

ВЗАМОДЕЙСТВИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ТИМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ДНК

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Н. А. ГУКАСЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Исследование методом дифференциальных кривых плавления структурные изменения ДНК в комплексе с 4 различными белками выявили неодинаковый эффект белков на параметры плавления ДНК. Наблюдалась корреляция между содержанием ароматических аминокислот в белке и стабилизирующим действием белка на ДНК. Предполагается, что взаимодействие происходит по интеркаляционному механизму.

Կիրառված դիֆերենցիալ լուծման կորերի մեթոդը թույլ է տվել եզրակացնել ԳնՔ-ի կառուցվածքի փոփոխությունների մասին՝ առաջված չորս ստրբեր սպիտակուցների հետ կոմպլեքսավորման ընթացքում: Սպիտակուցներից յուրաքանչյուրը յուրովի է ներգործում ԳնՔ-ի լուծման պարամետրերի վրա: Ի՛նչպես է դադիս կոռելյացիա սպիտակուցի արամատիկ ամինաթթուների քաղաղության և ԳնՔ-ի պարույրը կայունացնող նրա ազդեցության միջև, ենթադրվում է սպիտակուց—ԳնՔ փոխազդեցության ինտերկալացիոն մեխանիզմի գոյությունը:

The structural alterations of DNA in the complexes with four different proteins were studied using the differential melting curves. The effect of these four proteins on the DNA melting parameters was different. A correlation was observed between the aromatic amino acids contents in the protein and the protein stabilizing action on DNA. It was suggested that the interaction took place using the intercalating mechanism.

Белки плазматической мембраны — ДНК — комплексы — дифференциальные кривые плавления.

Механизм транслокации полвэлектродитной молекулы ДНК через гидрофобный липидно-белковый бислой клеточной мембраны изучен недостаточно. В основном исследованы движущие силы процесса переноса ДНК через поверхностную мембрану прокариотических клеток [6], взаимодействие ДНК с искусственным липидным бислоем [1]. Проникновение молекул ДНК в клетку и последующая экспрессия наиболее эффективны при предварительном заключении ДНК в липосомы, внутри которых она защищена от нуклеаз и сохраняет свою биологическую активность [1]. Возможен и прямой путь проникновения ДНК через мембрану цитоплазму клетки. Участки связывания ДНК находятся на плазматической мембране клеток [11]. Имеются данные, свидетельствующие о важной роли ДНК-связывающихся белков плазматических мембран [5, 8, 13] в процессах трансмембранного перехода ДНК. Од-

нако почти ничего не известно об особенностях комплексообразования ДНК-связывающихся мембранных белков с ДНК, о структурных изменениях последней в комплексе с этими белками [2, 8].

Нами изучались некоторые свойства ДНК в комплексе с ДНК-связывающимися белками клеток тимуса крупного рогатого скота.

Материал и методы. ДНК тимуса теленка фирмы «Сигма» использовали после 3-кратной фенольной депротеинизации. ДНК плазмиды рАО3 [12] с молекулярной массой $1,1 \times 10^6$ Д была переведена в линейную, пригодную для плавления форму, рестриктазой EcoRI. Перед плавлением ДНК переводили в буфер $0,1 \times \text{SSC}$ саль-фитратной на сефарозе 4В.

Плазматические мембраны из тимуса крупного рогатого скота были выделены по описанной методике [9]. Белки плазматических мембран получали методом солиubilизации тритоном X-100 и последующей аффинной хроматографией на колонках АЭ-целлюлоза-натрия (или денатурированную) ДНК тимуса теленка [7]. Элюирующий буфер (рН 7,5) содержал 0,5 или 1 М NaCl. Элюаты были плавленными и лиофилизваны, затем растворены в 200 μ л $0,1 \times \text{SSC}$ и фракционированы на колонке с сефарилем S 300 с помощью микрокolumnного жидкостного хроматографа «Обь».

Методом электрофореза в ПААГ с маркерными белками по Демизил [10] были оценены молекулярные массы полученных белков. На спектрофотометре «Сресол М-40» получены спектральные характеристики белков. Комплексы готовили смешиванием растворов ДНК и белка (в весовой пропорции 1:10) непосредственно перед плавлением.

