

Издається с 1946 года
Այստանի քեսաբանакан андес

Խմբագրական կոլեգիա՝ Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Ե. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադջյան, Հ. Գ. Բատիկյան, Ա. Շ. Գալստյան (գլխ. խմբագրի տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Կ. Ս. Մարջանյան (սլաոն. քարտուղար), **Ս. Գ. Մովսիսյան**, Ս. Հ. Մովսիսյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Գ. Ն. Բաբայան, Ս. Ա. Բակունց, Գ. Ս. Դավթյան, Ա. Լ. Թախտաջյան, Պ. Ա. Խուրշուդյան, Ս. Կ. Կարասյեանյան, Ե. Հ. Հասրաբյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չալախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Ե. Տեր-Մինասյան:

ԽՄԲԱԳՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՑՆՆ՝

Երևան—19, Բարեկամության, 24դ, հեռ. 58-01-97

Редакционная коллегия: Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Акопян, Э. К. Африкян (главный редактор), О. Г. Баклаваджян, Г. Г. Батикян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), В. О. Казарян, К. С. Марджанян (ответ. секретарь), **С. Г. Мовсисян**, С. О. Мовсисян.

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. И. Акрамовский, Э. А. Асратян, Э. К. Африкян (пред. совета), Д. Н. Бабалян, С. А. Бакунци, Г. С. Давтян, Л. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осплян, С. А. Погосян, А. Л. Тахтаджян, М. Е. Тер-Минасян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

© Издательство АН Армянской ССР, 1979 г.

АДРЕС РЕДАКЦИИ: 375019, Ереван-19, Барекамутян 24г, тел. 58-01-97.

СИСТЕМА «ООЦИТ—ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ» КАК
МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ И БЕЛКОВ В ПРОЦЕССЕ
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК

Ю. А. МАГАКЯН

На основе собственных цитофотометрических, цитохимических, радиоавтографических и цитоморфологических данных по оогенезу кошенили и обзора литературы по другим насекомым рассматриваются вопросы морфогенеза клеточных элементов политрофной овариолы, синтеза и накопления нуклеиновых кислот и белков и их внутри- и межклеточного транспорта. Показано, что морфогенетические преобразования элементов системы овариолы находятся в тесной связи с гиперрепликацией ДНК в ядрах и синтезом огромных количеств РНК и белка на основе дополнительно кодирующего материала в системе. Указанная система является удобной моделью для изучения процессов синтеза нуклеиновых кислот и белка и механизмов их внутриклеточной и системной регуляции.

Благодаря комплексному применению морфологических, цитохимических и радиоавтографических методов в цитологических исследованиях в последние годы стал возможен функциональный подход к решению ряда проблем клеточной дифференцировки и, в частности, кардинальных вопросов о зависимостях между внутри- и межклеточными уровнями регуляции синтеза нуклеиновых кислот и белков дифференцирующихся клеток и о коррелятивных отношениях между синтетическими и морфогенетическими процессами. В связи с этим все большее значение стал приобретать вопрос о выборе таких модельных клеточных систем, которые, находясь в условиях интегрированной системы регуляций целостного организма, обладали бы определенной «автономностью» внутрипопуляционных (над- и субклеточных) регуляторных механизмов, так как только в этом случае создается реальная возможность с помощью комплексных методов исследования вскрыть указанные механизмы регуляции в относительной независимости от интегративных отношений организма в целом.

Механизмы регуляции синтеза нуклеиновых кислот и белков, размножения клеток, их дифференцировки и функциональной специализации, несомненно, сходны для всех клеток, и именно поэтому исследование модельных клеточных систем в развитии представляет общебиологический интерес.

В качестве примера удачного выбора моделей такого рода и изучения их комплексными методами можно привести работы по динамике синтеза нуклеиновых кислот и белков и функциональной активности клеток в системе «нейрон—нейроглия» [19], в популяции дифференци-

рующих нейронов переднего мозга и нейронов Пуркинье мозжечка [15, 18], в гетерогенной популяции гепатоцитов [5], в клетках эритропоэтического ряда [14] и др., в которых удалось вскрыть целый ряд ранее неизвестных закономерностей поведения конкретных групп клеток, входящих в более сложные системы тесно взаимосвязанных одна с другой клеточных популяций при нормальном их развитии, в условиях эксперимента и в патологии.

Несомненный интерес представляет также изучение дифференцирующихся и интенсивно растущих клеток, входящих в систему развивающегося фолликула яичника с политрофным строением овариол, при котором, как известно, в становлении организации зрелого яйца участвуют вспомогательные клетки—трофоциты и фолликулярные клетки. Эта система, как и описанные выше, в силу некоторой «обособленности» от воздействия надсистемных механизмов регуляции является удобной моделью для исследования процессов дифференцировки и функциональной специализации клеток на различных уровнях ее организации—молекулярном, субклеточном, клеточном и популяционном [1, 16, 17, 21].

Изучение этой системы тесно взаимосвязанных клеток важно еще и потому, что оно позволяет помимо общих проблем клеточной дифференцировки подойти к решению ряда частных проблем оогенеза таких, как формирование зрелого яйца, что невозможно без раскрытия механизмов гигантского роста ооцита, обусловленного накоплением в ооплазме большого количества р-РНК и желтка, предназначенных для обеспечения развития будущего зародыша.

В результате проведенных к настоящему времени исследований годов с политрофной структурой овариол различных видов животных, главным образом насекомых, накоплен большой фактический материал, позволяющий осмыслить многие аспекты структуры и функции всех элементов этой системы (см. обзоры: Айзенштадт [1] и Грузовой [9]). Многочисленные данные, характеризующие различные стороны развития и функционирования ооцита и вспомогательных клеток у араратской кошенили—насекомого, также имеющего политрофную структуру овариол, получены в нашей лаборатории при помощи методов цитоморфологии, цитоспектрофотометрии и радиоавтографии.

Основной целью настоящего сообщения является: обобщить сведения, характеризующие изменения в структуре и взаимодействии клеточных элементов, образующих политрофную овариолу, в процессе оогенеза и, используя системный подход, представить это сообщество клеток в качестве модели для изучения синтеза нуклеиновых кислот и белков в процессах дифференцировки и морфогенеза.

В начале обзора мы сочли необходимым кратко изложить события, происходящие в период формирования политрофной овариолы, и дать общую схему роста ооцитов с указанием основных характерных изменений в морфологии ядрышко-ядерного аппарата ооцита и вспомогательных клеток овариолы, главным образом, на примере оогенеза кошенили.

Морфогенез политрофной овариолы и ее клеточных элементов. Собственно оогенез начинается с оогониальных делений, принципиальная схема которых вплоть до появления вторичных голий одинакова как для оо-, так и для сперматогенеза [20]. Первичные оогонии проходят серию последовательных делений (у разных животных их число различно [9], у кошенили оно равно 4 [17]) и переходят во вторичные оогонии. По данным цитофотометрии и радиоавтографии, во вторичных голиях в предмейотической интерфазе удваивается количество ДНК, и они вступают в мейоз с тетраплоидным количеством ДНК при диплоидном числе хромосом [67]. В политрофных овариолах насекомых в гермариин (у кошенили в яйцевой камере [17]) вторичные оогонии также делятся от одного до нескольких раз (у кошенили они проходят последний—4-й тур [17, 21]), в результате чего возникает группа связанных между собой цитоплазматическими мостиками клеток (у кошенили 16). В ходе этих делений определяются протрофциты и прооциты (14 и 2 у кошенили). В дальнейшем один из прооцитов становится истинным ооцитом, а другой—трофоцитом или подвергается резорбции [6, 21]. Кинг с соавт. [33, 49], используя метод серийной реконструкции ультратонких срезов, показали, что в результате дифференцирующих митозов в прооциты превращаются клетки, имеющие наибольшее число цитоплазматических мостиков. Они вступают в мейоз и формируют синаптонемальный комплекс между конъюгирующими хромосомами. В остальных клетках—трофоцитах—начинается эндомитотическая репликация хромосом, в результате чего они полиплоидизируются [9, 16, 21]. У некоторых насекомых, в том числе и у кошенили, все клетки (как ооцит, так и будущие трофоциты) синхронно проходят ранние стадии профазы мейоза, достигая пахитенной или диплотенной (у кошенили) стадий. В будущем ооците эти стадии протекают намного медленней, чем в трофоцитах, в которых хромосомы быстро спирализуются и образуют короткие тетрады [12, 17], после этого трофоциты вступают в эндомитоз [9, 21]. У некоторых насекомых расхождение путей дифференцировки трофоцитов и ооцита наступает еще раньше—на стадии зиготены [12].

Таким образом, расхождение путей развития ооцитов и трофоцитов начинается у различных насекомых на разных стадиях конъюгации хромосом, которая завершается лишь в ооцитах. Цитогенетические и химические факторы дивергенции путей дифференцировки трофоцитов и ооцитов еще не полностью выяснены. Имеющиеся сведения будут рассмотрены в следующем разделе.

Описанные процессы происходят в период так называемого малого роста ооцита (генеративной фазы). На диплотенной стадии ооциты вступают в период большого роста (вегетативную фазу), который можно назвать также фолликулярным периодом, так как именно с этого времени овариолы приобретают специфические черты строения, свойственные тому или иному типу мероистических (наличие трофоцитов) овариол [9, 12, 21]. Этот период подразделяется на несколько стадий

ду кошенили 5). В первую половину этого периода происходит интенсивный рост ядра и цитоплазмы ооцита (цитоплазматический рост), во вторую—осуществляется процесс вителлогенеза (трофоплазматический рост) [9, 17, 21]. У многих насекомых с политрофным строением овариол в это время хромосомы и ядрышки в ядре ооцита объединяются в единый комплекс—кариосферу. В конце периода большого роста хромосомы сильно укорачиваются, уплотняются. Наступает стадия диакинеза, после которой ядро разрушается, и хромосомы образуют метафазную пластинку I деления созревания [9, 17, 71]. У кошенили ядро ооцита долгое время сохраняет признаки высокой активности и почти до самого окончания вителлогенеза содержит одно или несколько активных ядрышек [17, 21]. Высокую активность проявляют также трофоциты [21]. Этим политрофная овариола кошенили существенно отличается от овариол других насекомых, имеющих политрофное строение. Появление и длительное функционирование интенсивно развитого ядрышкового аппарата в ядре ооцита характерно для ооцитов, не имеющих специализированных питающих клеток—трофоцитов (солитарный и фолликулярный типы оогенеза). Там же, где имеются трофоциты, ядрышки в ядре ооцита либо вообще отсутствуют, либо чаще всего функционируют короткое время, а хромосомы рано формируют кариосферу [8]. Для нескольких видов жуков-сильфид, имеющих политрофные овариолы, показано, что кариосфера активно включает ^3H -уридин, множественные же ядрышки, находящиеся в тесном контакте с капсулой кариосферы и имеющие базофильную природу, метку не включают и, следовательно, не являются истинными ядрышками. Они содержат много РНК-, так как не выявляются после обработки срезов РНК-азой [53]. Описанная картина характерна для нутриментарного типа оогенеза. Кошениль по этим показателям занимает, таким образом, промежуточное положение между указанными типами оогенеза, что обуславливает еще больший интерес к ее исследованию. Следует отметить, что наличие ряда промежуточных форм и отклонений мы находим и у некоторых других насекомых [9].

