоцитарных везикул методом гибридизации с [^{32}P] ДНК pBR322 [15] были идентифицированы интактные молекулы ДНК pBR322.

Полученные данные доказывают, что трансмембранный перенос ДНК и дсРНК в клетки млекопитающих может осуществляться по механизму рецептор-обусловленного эндоцитоза.

Ранее нами было показано, что молекулы РНК и ДНК, взаимодействуя с плазматической мембраной клетки, индуцируют трансмембранный сигнал, сопровождающийся поступлением в клетку Ca^{2+} с последующей активацией фосфолипазы A_2, накоплением в мембране лизоформ фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот и повышением подвижности в липидном бислое мембраны [10, 15].

Очевидно, что индуцированные изменения способствуют кластеризации на поверхности клетки полинуклеотид-связывающих белков, кепированию лиганда-полинуклеотида на плазматической мембране и, в конечном итоге, формированию клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования мембран (Под ред. Э. Медди), 49—50, М., 1979
2. *Габриелян Л. Г., Аракелян Л. Г., Захарян Р. А.* Докл. АН СССР, *398*, 5, 1250—1253, 1988.
3. *Захарян Р. А., Карагезян К. С.* В сб. Структура и фракция белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI Двустороннего симп. СССР—Франция, 132, 1982.
4. *Захарян Р. А., Бакунц К. А., Скобелева Н. А.* Нейрохимия, *8*, 1, 34—38, 1989.
5. *Захарян Р. А., Галстян Г. Г., Геворкян Н. Р., Галстян М. Г., Алиханова Л. М.* Биополимеры и клетки, *4*, 1, 48—53, 1988.
6. European meeting on bacterial transformation and transfection IV (abst.), Lisbon, 1982.
7. *Gabor G., Bennett R. M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *122*, 3, 1034—1039, 1984.
8. *Gustersen E., Morland V.* Anal. Biochem., *108*, 76—82, 1980.

9. *Gorman C. M., Howard B. N.* Nucleic Acids Research, *11*, 21, 7631—7648, 198
10. *Karageuzyan K. G., Zakharian R. A., Bakuntz K. A., Ovakimian S. S.* Guiss pe Porcellati Foundation International Meeting on Neurochem. Aspects of Ph spholipid Metab., May 26—28, Perygia, Italy, 66, 1988.
11. *Loyter A., Scangos G., Yuricek D., Keene D., F. H. Ruddle.* Experimental Ce Research, *139*, 223—234, 1982.
12. *Nandi P. K., Legrand A., Nicolau C.* The J. of Biological Chemistry, *261*, 3 16722—16726, 1986.
13. *Southern E. M*, J. Mol. Biol., *98*, 3, 503—517, 1975.
14. *Willingham M. C., Postan I.* Intern. Rev. of Gytology, *92*, 51—85, 1984.
15. *Zakharian R., Karageuzyan K., Ovakimian S.* ISF—JOCS World Congress, Se 26—30, Tokyo, *3*, P12, 357, 1988.

Поступило 26.VI 1989 г

Биолог. ж. Армении, № 9—10,(42),1989 УДК 597:591.5

БИОАКУСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОЗЕРНЫХ ЛЯГУШЕК (*RANIDAE: RANA RIDIBUNDA*) В АРМЕНИИ КАК ВКЛАД В ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОСТОЧНОЙ ФОРМЫ

ГАНС ШНЕЙДЕР, Э. М. ЕГИАЗАРЯН*

*Боннский университет, ФРГ,
Ереванский государственный университет, кафедра зоологии

На основании результатов биоакустических исследований делается вывод, что лягушка *R. ridibunda*, обитающая в Армении, принадлежит к восточной форме, которая распространена по всей Малой Азии.

Կենսաակուստիկական ուսումնասիրությունների արդյունքների հիման վրա եզրակացություն է արվում, որ Հայաստանում բնակվող R. ridibunda գորտը պատկանում է արևելյան տիպին, որը տարածված է Փոքր Ասիայում։

In a lake near Yerevan ca 1200 m above sea level the lake frogs were in the main spawning phase during the second half of April. At the same time they were only in the prespawning phase in Lake Sevan which is about 1900 m above sea level. Mating calls were recorded in the range from 13 to 24.6° water temperature. Many call parameters are correlated with temperature. According to the structure of the mating calls the lake frogs in Armenia represent the eastern form which has already been found in Israel, western Turkey and in the delta of the Nile. However, there are differences demonstrating that the lake frogs in Armenia are more closely related to the lake frogs in western Turkey than to those in Israel and the Nile delta.

Фауна Армении—лягушка озерная Rana ridibunda—биоакустические параметры.

Результаты недавно проведенных биоакустических исследований *Rana ridibunda* свидетельствуют о том, что лягушки, которые до сих пор от-

* Директор Института зоологии, профессор.