Дифференциальные кривые плавления ДНК ДНК и их комплексов с белками получены на спектрофотометре «Сару-219» с термодетектором. Скорость нагрева $0,4^\circ/\text{мин}$.

Кривые, записанные на перфоленту, дифференцировали на ЭВМ «Неквир 226» с использованием программы DCF-K («Бейск»).

Результаты и обсуждение. При фракционировании на хроматографе «Обь» по молекулярным массам и спектральным свойствам из тотального ДНК-связывающегося белка плазматических мембран было получено 4 белка [1] с молекулярными массами: I—51.000, II—42.000, III—38.000, IV—25.000 Д и максимумами УФ-поглощения: II—при 260, III—при 270, IV—при 275 нм.

Для оценки влияния каждого из белков на параметры плавления ДНК было проведено плавление ДНК тимуса теленка в присутствии этих белков. Как видно на рис. 1, белок I проявляет заметный эффект

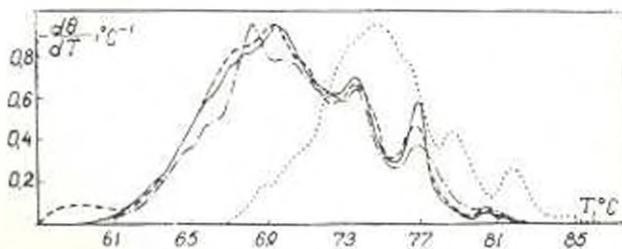


Рис. 1. Нормированная дифференциальная кривая плавления ДНК тимуса в $0,1 \times \text{SSC}$ без белка I (—) и в присутствии 10 весовых долей белков II (.....), III (— · — ·), IV (· · · · ·).

предплавления, не изменяя самой ДНК ДНК тимуса. Белок II, деформируя ДНК, в заметным изменением параметров плавления также не приводит. Белок III, сужая кривую плавления, сдвигает ее вправо, вызывая значительное увеличение термостабильности ДНК.

Для более детального изучения особенностей комплексобразования этих белков с ДНК были получены ДКП ДНК рАОЗ в линейной форме. Как известно, ДКП этой ДНК имеет два сильно разнесенных по температуре пика, отвечающих выделению АТ-обогатенных и GC-богатых участков. Как показали полученные результаты, белки I и II практически не влияют на ДКП рАОЗ. Заметим, что эффект предплавления I белка наблюдается и в этом случае. Белок III, а еще больше белок IV (рис. 2, 3) приводят к сдвигу ДКП вправо и некоторому суже-

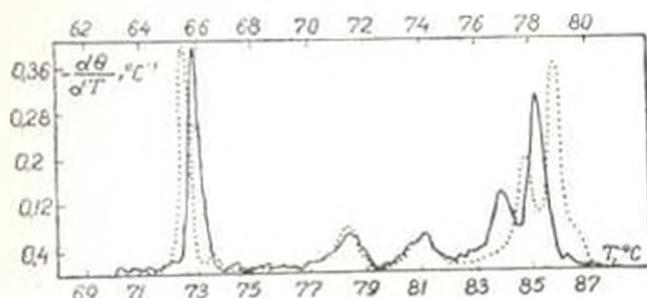


Рис. 2. Нормированная ДКП ДНК рАОЗ без белка (—) и в присутствии белка III (.....).

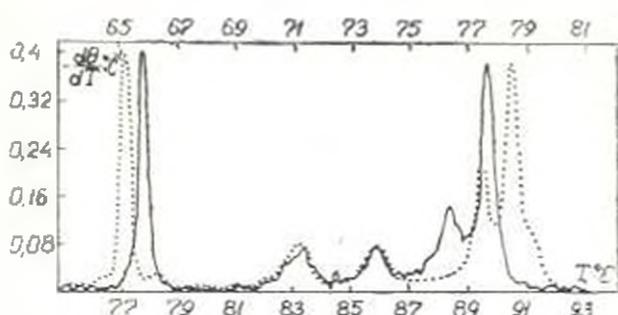


Рис. 3. Нормированная ДКП ДНК рАОЗ без белка (—) и с белком IV (.....).