Таковы, в общих чертах, основные характерные изменения в морфологии ооцита в процессе развития политрофной овариолы. Немаловажную роль в этом процессе, как уже указывалось, играют трофоциты, которые также претерпевают существенные изменения в период большого роста ооцита. У большинства насекомых с политрофным строением овариол их функция в это время значительно интенсифицируется, как правило, за счет полиплоидизации всего хромосомного набора и нередко независимой селективной репликации районов ядрышкового организатора [68—71]. Аналогичные преобразования происходят и в ядрах трофоцитов кошенили [16, 21]. Своеобразную форму приобретают эти процессы в трофоцитах яблонной плодовой гни, где развивается сферическое тельце ДНК в результате эндомитотической репликации XY-бивалента и, возможно, амплификации района ядрышкового

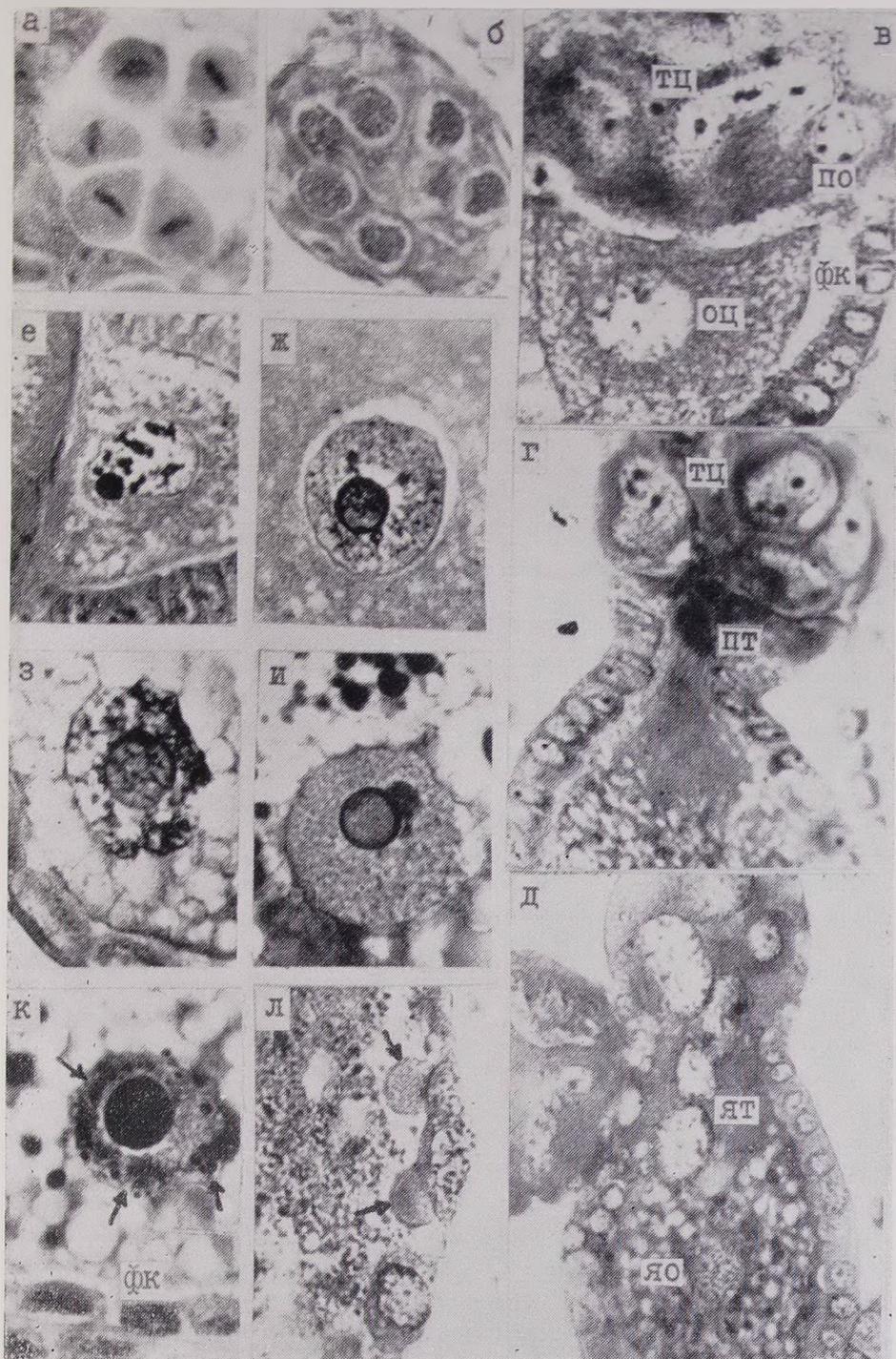


Рис. 1.

Рис. 1. Изменения в цитоморфологии ооцита и вспомогательных клеток в процессе развития политрофией овариолы кошенили а—последний (4-й) тур размножения ооцитов в шесте; б—эндомитоз в ядрах протрофоцитов; в—интенсивно окрашивающиеся ядрышки трофоцитов (тц); ядро ооцита (оц) на стадии диплолены; дегенерирующий проооцит II (по) в питающей камере; фолликулярные клетки (фк) окружают ооцит; г—максимальная функция трофоцитов (тц); вещества базофильной природы поступают по питающему тяжу (пт) в ооплазму; д—«выброс» ядер трофоцитов (ят) в ооплазму; ядро ооцита (юо) отличается по окраске от (ят); е-к—последовательные этапы изменений ядра ооцита в пре- и вителлогенезе; увеличение размеров ядрышка (е-з) и его почкование (п); множественные ядрышкоподобные образования по периферии ядра ооцита (стрелки); эндомитоз в ядрах фолликулярных клеток (фк); л—цитоплазматические «выбросы» из фолликулярных клеток в сторону ооплазмы (стрелки). Окраска: а, д—азаном по Гейденганну; б—фуксином по Фельгену; в, к—фуксином по Фельгену и железным гематоксилином; г, е-п, л—железным гематоксилином. Увеличение: а, б—об. 100×, ок. 12,5×; в, е-л—об. 100×, ок. 8×; г—об. 50×, ок. 8×; д—об. 25×, ок. 12,5×.

организатора, связанного с этим бивалентом. Не исключено, что это тело функционирует как гигантский ядрышковый организатор, в результате фрагментации которого в ядрах трофоцитов возникают (в том числе и у кошенили) множественные сложные ядрышки [7, 17, 21]. У некоторых насекомых, например у золотоглазки, в ядрах трофоцитов не обнаруживается высокой степени полиплоидизации и количество ДНК в них возрастает за счет селективной редупликации в районах ядрышковых организаторов. В ядрах же ооцитов развивается гигантский нуклеолярный аппарат [6, 10, 11]. Следует отметить, что степень полиплоидизации трофоцитов зависит не только от степени и продолжительности активации ядра ооцита, но и от числа их, приходящегося на один ооцит. Так, у улитковой пиявки, в яичнике которой на каждый ооцит приходится около 2000 питающих клеток, последние не полиплоидизируются [3].

Достигнув максимума в развитии к середине периода большого роста (у кошенили к 4-й стадии), трофоциты затем резко снижают уровень синтезирующей активности и быстро дегенерируют [17, 21].

Таким образом, систему «трофоциты—ооцит» можно рассматривать как бинарную, функции одного из элементов которой находятся в четкой зависимости от степени выраженности функциональной активности другого.

Картина морфогенеза политрофной овариолы была бы неполной без описания морфологических изменений фолликулярных клеток, окружающих ооцит почти с самого начала его развития и являющихся важным клеточным барьером между ооцитом и окружающей средой. Эти клетки дифференцируются из клеток мезодермального эпителия, окружающих группу цистоцитов (будущих трофо- и ооцитов) с самого начала развития овариолы. У кошенили фолликулярные клетки размножаются в «зоне митозов»—в области эпителиальной перегородки, отделяющей трофоциты от ооцита [17, 21]. По мере роста ооцита они выталкиваются в стенку фолликула и постепенно увеличиваются в размерах. При этом образуется определенный градиент увеличения их размеров от апикального к базальному полюсу фолликула. В ядрах этих клеток наблюдается эндомитотическая репликация хромосомного набора, которая приводит к их полиплоидизации [1, 16, 17]. С момента их формирования (к началу периода большого роста ооцита) вплоть до завершения оогенеза они проявляют признаки высокой функциональной активности, выражающиеся в наличии интенсивно окрашивающихся ядрышек и базофильной цитоплазмы [17, 21]. К концу оогенеза фолликулярные клетки образуют хорион, окружающий ооцит, что является, бесспорно, результатом их деятельности. Что касается их участия в питании ооцита, то в этом вопросе нет единого мнения. В ранних работах авторы придерживались мнения, что из фолликулярных клеток в ооцит переходят нуклеиновые кислоты [67], более поздние электронномикроскопические исследования показали, что между фолликулярными клетками и ооцитом цитоплазматические мостики не об-

разуются [1]. Правда в одной из последних работ установлено, что в ооците прямокрылых на стадии вителлогенеза образуются микроворсинки и многочисленные пиноцитозные пузырьки. Наблюдается образование микроворсинок и в фолликулярных клетках [40]. Вместе с тем обнаружено, что у дрозофилы на стадиях пре- и вителлогенеза формируются цитоплазматические мостики между фолликулярными клетками, причем строение этих мостиков не отличается от строения мостиков между трофоцитами и ооцитом [39]. В то же время наши исследования на кошенили (на уровне световой микроскопии) выявили образование своего рода «цитоплазматических выбросов» из фолликулярных клеток в ооплазму [17, 21]. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Считается тем не менее установленным, что фолликулярные клетки участвуют в транспорте определенных веществ из перифолликулярного пространства в ооплазму и в секретию в пернооцитное пространство гликопротеидов [1, 61]. На этом более подробно мы остановимся в следующих разделах. Так или иначе фолликулярные клетки входят в сообщество клеток, образующих единую систему политрофной овариолы, и их функционирование должно учитываться при анализе системы в целом.

Картина морфогенетических преобразований политрофной овариолы и ее элементов в процессе оогенеза иллюстрируется микрофотографиями, приведенными на рис. 1, на примере развития овариолы кошенили, изучаемого в нашей лаборатории [17, 21], и схемой строения четырех типов развивающихся овариол насекомых (рис. 2).

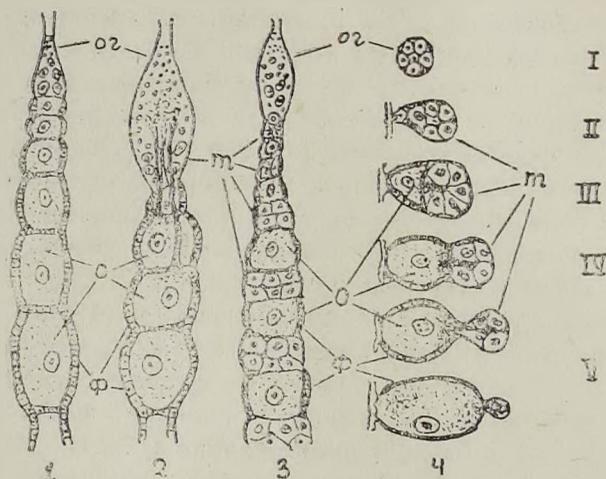


Рис. 2. Типы строения овариол насекомых. 1—паностический; 2—телотрофный; 3—политрофный (по Соколову [20]); 4—«политрофно-фолликулярный» (по терминологии автора), характерен для сем. кокцид, к которому относится кошениль. I—V—стадии развития фолликула. ог—ооциты; т—трофоциты; о—ооциты; ф—фолликулярные клетки.

Представленные материалы свидетельствуют о том, что развитие клеточных элементов системы политрофной овариолы идет по строго

определенным, тесно взаимосвязанным одна с другой и в то же время четко различающимся программам. Последнее находит свое отражение и в характере роста указанных элементов системы (рис. 3), который также резко различается у ооцита, трофоцитов и фолликулярных клеток [21].

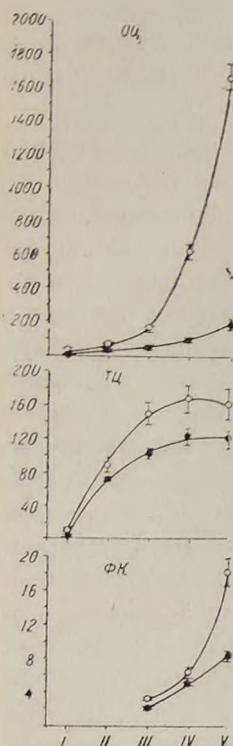


Рис. 3. Увеличение размеров ооцита и вспомогательных клеток кошенили в процессе развития фолликула. По горизонтали: стадии развития. По вертикали: площадь клеток ($\mu\text{м}^2$). оо—ооцит; тц—трофоцит; фк—фолликулярная клетка. Светлые кружки—цитоплазма, темные—ядро.

Очевидно, что в основе морфогенетических и морфометрических различий между элементами системы, как и в основе возрастных изменений в морфогенезе ооцита, трофоцитов и фолликулярных клеток лежат специфические различия и изменения в метаболизме нуклеиновых кислот, белков и других соединений и в ультраструктуре этих клеток, которые будут рассмотрены в последующих разделах.

Метаболизм нуклеиновых кислот. Из кривых рис. 3 и из литературных данных [2, 23, 48, 85] следует, что объем ооцита в процессе оогенеза увеличивается во много десятков, а нередко и сотен раз; у кошенили, в частности, в 130 раз [21]. Объем вспомогательных клеток также увеличивается, однако в гораздо меньших масштабах (рис. 3) [21]. Возрастное увеличение размеров ооцита происходит, главным образом, за счет увеличения объема оплазмы, в которой накапливается огромное количество РНК и желтка [1, 21]. Синтез большого количества РНК, белков и других запасных веществ желтка предполагает значительное увеличение количества кодирующего их синтез материала, что лишь частично может быть компенсировано возрастанием скорости процессов транскрипции и трансляции [32]. В основном же у большин-

ства животных происходит многократное увеличение количества ДНК в системе. Именно в системе, так как нарабатывание «дополнительного» количества ДНК может быть обеспечено ее гиперрепликацией как в ядре ооцита (амплификация рДНК, гиперрепликация районов ядрышкового организатора), так и в ядрах трофоцитов (многократная редупликация всего генома в результате эндомиоза, гиперрепликация отдельных районов генома) [9, 16, 34, 81]. Нередко в политрофных овариолах один из указанных путей гиперрепликации ДНК сменяется или дополняется другим [9, 11, 16].

Так, в предыдущем разделе уже отмечалось, что ооциты вступают в мейоз с тетраплоидным содержанием ДНК и весь последующий период дифференцировки и морфо-функциональной специализации его протекает на фоне удвоенного количества ДНК. Этот факт сам по себе заслуживает пристального внимания, так как свидетельствует о наличии в клетках некоего механизма задержки их в постсинтетическом периоде, позволяющем в известных условиях обеспечивать высокую интенсивность синтетических процессов за счет временного удвоения количества ДНК в ядрах. Этот механизм, скорее всего, не является уникальным, так как подобные явления обнаружены и в различных соматических клетках в норме [15] и при некоторых воздействиях биологически активными веществами [14]. Помимо этого, у ряда животных в оогенезе функционирует экстрахромосомная ДНК, которая в виде плотного тельца присутствует уже на лептотенной стадии, а на пахитенной стадии, как правило, наблюдается вспышка синтеза этой ДНК, тельце значительно увеличивается в размерах и интенсивно включает ^3H -тимидин. После этого образуются хромосомы «ламповые щетки» и экстра-ДНК диспергируется по ядру [8, 9]. Эта ДНК представляет собой амплифицированные участки рибосомных цистронов, отделенных от хромосом и обеспечивающих синтез необычайно больших количеств рибосомной РНК. Гиперрепликация ДНК такого типа обнаружена в ооцитах многих насекомых и у амфибий [9, 28, 37]. В частности, содержание избыточного количества рДНК убедительно показано методом гибридизации ^3H -рРНК с пахитенными хромосомами ооцита домового сверчка *in situ* [34, 81]. Следует отметить, что при радиоавтографическом обнаружении синтеза ДНК в ранних ооцитах речь может идти и о дополнительной репликации минорной фракции ДНК, необходимой для нормального протекания мейоза [75], и просто о запоздалой репликации гетерохроматиновых участков хромосом [50]. Однако в этих случаях интенсивность включения метки намного ниже, чем при амплификации рДНК. Более позднее включение метки, как это обнаружено в нашей лаборатории в ядрах ооцитов кошенили, несомненно свидетельствует о синтезе рДНК (рис. 4). Этот путь умножения кодирующего материала в ядре ооцита свойствен, главным образом, тем овариолам, в которых отсутствуют трофоциты [9]. При наличии же питающих клеток синтеза дополнительной ДНК в ядре ооцита, большей частью, не происходит, или этот процесс длится очень не-

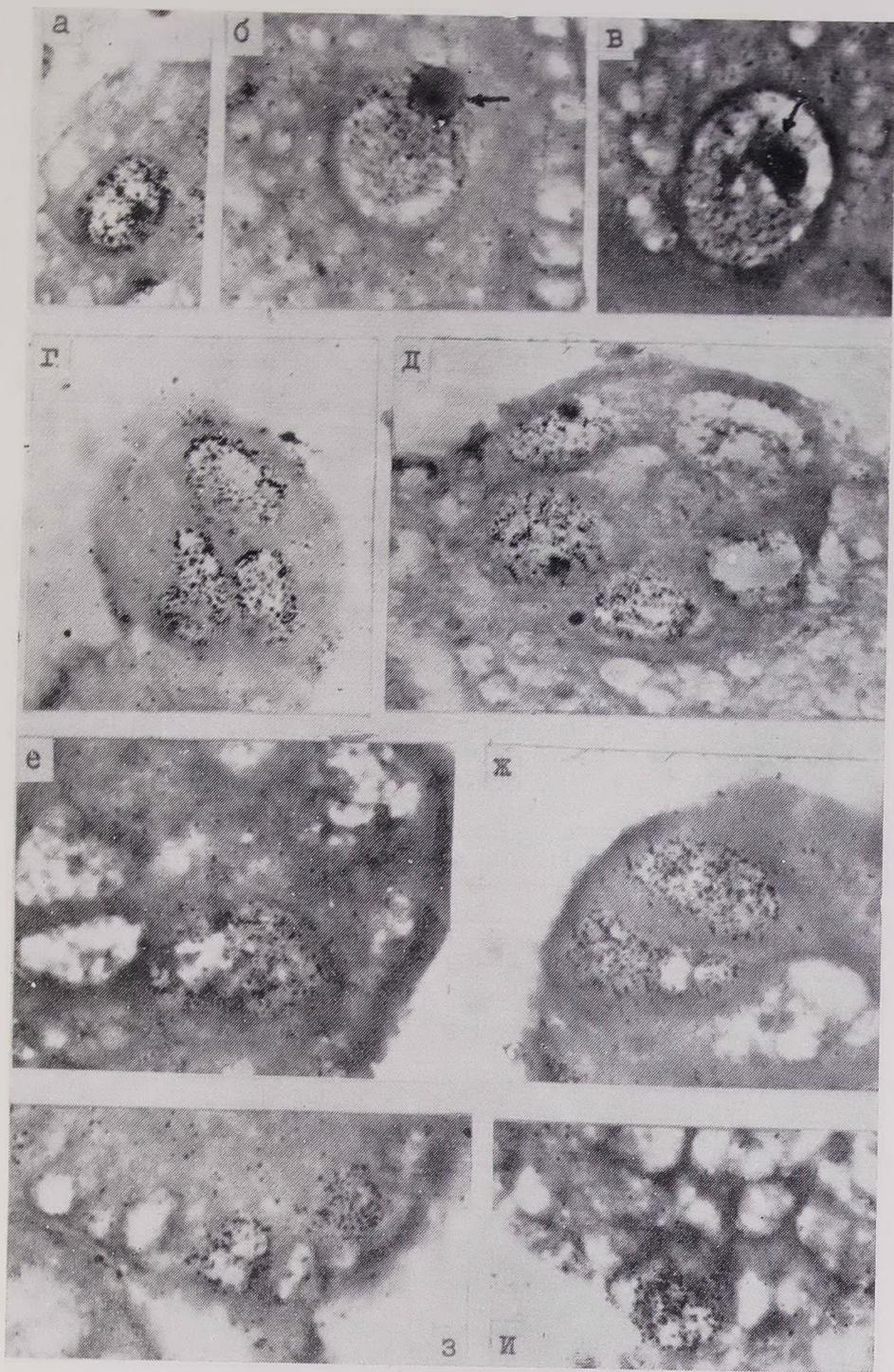


Рис. 4.

Рис. 4. Включение ^3H -тимидиновой метки в ядра ооцита и вспомогательных клеток в процессе оогенеза у кошениль. а, б, в—ядро ооцита на I, III и IV стадиях развития фолликула соответственно; интенсивное включение метки в зоне ядрышка (стрелки). г-ж—ядра трофоцитов на II, III, IV и V стадиях последовательно. з-и—ядра фолликулярных клеток на III и IV стадиях. Условия введения изотопа: а, г—инкубация в течение 1 час., в питательной среде для насекомых С-45 с ^3H -тимидином (конечная концентрация 50 мКи/мл); б, в, д-и—инкубация в течение 16 час. (первые 2 час. с изотопом, а затем в «холодной» среде). Подкраска гематоксилином и эозинем. Увеличение: об. 100 \times , ок. 8 \times .