ние кривой плавления (сближению пиков). Таким образом, белки III и IV являются стабилизаторами ДНК. Однако заметной специфичности к АТ- или GC-парам не обладают. Это отличает их от белка-стабилизатора плазматической мембраны печени крысы, для которого нами была обнаружена АТ-специфичность [2]. Кроме того, мембранный белок-стабилизатор печени крысы получался лишь при элюции с нативной ДНК-целлюлозной колонки, но не с денатурированной [3]. А мембранные белки, получаемые из тимуса крупного рогатого скота, выделяются при элюции как с нативной, так и с денатурированной ДНК-целлюлозных колонок. Различаются лишь относительные количества разных белков [4].

Отметим также лучшую реассоциацию после денатурации ДНК, если плавление происходило в присутствии белков III и IV. Разумеется, любые факторы, стабилизирующие ДНК, имеют неспецифическим своим выражением сдвиг кривой плавления вправо, сужение ее и лучшую реассоциацию ДНК при охлаждении. Однако в данном случае су-

шествует корреляция между сдвигом максимума поглощения белка вправо, происходящим при увеличении содержания ароматических аминокислот в белке [14], и стабилизирующим действием белка. Можно предположить, что стабилизация структуры ДНК происходит по интеркаляционному механизму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бубкер В. М., Соколов А. Р., Вайкер Л. М., Крайнов А. Г. Биол. мембраны, 4, 1, 55, 1987.
2. Габриелян З. Г., Аракелян А. Г., Захарян Р. А. Докл. АН СССР, 298, 3, 1250, 1986.
3. Габриелян А. Г., Аракелян А. Г., Захарян Р. А. Докл. АН АрмССР, 85, 4, 177, 1987.
4. Габриелян А. Г., Гукисян Н. А., Захарян Р. А. Докл. АН АрмССР, 89, 5, 1986.
5. Габриелян А. Г., Карагезян К. С., Захарян Р. А. В сб.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии, 10. Ереван, 1983.
6. Гриню. Э. -Т Транспорт макромолекул у бактерий. М., 1986.
7. Рожиков В. В., Старостина В. К. Биотехнология, 3, 5, 618, 1987.
8. Sabat G., Benoit R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 3, 1034, 1984.
9. Datta H. Biochem. Biophys. Acta, 291, 93, 1973.
10. Linnit L. K. Nature, 227, 620, 1970.
11. Okthum A., Szuzi S., Antoni F. Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 14, 3, 165, 1969.
12. Oka A., Nomura Y., Morita M. et al. Molec. Gen. Genet., 172, 151, 1979.
13. 5th European meeting on bacterial transformation and transfection (Abstr), Lisbon, 1982.
14. Wolf P. Anal. Biochemistry, 129, 145, 1983.

Получено 9 VI 1989 г.

Биол. журн. Армении, №2(43) 1990

УДК 577.150.3+577.150.36+577.150.4

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЗОФИЛЬНЫХ И ТЕРМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЕЙ *CANDIDA MALTOSA* ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ И ЭТАНОЛЬНОМ СТРЕССЕ

Е. С. СИНАНЯН, М. А. ДАВТЯН, Е. Р. ДАВИДОВ

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Выявлена повышенная чувствительность к этанолу мезофильного штамма дрожжей *Candida maltosa* по сравнению с термофильным мутантом, который оказался жизнеспособным как в условиях термошока, так и при наличии высоких концентраций этанола в среде. Показано, что воздействие высокой температуры и этанола приводит к активации системы протеолиза у термотолерантного штамма дрожжей, в то время как у его дикокого предшественника в аналогичных условиях она снижалась.

Հայտնաբերվել է (մանրի) նկատմամբ զգալիության բարձրացում *Candida maltosa* խմորաբանական մեղրիի տեսակի մոտ ջերմափայուն տեսակի նամեմատու-րիանքի՝ ջերմության բարձրացման և թվ՝ էթանոլի բարձր կոնցենտրացիոն դեպ-

Сокращения: БТШ—белки термошока.