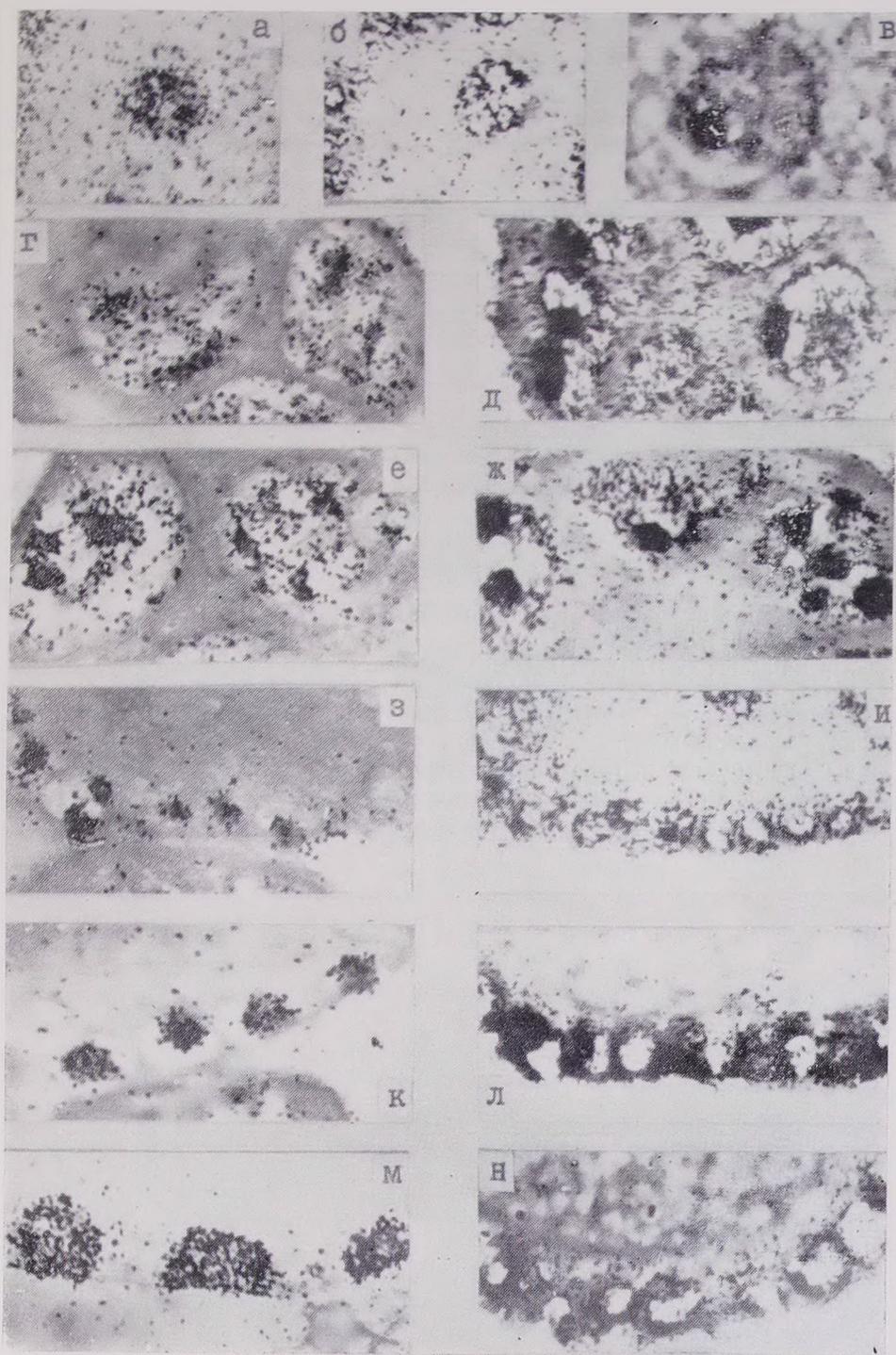


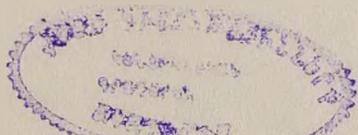
Рис. 5.

Рис. 5. Включение ^3H -уридиновой метки в ооциты и вспомогательные клетки в процессе оогенеза кошенили. а-в—ядро ооцита на III—V стадиях; транспорт меченых частиц из ядра в цитоплазму; интенсивная метка в зоне ядрышек. г, д—ядра трофоцитов на III стадии; интенсивная метка в зоне ядрышек; отсутствие метки в цитоплазме (г) и транспорт меченых частиц в цитоплазму из ядер (д) при кратковременной и длительной инкубации соответственно. е, ж—то же на IV стадии. з-и—ядра фолликулярных клеток на III (з, и), IV (к, л) и V (м, н) стадиях; включение метки только в ядра (з, к, м) при кратковременной и транспорт метки в цитоплазму фолликулярных клеток и в сторону ооплазмы (и, л, н) при длительной инкубациях. Условия введения изотопа: г, е, з, к, м—инкубация 1 час. в С-45 с ^3H -уридином (конечная концентрация 50 мКи/мл); а-в, д, ж, и, л, н—инкубация 16 час. (первые 2 час. с изотопом, а затем в «холодной» среде). Подкраска гематоксилином и эозином. Увеличение: об. 100X, ок. 8X.



продолжительное время на самых ранних стадиях оогенеза [9]. Правда, известны случаи, когда у некоторых насекомых (как и у кошенили) процесс амплификации рДНК происходит не только на ранних стадиях оогенеза, но и позже, в период большого роста ооцитов [9, 38]. Так, в растущих диплотных ооцитах золотоглазки заметный синтез экстрахромосомной ДНК наблюдается до стадии позднего вителлогенеза [9]. Но в большинстве случаев в политрофных овариолах (и вообще в системах с трофоцитами) гиперрепликация ДНК осуществляется в ядрах питающих клеток.

Уже давно известно, что питающие клетки у многих насекомых достигают высокой степени плоидности [60], а объем их ядер увеличивается во много (иногда в сотни и тысячи) раз [49]. Благодаря применению метода цитофотометрии и особенно в сочетании его с радиоавтографией эти данные были уточнены и расширены. Так, исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что в ядрах трофоцитов кошенили количество ДНК в период фолликулярного развития увеличивается в среднем в 17 раз, причем наиболее интенсивно процесс синтеза ее протекает во время завершения малого и начала большого роста ооцитов (увеличение количества в 7,4 раза) (рис. 6). К началу превителлогенеза в этих клетках содержится уже близкое к конечному количество ДНК [16]. Было показано также, что на ранних стадиях (I и II) идет кратная эндоредупликация всего генома трофоцитов, которая впоследствии, а именно к началу интенсивного синтеза РНК и выведения ее в ооплазму, сменяется некротной репликацией отдельных участков генома, вероятнее всего, в районах ядрышковых организаторов до значений 128—256 с [16]. При этом выявлен определенный градиент в распределении питающих клеток по плоидности в питающей камере: ближайшие к ооциту клетки содержат больше ДНК в ядрах, чем остальные. Аналогичное явление было обнаружено ранее на трофоцитах дрозофилы, которые также полиплоидизируются, но клетки, расположенные вблизи ооцита и фолликулярных клеток, претерпевают 8 репликаций ДНК, а отдаленные—7; первые имеют более крупные ядра [31, 45]. На дрозофиле было также установлено, что при полиплоидизации трофоцитов полной редупликацией подвергаются гены, расположенные в эухроматиновых участках, сателлитная же ДНК, которая расположена в гетерохроматиновых участках, недореплицируется и составляет всего 72% от того количества, которое должно было быть достигнуто при полной эндоредупликации всего генома [68—71]. В то же время в ядрах питающих клеток золотоглазки не удалось обнаружить высокой степени плоидности, характерной для других насекомых, количество ДНК в них возрастает только за счет селективной репликации в районах ядрышковых организаторов [11]. Причем недостаточно активное функционирование ядер трофоцитов восполняется работой ядрышкового аппарата самого ооцита [9]. Степень плоидности питающих клеток в овариолах жуков также невысока, однако здесь отмечается большая скорость синтеза РНК в ядрах [32].



Таким образом, одним из способов накопления большого количества рибосом для будущего зародыша является переход функции синтеза рРНК от ядра ооцита к ядрам трофоцитов, достигающих в некоторых случаях высоких классов плоидности. В овариолах кошенили, в отличие от овариол многих других насекомых, параллельно осуществляются оба способа обеспечения синтеза больших количеств рРНК дополнительным количеством кодирующего материала, благодаря чему высокая РНК-синтезирующая активность наблюдается и в ядре ооцита, и в ядрах трофоцитов практически на всем протяжении фолликулярного периода развития ооцита (рис. 4 и 5).

На примере гиперрепликации ДНК и РНК-синтезирующей активности ядер бинарной системы «ооцит—трофоциты» еще более ярко, чем при цитоморфологическом анализе этой системы, выступает ее динамичность как в эволюционном, так и в онтогенетическом аспектах: от доминирующей функции (нередко полностью «взятой на себя») ядер трофоцитов через целую гамму промежуточных способов сочетания функций ядер трофоцитов и ооцита до полного исчезновения первых и максимального проявления ее в ядрах ооцитов. Анализ данных о синтезе РНК у насекомых с разными типами овариол [25, 28, 65] показал, что в мероистических яичниках степень участия ядра ооцита в синтезе РНК может быть различной; у домашней мухи в период активного роста ооцита практически вся РНК синтезируется в ядрах трофоцитов, а панорпа занимает по этому показателю промежуточное положение между насекомыми с паноистическими овариолами (отсутствие питающих клеток) и насекомыми с высокоразвитым мероистическим яичником, например, двукрылыми. У аннелиды ооцит соединен с одним единственным трофоцитом с полиплоидным ядром и наравне с ним синтезирует РНК [72], в телотрофных овариолах клопа [87] и жука [32] синтез РНК также происходит в ядре и ооцита, и трофоцитов. Аналогичное явление, как указывалось выше, наблюдается и в политрофных овариолах кошенили. В то же время в случае солитарного или фолликулярного типов оогенеза вся РНК синтезируется в ядре ооцита, и в этих ядрах амплификация рДНК достигает чрезвычайно высоких степеней, например, у амфибий избыток рДНК доходит до 30-кратных значений [48].

Переход РНК из трофоцитов в ооцит был впервые обнаружен с помощью радиоавтографии в политрофных овариолах мух [26—28], и у панорпы [65, 66]. Позже, также радиоавтографическими методами, было показано перемещение РНК из питающей камеры в ооцит в телотрофных овариолах ряда насекомых [52]. При электронномикроскопическом исследовании трофического тяжа таких овариол в нем была обнаружена высокая концентрация рибосомоподобных частиц [53]. Биохимическими исследованиями изолированных трофических тяжей из овариол клопа удалось показать, что рРНК в них находится в составе стабильных 80S-РНП-частиц, содержащих 18S- и 28S-рРНК [84]. С помощью препаративного центрифугирования и гибридизации нуклеи-

новых кислот было установлено, что амплифицированная ДНК из ядрышек ооцита состоит из повторов, каждый из которых содержит последовательности, кодирующие 18S- и 28S-рРНК, и не транскрибируемый спейсер, функция которого неизвестна [51]. Считываемые участки превышают по длине молекулу рРНК (18S+28S) в два раза [79, 80]. Из сказанного следует, что РНП-частицы, синтезируемые в ядрах трофоцитов и поступающие в ооплазму, и РНП-частицы, синтезируемые в ядре ооцита, практически тождественны.

Наши цитохимические исследования политрофной овариолы кошенили выявили высокую степень базофилии (обусловленной присутствием большого количества РНК) как в питающей камере, так и в прилегающей к ней области ооплазмы, что, по крайней мере, свидетельствует об однотипности химической природы материала цитоплазмы трофоцитов и указанной области ооплазмы [17, 21]. При этом наблюдается отчетливый градиент повышения концентрации базофильных гранул в цитоплазме трофоцитов в сторону ооцита. Наивысшая концентрация базофильных гранул наблюдается в питающем тяжке, идущем от трофоцитов к ооциту (рис. 1). Эти данные говорят о том, что переход РНП-частиц из питающей камеры в ооплазму может осуществляться именно благодаря градиенту их концентрации, более высокому в цитоплазме трофоцитов, чем в ооплазме. О переходе РНК из питающей камеры в ооцит свидетельствует и тот факт, что у шелкопряда-цекропии за несколько дней количество РНК в ооците увеличивается от 0,5 до 2,5 пг, в то время как в трофоцитах, несмотря на ее интенсивный синтез, количество РНК сохраняется на уровне 0,5 пг [1].

В перемещении высокополимерных частиц из трофоцитов в ооплазму немаловажную роль, вероятно, играет разность потенциалов между цитоплазмой трофоцитов и ооплазмой, например, у цекропии она составляет 10 мв. В эксперименте при одновременном измерении потенциалов и введении в питающую камеру меченого флуоресцеином глобулина было показано, что меченый белок транспортируется по питающему тяжку в ооцит. При диаметральной изменении разности потенциалов путем приложения дополнительной ЭДС происходит обратное движение белка из ооцита в трофоцит [86].

Таким образом, транспорт высокомолекулярных соединений из трофоцитов в ооцит, главным образом РНП, можно считать установленным. Между тем это не означает, что из питающих клеток в ооцит перетекает цитоплазма, как считали многие авторы [67]. Сейчас это мнение ставится под сомнение [1], несмотря на то, что некоторые данные последних лет говорят о возможности перехода в ооплазму из трофоцитов таких крупных субклеточных структур как митохондрии: они были обнаружены в трофическом тяжке телотрофных овариол ряда насекомых [44]. Наши исследования на овариолах кошенили выявили многочисленные случаи перемещения целых или частично поврежденных ядер трофоцитов в ооплазму, нередко до 3-х и более ядер (рис. 1). Причем благодаря интенсивно окрашивающимся ядрышкам создается

впечатление, что их высокая функциональная активность сохраняется и в ооплазме. В отличие от описанных в литературе случаев втягивания остатков дегенерирующих питающих клеток в ооплазму к концу оогенеза [82], у кошенили это явление наблюдается в период наиболее активной функции трофоцитов [17, 21]. Имеются сведения о том, что втягивание трофоцитов или фолликулярных клеток в ооплазму, также, впрочем, как и образование множественных ядер ооцита может быть связано с нарушениями в гормональной, т. е. надсистемной, регуляции оогенеза [13]. Так или иначе вопрос о роли проникающих в ооцит трофоцитов требует своего разрешения.

Представляют интерес данные, характеризующие метаболизм нуклеиновых кислот в фолликулярных клетках, хотя вопрос о транспорте РНК и других продуктов их жизнедеятельности в ооцит остается, как указывалось, открытым. Дифференцируясь позже остальных элементов, входящих в систему политрофной овариолы (у кошенили к началу III стадии развития фолликула), эти клетки большей частью полиплоидизируются путем полной эндоредупликации генома и на всем протяжении своего существования проявляют признаки высокой функциональной активности [16, 17, 21]. У кошенили количество ДНК в ядрах фолликулярных клеток увеличивается в значительно меньшей степени, чем в трофоцитах (в среднем в 2 раза). При этом наблюдается отчетливый градиент в распределении клеток в стенке фолликула по классам плоидности, возрастающий по мере удаления от питающей камеры и «зоны размножения» фолликулярных клеток; максимальные значения количеств ДНК в ядрах не превышают 16с [16]. С помощью радиоавтографии показано, что синтез ДНК в фолликулярных клетках идет непрерывно вплоть до завершения оогенеза, однако данные цитофотометрии свидетельствуют о том, что наиболее интенсивное накопление ДНК происходит на III стадии, т. е. во время превителлогенеза (рис. 4 и 6). К началу вителлогенеза, т. е. ко времени проявления наибольшей функциональной активности клеток они содержат близкое к конечному количество ДНК [16].

РНК-синтезирующая активность фолликулярных клеток у кошенили, по данным радиоавтографии, также проявляется в течение всего периода большого роста ооцита, однако наиболее активное включение ^3H -уридина происходит в период вителлогенеза и завершения оогенеза (рис. 6). В это же время меченая РНК интенсивно выводится в цитоплазму фолликулярных клеток и концентрируется, главным образом, в ближайших к ооциту участках (рис. 5). Данные радиоавтографии подтверждаются цитохимическими исследованиями, которые свидетельствуют о концентрации пиронинофильного или базофильного (т. е. РНП-содержащего) материала в указанных участках цитоплазмы фолликулярных клеток (рис. 1 и [1]). Согласно электронномикроскопическим данным, в этих же участках наблюдается концентрация гранулированного эндоплазматического ретикулума [1]. Изложенное, а также наличие в ядрах фолликулярных клеток интенсивно окрашивающих

ся пиронином крупных ядрышек (рис. 1) говорят о том, что в этих клетках идет интенсивный синтез рРНК [16]. Такое активное накопление рРНК в фолликулярных клетках у кошенили и других насекомых

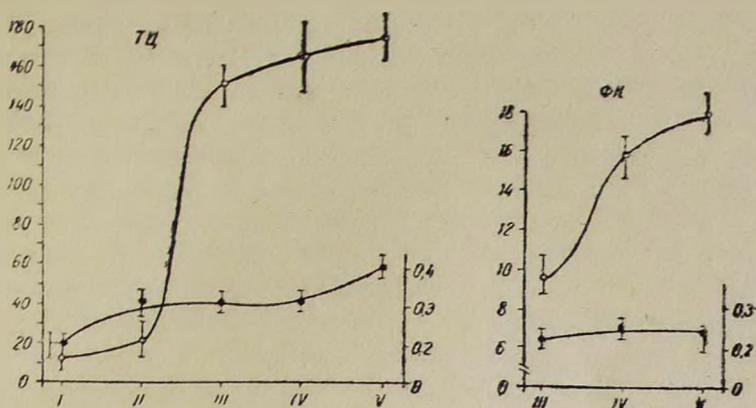


Рис. 6. Динамика содержания и концентрации ДНК в ядрах вспомогательных клеток в оогенезе кошенили. По горизонтали: стадии развития; по вертикали: слева—содержание, справа—концентрация ДНК (услов. ед.). тц—трофобласт; фк—фолликулярные клетки.

не совсем понятно, так как согласно современным представлениям РНП может переходить из клетки в клетку только по цитоплазматическим мостикам [1], отсутствующим, как указывалось в предыдущем разделе, у большинства животных между фолликулярными клетками и ооцитом. С помощью электронной микроскопии цитоплазматические мостики были обнаружены только у ящериц и только между так называемыми грушевидными клетками, располагающимися в стенке фолликула и имеющими оогонимальное происхождение, и ооцитом [29, 42, 43, 57, 59]. В этом случае транспорт рибосомного материала возможен [43].

Оригинальный путь перехода гранул рибосомной природы из фолликулярных клеток в ооцит обнаружен электронномикроскопически у птиц. Концевые отделы фолликулярных клеток у них образуют отростки («трансомы»), проникающие в ооплазму [63]. Внутри ооплазмы они отшнуровываются и образуют многочисленные гранулы, заполненные плотными рибосомоподобными частицами [62, 73]. Однако этот способ транспорта рибосом в ооцит из клеток соматического происхождения выявлен только у птиц и вероятен для некоторых рептилий [64]. Наши радиоавтографические данные (рис. 5) позволяют говорить с недостаточной степенью вероятности о проникновении меченного ^3H -уридином материала из стенки фолликула в ооплазму, что в сочетании с данными цитохимического анализа (см. предыдущий раздел) может свидетельствовать о транспорте РНП-частиц в ооплазму у кошенили. С большей достоверностью об этом можно будет говорить по завершении электронномикроскопических исследований.

Некоторые аспекты белкового метаболизма в развивающемся ооците и вспомогательных клетках в системе политрофной овариолы. Ме-

таболизм белков, углеводно-белковых комплексов и липопротеидов, входящих в состав желточных гранул ооциты (так называемый «белковый желток»), на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей именно в связи с формированием и накоплением огромных запасов желтка в развивающемся ооците. Этому вопросу посвящены многочисленные работы, данные которых подробно анализируются в ряде обзоров (например: [1]). В ходе этих исследований было показано, что желточные белки у большинства животных имеют экзогенное происхождение и поступают в ооцит путем микропиноцитоза, и лишь небольшая их часть синтезируется в самом ооците [1]. Гонады насекомых также не составляют исключения [23, 26, 35 и др.], причем у них основная масса желточных белков синтезируется клетками жирового тела, выводится в гемолимфу и поступает в ооцит по «межклеточникам», образующимся в период большого роста в фолликулярном эпителии [36, 76]. Было установлено также, что основную фракцию экзогенного желточного белка составляет (в том числе и у насекомых [58]) вителлогенин, который, согласно данным, полученным на амфибиях, внедрившись в ооцит, распадается на липовителлин и фосвитин [1, 83 и др.]. Эти белки в свою очередь формируют кристаллический желток [83].

Было показано кроме того, что в процессе вителлогенеза важнейшую роль играет гормональная регуляция. У насекомых, в частности, синтез желточных белков контролируется нейросекреторными клетками мозга, а их проникновение в ооцит — клетками прилежащих тел, секретирующими ювенильный гормон [56, 77]. При этом большое значение имеет избирательная функция фолликулярных клеток, дифференцированно проводящих в ооцит вителлогенин и препятствующих проникновению в ооцит других белков гемолимфы [41]. Механизм этой функции фолликулярных клеток пока не вполне ясен, хотя в литературе имеются сведения о том, что и здесь гормоны играют немаловажную роль [41].

Гораздо меньше внимания уделялось метаболизму эндогенных белков ооциты и цитоплазмы вспомогательных клеток в меростических овариолах и совсем мало сведений о синтезе ядерных белков этих клеток. Между тем без анализа этих процессов невозможно составить целостное представление о функционировании клеточных элементов, входящих в систему овариолы. Поэтому, не останавливаясь более на процессах синтеза и накопления в ооциты экзогенных белков, подробно рассмотренных, как указывалось, в предшествующих обзорах и оригинальных работах [1], мы главное внимание уделим метаболизму белков эндогенного (внутрисистемного) происхождения, преимущественно количественным аспектам этого процесса.

В предыдущих разделах было показано, что объем ооцита и вспомогательных клеток в процессе развития фолликула увеличивается во много раз. Согласно нашим количественным цитохимическим данным и литературным сведениям [1], это обусловлено, главным образом,

интенсивным синтезом и накоплением в цитоплазме вспомогательных клеток и в ооплазме—белковых масс. Так, у кошенили количество суммарного белка в ооплазме увеличивается примерно в 170 раз, в цитоплазме трофоцитов—17, в цитоплазме фолликулярных клеток—8 раз (рис. 7). Интересно, что при радиоавтографическом обнаружении меченого третием лейцина включение метки наблюдается преимущественно в цитоплазму вспомогательных клеток. Интенсивность же мечения ооплазмы значительно менее выражена (рис. 8). В особенности это различие заметно на поздних стадиях оогенеза. Эти данные хорошо согласуются с представлениями о том, что значительная часть желточного белка поступает в ооцит извне и вместе с тем свидетельствуют о том, что определенное количество белков, по крайней мере у кошенили,

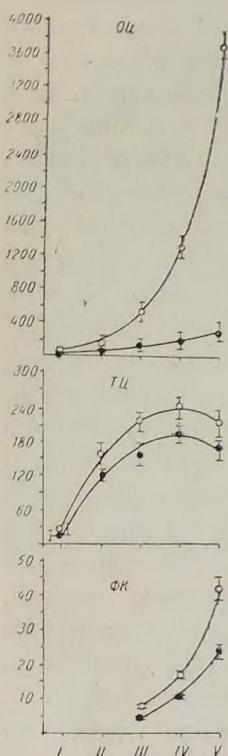


Рис. 7. Динамика содержания суммарного белка в ядрах и цитоплазме ооцита и вспомогательных клеток в оогенезе кошенили. По горизонтали: стадии развития; по вертикали: содержание белка (услов. ед.). Темные кружки—ядра, светлые—цитоплазма. оо—ооцит, тц—трофоцит, фк—фолликулярная клетка.

синтезируется в ооплазме. Наши данные не позволяют с достоверностью утверждать, что синтезированный во вспомогательных клетках белок транспортируется в ооплазму, однако более высокая концентрация метки в ооплазме вблизи фолликулярных клеток говорит об этой возможности (рис. 8). В случае же трофоцитов можно сказать о полном отсутствии транспорта белка из их цитоплазмы в ооплазму (рис. 8). Вместе с тем понижение интенсивности мечения ооплазмы к концу оогенеза может быть обусловлено накоплением в ней веществ небелковой природы—фосфолипидов и триглицеридов—в составе так называемого «жирового желтка» [1], что хорошо согласуется с нашими данными

ми о понижении концентрации суммарного белка в ооплазме в это время [21]. В литературе имеются сведения о синтезе эндогенного желточного белка в ооцитах ряда других насекомых, у которых тем не менее преобладает экзогенный желток [35]. Есть данные о значительной доле эндогенного желтка в ооцитах турбеллярий [30], ракообразных [24] и рыб [22 и др.]. Однако степень участия ооцита в синтезе желточных белков пока не поддается точному учету из-за того, что радиоавтографические данные не позволяют ответить на вопрос о том, какие именно белки синтезируются в ооплазме.

Наряду с цитоплазматическим синтезом белка и в ооците, и во вспомогательных клетках наблюдается интенсивный синтез ядерных белков. По данным цитофотометрии, количество суммарного белка в ядре ооцита кошенyli за время развития фолликула увеличивается в среднем в 24 раза, в ядрах трофоцитов—14, в ядрах фолликулярных клеток—5,5 раза (рис. 7). Одновременно с этим в ядрах возрастает и количество гистонов, однако в динамике накопления суммарного белка и гистонов нет параллелизма. Так, в ядре ооцита содержание гистонов увеличивается всего в 10 раз, причем отставание в интенсивности их накопления по сравнению с количеством суммарного белка становится особенно значительным начиная с III стадии развития фолликула (рис. 9). Последнее может быть связано, во-первых, с тем, что с этого времени в ядре ооцита начинается интенсивный синтез кислых белков, а во-вторых—с увеличением количества экстрахромосомной ДНК, отличающейся низким содержанием гистонов в хроматине [1, 9]. В ядрах трофоцитов интенсивность накопления гистонов на первых двух стадиях даже несколько превышает интенсивность накопления суммарного белка (увеличение в 25 и 13 раз соответственно), но затем количество гистонов снижается, что, вероятно, обусловлено переходом ядер трофоцитов от эндомитотической редупликации всего генома к избирательной репликации районов ядрышковых организаторов (см. предыдущие разделы), в процессе которой количество гистонов в хроматине понижается (рис. 9). В пользу этого свидетельствуют данные о динамике накопления гистонов в фолликулярных клетках, в ядрах которых и содержание ДНК, и количество суммарного белка и гистонов возрастает синхронно (ср. рис. 6 и 9). В этих клетках ДНК, как указывалось, претерпевает несколько туров кратной эндоредупликации.

По данным радиоавтографии, обнаруживаются различия в интенсивности включения ^3H -лейциновой метки в ядро ооцита и ооплазму и в ядра и цитоплазму вспомогательных клеток: концентрация метки в ядре ооцита значительно выше, чем в ооплазме, во вспомогательных клетках же синтез белка в цитоплазме идет интенсивнее, чем в ядре (рис. 8). Можно полагать, что интенсивный синтез белков в ядре ооцита связан с образованием большого количества так называемых белковых телец (ядрышкоподобных образований [9]), которые на электронномикроскопическом уровне обнаруживаются в виде сферических тел, содержащих фибриллярный и гранулярный компоненты [9]. Такие тельца зарегистрированы у ряда насекомых и других животных [9].

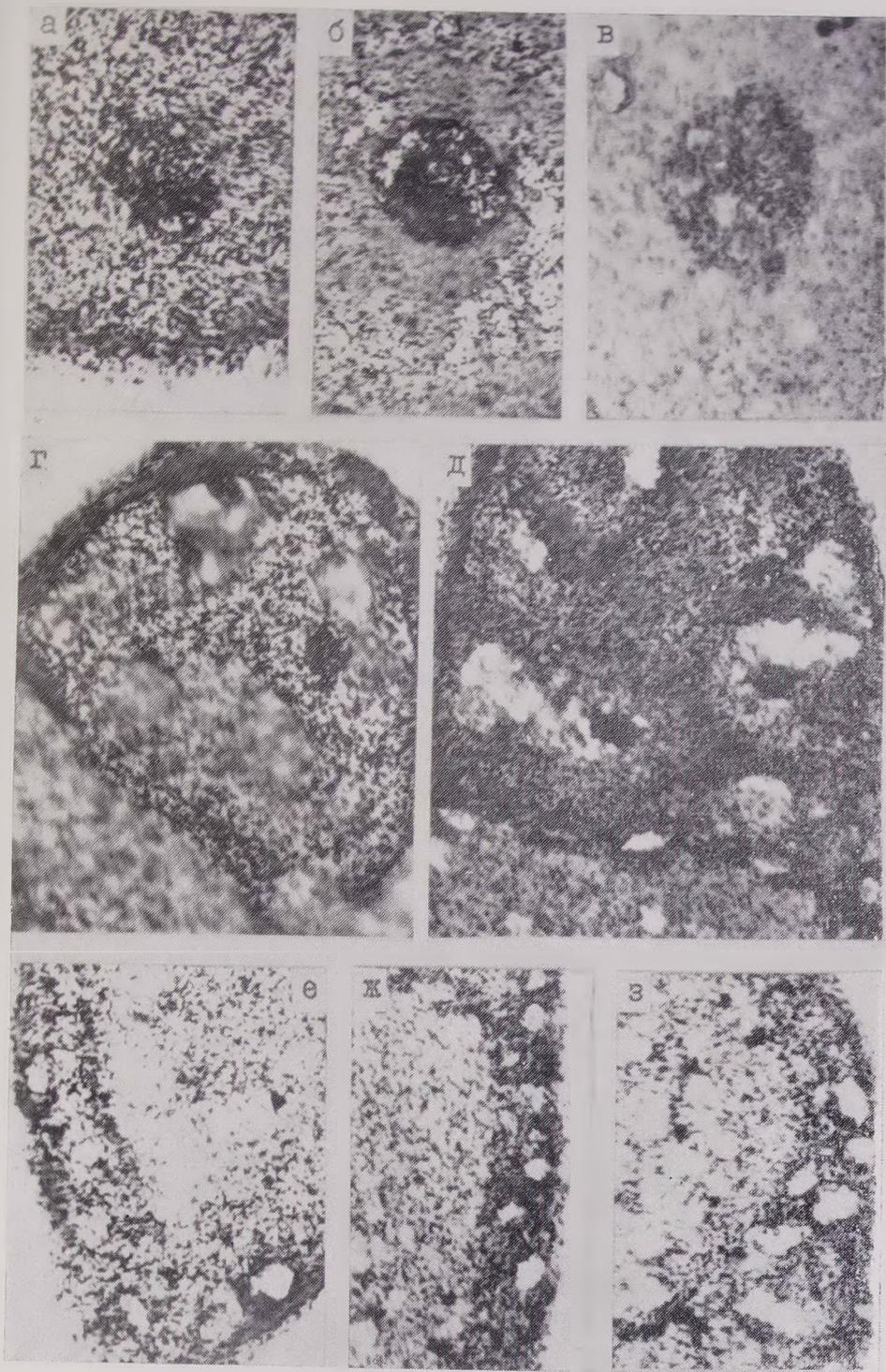


Рис. 8.

Рис. 8. Включение ^3H -лейцина в ооцит и вспомогательные клетки в процессе развития фолликула кошенили. а-в—ооцит на III, IV и V стадиях; интенсивное включение метки в ядро и транспорт ее в ооплазму; также интенсивное включение метки в ядра и цитоплазму фолликулярных клеток (фк). г, д—трофобласты на III и IV стадиях; активное включение метки в зоне ядрышек и ядер (г); интенсивное включение метки в цитоплазму. е-з—фолликулярные клетки на III, IV и V стадиях; отсутствие метки в ядрах; активное включение ее в цитоплазму; наличие метки в ооплазме вблизи от стенки фолликула. Условия введения изотопа: инкубация в питательной среде С-45 в течение 12 час. (первые 30 мин с добавлением ^3H -лейцина в конечной концентрации 50 мКи/мл, а затем в «холодной» среде). Подкраска гематоксилином и эозин. Увеличение: об. 100 \times , ок. 8 \times

Тигантская продукция белковых гранул наблюдается в оогенезе рептилий [4], у которых они перемещаются к периферии ядра ооцита. Согласно нашим данным, ^3H -лейциновая метка концентрируется в центре ядра ооцита кошенили и постепенно убывает к его периферии (рис. 8). Некоторые авторы считают, что эти тельца, включающие в себя фибриллярные и гранулярные структуры, участвуют в процессинге рибосомных частиц [46]. Не исключено, что белковые тела участвуют в транспорте рибосомных или полисомных частиц из ядра в ооплазму

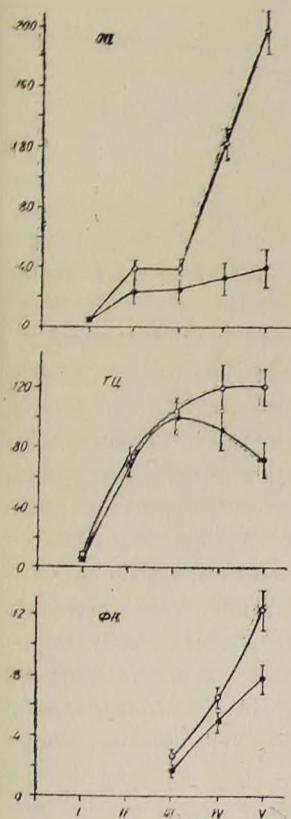


Рис. 9. Динамика содержания гистонов и суммарного белка в ядрах ооцита и вспомогательных клеток в оогенезе кошенили. По горизонтали: стадии развития; по вертикали: содержание белка (услов. ед.). Темные кружки—гистоны, светлые—суммарный белок. оц—ооцит, гц—трофоцит, фк—фолликулярная клетка.

[47]. Во всяком случае, можно сказать, что ядрышкоподобные образования являются отражением необычайно активного белкового метаболизма в ядре ооцита и, вероятно, участниками сложных ядерно-плазменных отношений в ооците.

Интенсивный синтез белка в цитоплазме фолликулярных клеток (на более ранних стадиях он наблюдается и в ядрах, и в цитоплазме, рис. 8), главным образом связан с выведением в пернооцитное пространство белков, участвующих в формировании хорниона к концу оогенеза. По данным некоторых авторов [61], до 90% меченого белка выделяется из фолликулярных клеток в хорнион. Необходимостью обеспечения этого синтеза дополнительным количеством кодирующего материала объясняется полиплоидизация фолликулярных клеток и наблюдаемый в их ядрах вплоть до конца оогенеза активный синтез РНК.

Не поддается объяснению высокая интенсивность синтеза и накопления белков в цитоплазме трофоцитов, поскольку описывавшееся ранее «перетекание» цитоплазмы трофоцитов в ооплазму в настоящее время представляется сомнительным.

В целом, с сожалением приходится признать, что метаболизм белков в сообществе клеток политрофных (как, впрочем, и других типов) овариол изучен в гораздо меньшей степени, чем метаболизм нуклеиновых кислот. Между тем, именно здесь видится возможность установления прямых связей между морфогенетическими преобразованиями элементов системы и выявляемыми изменениями в специфике белковых синтезов.

* * *

Настоящий обзор не претендует на полноту изложения всего накопленного к данному времени материала. По каждому из рассмотренных выше вопросов можно найти более подробные сведения в обзорах и оригинальных статьях, приведенных в списке литературы. Мы же, концентрируя внимание на трех важнейших сторонах жизнедеятельности сообщества клеток, входящих в систему политрофной овариолы, — морфогенезе, синтезе нуклеиновых кислот и метаболизме белков — стремились показать, что эта клеточная ассоциация является удачной моделью для изучения и разрешения не только частных вопросов оогенеза, но и общих вопросов биологии развития, в особенности в сфере проблем клеточной дифференцировки и морфогенеза. Во-первых, гигантские размеры ооцитов и их ядер и достаточно большая величина трофоцитов и фолликулярных клеток позволяют подойти к решению вопросов внутриклеточного морфогенеза в тесной связи с метаболизмом нуклеиновых кислот и белков. Во-вторых, тесная и четко прослеживаемая взаимозависимость становления и развития морфо-функциональных структур элементов системы делает более доступным, чем в соматических клетках, анализ межклеточных отношений на всех уровнях системы. И, наконец, в-третьих, относительная «автономность» системы не исключает, а напротив, способствует более конкретизированному осмыслению путей и механизмов подсистемных уровней регуляции эндогенных процессов.

Кроме того, при сопоставлении путей развития каждого из элементов системы политрофной овариолы и элементов, входящих в системы других типов овариол, появляется возможность эволюционного подхода к анализу возникновения и развития таких специфических черт формирования ооцитов, как гиперрепликация ДНК путем амплификации генов в ядре ооцита и аккумуляирование в ооплазме продуктов гетеросинтеза вспомогательных клеток и (или) внесистемного происхождения, в том и другом случае обеспечивающих накопление огромной массы веществ, используемых в дальнейшем зародышем при сохранении «в чистоте» наследственного материала женской половой клетки.

Автор приносит благодарность сотрудникам лаборатории Л. А. Аюпьян, Е. М. Караловой, С. Р. Макарян, А. В. Петросян и М. Г. Хачатрян, принимавшим участие в получении и обработке использованного в настоящей статье оригинального материала, а также М. Н. Грузовой и Т. Б. Айзенштадт за консультации и интерес к нашей работе.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 28.II 1979 г.

ՕՈՑԻՏ-ՕՓԱՆԴԻԱԿ ԶՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐԻ ՀԱՄԱԿԱՐԳԸ ՈՐՊԵՍ ՆՄՈՒՇ
ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՄԵՆԹԵԶԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱ-
ՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ ԶՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐԱԿՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ

Յու. Հ. ՄԱԳԱԿՅԱՆ

Որդան կարմրի օոգենեզի վերաբերյալ ցիտոֆոտոմետրիկ, ցիտոքիմիական, սպիտակավազիկ և ցիտոքիմիական մեր սեփական տվյալների և այլ միջատների վերաբերյալ եղած զրականության ակնարկի հիման վարենարկվում են պոլիտրոֆ օվարիոլի բջջային տարրերի մորֆոգենեզի նուկլեինաթթուների և սպիտակուցների սինթեզը և կուտակումը, ինչպես նաև նրանց ներքին ու միջբջջային փոխադրման հարցերը:

Ցույց է տրվում, որ օվարիոլի համակարգի տարրերի մորֆոգենեզի վերականգնմանը սերտ կապի մեջ են կորիզներում տեղի ունեցող ԴՆԹ-ի հիպերբալկացիայի և ՌՆԹ-ի մեծ քանակությունների սինթեզի հետ, որը հիմնված է սպիտակուցի լրացուցիչ կոդացող նյութի վրա համակարգում:

Համակարգի տարրերից յուրաքանչյուրն իր ներդրումն ունի օոցիտի ինտենսիվ աճը պահպանելու և նրա մեջ ապագա սաղմի համար պահեստային նյութեր կուտակելու գործում: Համակարգի յուրաքանչյուր տարրի յուրօրինակությունը և նրանց ֆունկցիոնալ ախտավորյալ մակարդակը որոշվում է օոցիտ և օժանդակ բջիջների միջև էվոլյուցիոն և օնտոգենետիկ ձևով կազմավորված փոխհարաբերությամբ:

Նշված համակարգը հարմար նմուշ է նուկլեինաթթուների ու սպիտակուցների սինթեզի պրոցեսների և նրանց ներբջջային սիստեմավորված կարգավորման մեխանիզմները ուսումնասիրելու համար:

THE OOCYTE-AUXILIARY CELL SYSTEM AS A MODEL FOR THE
STUDY OF NUCLEIC ACID AND PROTEIN SYNTHESIS DURING
CELL DIFFERENTIATION

Yu. A. MAGAKIAN

On the basis of original cytomorphological, cytochemical, cytophotometric and radioautographic data of the cochineal oogenesis and literature review on other insects the problems of cell morphogenesis of polytrophic ovarioles, synthesis and accumulation of nucleic acids and proteins and their intra- and intercellular transport are considered. It was

shown that the morphogenetic formations of the elements of ovariolar system are in close relation with DNA-hyperreplication in nuclei and with the synthesis of a great number of DNA and protein on the basis of additional coding material in the system. Each system element contributes to the maintenance of the oocyte's intensive growth and to the accumulation of reserve substances for the future embryo. The specific character and the level of functional activity of the system's elements are determined by the evolutionally and ontogenetically established correlation between the oocyte and auxiliary cells. The system indicated is a convenient model for the study of synthesis of nucleic acids and proteins and for their regulation mechanisms on intracellular and system level.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айзенштадт Т. Б. В кн.: Современные проблемы оогенеза. М., 5—50, 1977.
2. Айзенштадт Т. Б., Бродский В. Я., Иванова С. И. Цитология, 6, 1, 77—81, 1964.
3. Айзенштадт Т. Б., Маршак Т. Л. Онтогенез, 5, 5, 446—453, 1969.
4. Арронет В. Н. Цитология, 17, 2, 137—143, 1975.
5. Бродский В. Я., Урываева И. В. (Brodsky W. Ya, Uryvaeva I. V.) Intern. rev. cyt., 50, 275—332, 1977.
6. Гагинская Е. Р., Грузова М. Н. Цитология, 17, 10, 1132—1137, 1975.
7. Грузова М. Н. Онтогенез, 5, 6, 622—632, 1974.
8. Грузова М. Н. В кн.: Цитология и генетика мейоза. М., 113—136, 1975.
9. Грузова М. Н. В кн.: Современные проблемы оогенеза. М., 51—98, 1977.
10. Грузова М. Н., Зайчикова З. П., Соколов И. И. Цитология, 14, 3, 269—276, 1972.
11. Зайчикова З. П. Цитология, 18, 4, 438—444, 1976.
12. Кожанова Н. И., Грузова М. Н. Цитология, 17, 6, 607—613, 1975.
13. Кожанова Н. И., Грузова М. Н., Хохлов Г. Н. Цитология, 18, 7, 824—833, 1976.
14. Корвин-Павловская Е. Г., Каралова Е. М., Кулиминская А. С., Магакян Ю. А., Газарян К. Г. Цитология, 20, 9, 1016—1025, 1978.
15. Магакян Ю. А. Цитология, 18, 3, 243—254, 1976.
16. Магакян Ю. А., Каралова Е. М., Хачатрян М. Г. Цитология, 21, 0, 000—000, 1979.
17. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Петросян А. В., Мкртчян Л. П., Аброян Л. О., Акопян Л. А. Цитология, 18, 8, 932—935, 1976.
18. Магакян Ю. А., Маркарян Р. Н., Петросян А. В. Цитология, 11, 3, 335—347, 1969.
19. Левзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии. Л., 1972.
20. Соколов И. И. В кн.: Руководство по цитологии. 2, 390—460, М.—Л., 1966.
21. Хачатрян М. Г., Аксаян Л. А., Петросян А. В., Каралова Е. М., Макарян С. Р., Магакян Ю. А. Цитология, 21, 4, 382—390, 1979.
22. Anderson E. J. morphol., 125, 1, 23—59, 1968.
23. Anderson E. J. microsc., 8, 6, 721—738, 1969.
24. Veans H. W., Kessel R. G. J. cell biol., 18, 3, 621—649, 1963.
25. Bier K. Roux' Arch. Org., 154, 6, 552—575, 1963.
26. Bier K. J. cell biol., 16, 2, 436—440, 1963.
27. Bier K. Naturwiss., 51, 17, 418—433, 1964.
28. Bier K. Zool. Anz., Suppl., 33, 7—29, 1970.
29. Bou-Resli M. Z. Anat. Entwicklungsgesch., 143, 3, 239—254, 1974.
30. Boyer B. C. J. morphol., 136, 3, 273—294, 1972.
31. Brown E. H., King R. C. Growth, 28, 41—48, 1954.
32. Büning J. Z. Zellforsch., 128, 2, 241—282, 1972.

33. Cassidy J. D., King R. C. Biol. bull., 143, 483—505, 1972.
34. Cave M. D. Chromosoma, 42, 1—22, 1973.
35. Cumming M. R., King R. C. J. Morphol., 130, 4, 467—476, 1970.
36. Engelman F. The physiology of insect reproduction. Oxford, 1970.
37. Gall J. G. Genetics, 61, Suppl., 121—132, 1969.
38. Gall J. G., Rochalx J. D. Proc. Nat. acad. sci. USA, 71, 1819—1823, 1974.
39. Giorgi F. Cell and tissue res., 186, 3, 413—422, 1978.
40. Goltzené F. Compt. rend. acad. sci., D 284, 13, 1195—1197, 1977.
41. Hausman S. J., Anderson L. M., Telfer W. A. J. cell biol., 48, 2, 303—313, 1971.
42. Hubert J. Z. Zellforsch., 116, 2, 240—249, 1971.
43. Hubert J. Bull. Soc. zool. France, 102, 2, 151—158, 1977.
44. Huebner E., Anderson E. J. morphol., 137, 4, 385—415, 1972.
45. Jacob J., Sirtin J. L. Chromosoma, 10, 2, 210—228, 1959.
46. Jaworska H., Lima-de-Faria A. Hereditas, 74, 169—186, 1973.
47. Jaworska H., Lima-de-Faria A. Hereditas, 74, 187—204, 1973.
48. King R. C. In: Results and problems in cell differentiation. Berlin et al., 7, 85—109, 1973.
49. Koch E. A., King R. C. Biol. bull., 143, 483—505, 1972.
50. Lima-de-Faria A. In: Handbook of molecular cytology. Amsterdam—London 278—324, 1969.
51. Macgregor H. C. Biol. rev. Cambridge philos. soc., 47, 177—210, 1972.
52. Macgregor H. C., Stebbings H. J. cell sci., 6, 2, 431—449, 1970.
53. Malsuzaki M. Japan. j. entomol., 43, 1, 75—90, 1965.
54. Matuszewski B., Hoser P., Hoser G., Michalak M. Experientia, 33, 7, 883—885 1977.
55. Mellis M., Telfer W. H. J. morphol., 129, 1, 1—16, 1969.
56. Mills R. R., Greenstade F. C., Couch E. F. J. insect. physiol., 12, 7, 767—779, 1966.
57. Neaves W. B. Anat. rec., 170, 3, 285—302, 1971.
58. Ole M., Takahashi S. Y., Ishtzaki H. Dev., growth and differ., 17, 3, 237—246 1975.
59. Olmo E., Tadei C. Experientia, 30, 11, 1331—1332, 1974.
60. Painter T. S., Reindorp E. C. Chromosoma, 1, 3, 276—283, 1939.
61. Paul M., Goldsmith M. R., Hungsley J. R., Kafatos F. C. J. cell biol., 55, 653—680, 1972.
62. Paulson J. L., Rosenberg M. D. Dev. biol., 40, 2, 366—371, 1974.
63. Prees N. J. ultrastr. res., 10, 5—6, 528—546, 1964.
64. Rahil K. S., Narbaitz R. J. anat., 115, 2, 175—186, 1973.
65. Ramamurty P. S. Naturwiss., 50, 10, 383—384, 1963.
66. Ramamurty P. S. Exptl cell res., 33, 3, 601—605, 1964.
67. Raven Ch. P. Oogenesis. N. Y.—London, 1961.
68. Renkawitz-Pohl R. Verh. Deutsch. zool. Ges. 68. Jahresversamml. 1975, Karlsruhe, Stuttgart, 116, 1975.
69. Renkawitz-Pohl R. J. cell biol., 75, part. 2, 123, 1977.
70. Renkawitz-Pohl R. Chromosoma, 66, 3, 249—258, 1978.
71. Renkawitz-Pohl R., Kunz W. Chromosoma, 53, 131—140, 1975.
72. Ruthmann A. Zellforsch., 63, 6, 816—829, 1964.
73. Schjede O. A., Hanzely L., Holshouser S. J., Briles W. E. Cell and tissue res., 156, 1, 47—59, 1974.
74. Spear S. B. Amer. zool., 17, 3, 695—706, 1977.
75. Stern H., Hotta J. Ann. rev. genet., 7, 37—66, 1973.
76. Tanaka A., Ishizaki H. Dev., growth and differ., 16, 4, 247—255, 1974.
77. Telfer W. H. Ann. rev. entomol., 10, 161—184, 1965.
78. Trant W. Verh. Deutsch. zool. Ges. 68. Jahresversamml. 1975, Karlsruhe, Stuttgart, 64, 121, 1975.
79. Trendelenburg M. F. Chromosoma, 48, 119—135, 1974.

80. Trendelenburg M. F., Scheer U., Franke W. W. *Nature new biol.*, 245, 167—170, 1974.
81. Ullman J., Lima-de-Faria A., Jaworska H. *Hereditas*, 74, 1, 13—24, 1973.
82. Urbani E. *Monit. zool. ital.*, 3, 2, 55—87, 1969.
83. Wallace R. A., Dumont J. N. *J. cell physiol.*, 72, 2 (2), 73—89, 1968.
84. Winter H. Roux' *Arch. Ent. Org.*, 175, 2, 103—127, 1974.
85. Wolin E. M., Laufer H., Albertini D. F. *Dev. biol.*, 35, 1, 160—170, 1973.
86. Woodruff R. I., Telfer W. H. *J. cell. biol.*, 58, 1, 172—188, 1973.
87. Zinneister P. P., Davenport R. *Exptl cell res.*, 67, 2, 273—278, 1971.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(в свете данных электронной микроскопии)

С. М. АКОПЯН, М. Г. ГАЛУСТЯН

Обобщены электронномикроскопические данные последних лет, касающиеся структурной организации нуклеиновых кислот про- и эукариотов, а также ДНК вирусов. Рассмотрены особенности структуры внехромосомных элементов (плазмид, митохондриальной ДНК). Описаны основные электронномикроскопические приемы, позволяющие изучать структурную организацию нуклеиновых кислот указанных организмов и роль электронной микроскопии при исследовании молекулярных механизмов детерминации функций и экспрессии генома.

В последние годы многочисленные электронномикроскопические исследования структурной организации нуклеиновых кислот, выделенных из про- и эукариотов, значительно расширили наши представления о молекулярных механизмах функционирования клеток. Изучение ферментативного синтеза информационных областей отдельных генов в составе целой хромосомы [30, 42, 51], выделение и структурная характеристика индивидуальных молекул гетерогенных ядерных РНК [5], установление повторяющихся нуклеотидных последовательностей в геномах эукариотов [8, 100] и прокариотов [31], обнаружение родства геномов у различных организмов [37, 99, 107], построение карт частично денатурированных ДНК [57]—все это создало предпосылки для решения вопроса о структурных особенностях геномных районов, участвующих в транскрипционном процессе.

Параллельно с накоплением фактов, касающихся особенностей структуры высокополимерной ДНК (хромосомного материала клеток), увеличилось число электронномикроскопических публикаций, посвященных внехромосомным генетическим элементам. Последние, представленные молекулами ДНК с более низкой молекулярной массой (плазмиды у прокариотов [14], митохондриальная ДНК у эукариотов [6]), могут быть объединены по наиболее существенному для них признаку—способности к автономной репликации, т. е. способности реплицироваться без физического сцепления с клеточной хромосомой. Эти ДНК, относительно простые по своему строению, являются весьма удобными модельными системами для изучения на молекулярном уровне таких общебиологических закономерностей, как взаимодействие хромосомных и внехромосомных генов; механизмы репликации ДНК и т. д. Наконец, привлекательность этих моделей заключается в возможности

использования их в экспериментах по генетической инженерии, где они выступают в качестве векторных молекул, обеспечивающих амплификацию чужеродного генетического материала.

Хотя уже сейчас накоплено значительное количество фактов, касающихся особенностей структуры нуклеиновых кислот, и число их интенсивно продолжает расти, многие вопросы еще остаются нерешенными. В настоящем сообщении проводится анализ электронномикроскопических работ, посвященных изучению структурной организации линейных и кольцевых форм ДНК и РНК в про- и эукариотических клетках.

Картирование нуклеиновых кислот при помощи электронной микроскопии

Электронная микроскопия двуспиральных нуклеиновых кислот сделала большие успехи, главным образом благодаря применению метода белкового монослоя [63]. При этом двумерный препарат нуклеиновой кислоты, пригодный для использования в электронном микроскопе, получается благодаря образованию комплекса между монослоем белка (цитохром С) и молекулой полинуклеотида, а высокая степень его визуализации (рис. 1) достигается прокрашиванием солями урана или оттенением при круговом вращении металлами [37].

Структура гибридных молекул ДНК. При анализе структуры нуклеиновых кислот все методы гибридизации включают в себя последовательно проведенные плавление и ренатурацию и используются для решения широкого круга вопросов. Здесь мы сначала рассмотрим применение метода самоотжига при электронномикроскопическом изучении структуры ДНК, а затем различные подходы к изучению строения искусственно полученных гетеродуплексов.

ДНК большинства фагов характеризуются наличием на концах линейных молекул идентичных локусов. У ДНК фага λ избыточность геномного материала представлена двумя «липкими» одноцепочечными, самокомплементарными локусами на концах [70]. Процедура простого отжига переводит линейные молекулы ДНК фага λ в кольца и олигомеры, что и указывает на наличие «липких» концов. Аналогичный феномен наблюдается и у остальных лямбдоидных фагов. Наличие «липких» концов отмечено также у целого ряда фагов, выделенных из *Bacillus thuringiensis* [3, 4]. У многих же других фагов в процессе отжига образование колец не происходит, однако для визуализации концевой избыточности в геномах применяют обработку ДНК специфической для одного из концов цепи экзонуклеазой. Такой гидролиз приводит к появлению на концах ДНК небольших одноцепочечных локусов, и если в ДНК имелись концевые повторы, то последующий отжиг приведет к формированию кольцевых молекул. Схема, поясняющая образование таких колец, представлена на рис. 2а.

Экзонуклеаза III из *E. coli* [71], вызывая деградацию 1—3,5% ДНК фагов T2, приводила к появлению «липких» концов. Эта же нуклеаза была применена для анализа концевой избыточности ДНК фагов

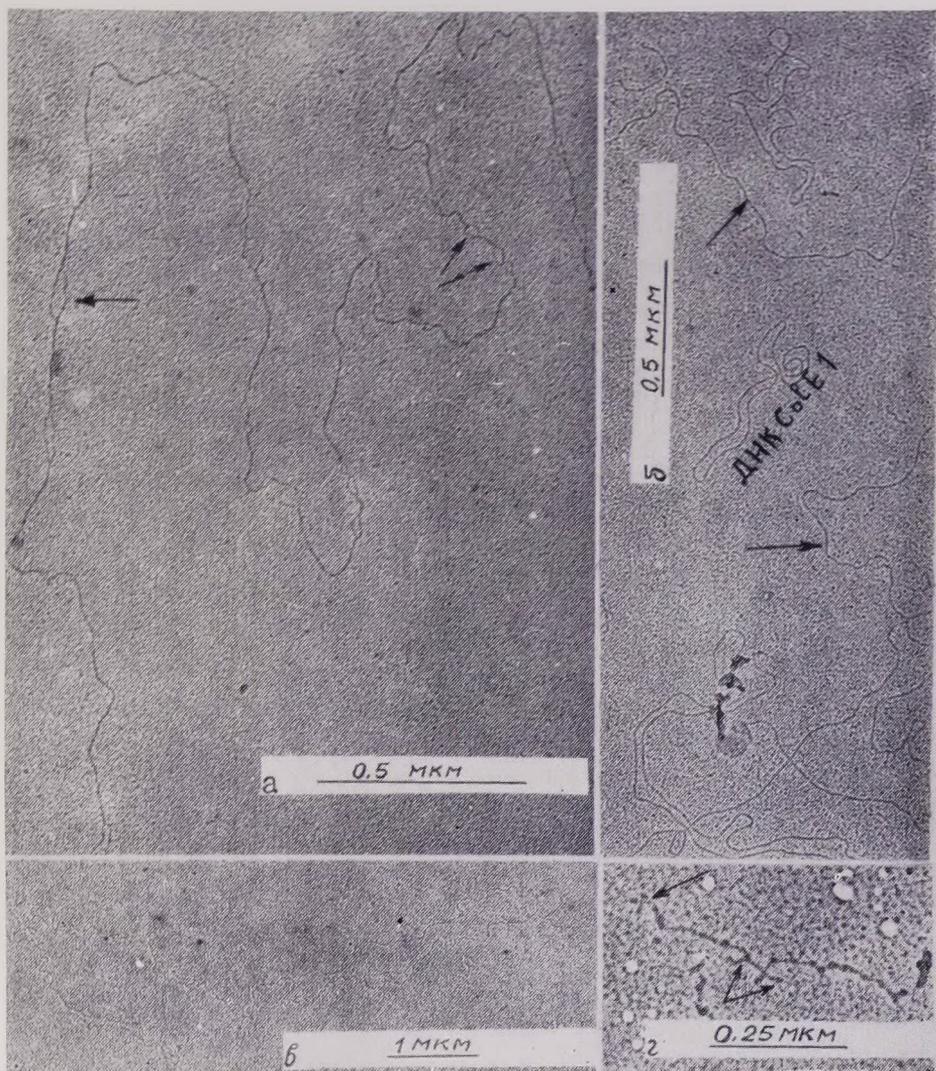


Рис. 1. ДНК фага P1-16: а—фрагмент частично денатурированной (стрелка) молекулы [2]; б—фрагмент нативной (стрелка) молекулы [9]; в—плазмидная ДНК [1]; г—молекула стабильной ядерной РНК 28 S. Хорошо заметны вторичные структуры (стрелки)—«шпильки» [17 и неопубликованные данные].

ТЗ и Т7 [87]. ДНК фагов Т5 и Р22, являясь линейными молекулами без «липких» концов, после обработки экзонуклеазой III и отжига обнаруживают, электронномикроскопически, концевые повторы, т. е. также приобретают форму кольца [85].

На основании контролируемого гидролиза нуклеазой и электронномикроскопического изучения ДНК бактериофага Р22 было показано, что ее концевая избыточность составляет 2,5—5%. Интересно отметить, что внутриклеточная циклическая, сверхзакрученная форма ДНК этого фага короче внутрифаговой формы на величину повтора [86]. Разница в 7,5% между внутриклеточной циркулярной формой и ДНК, упакованной в вирионах, была также выявлена у индуцированного митомицином дефектного фага 15. Структура ДНК этого фага была проанализирована при помощи обычного метода денатурации с последующей ренатурацией и образованием при этом кольцевых форм, содержащих однонитевые хвосты (рис. 2б). Формирование таких структур можно объяснить, если предположить, что ДНК данного фага имеет концевую избыточность и является смесью циклически переставленных молекул.

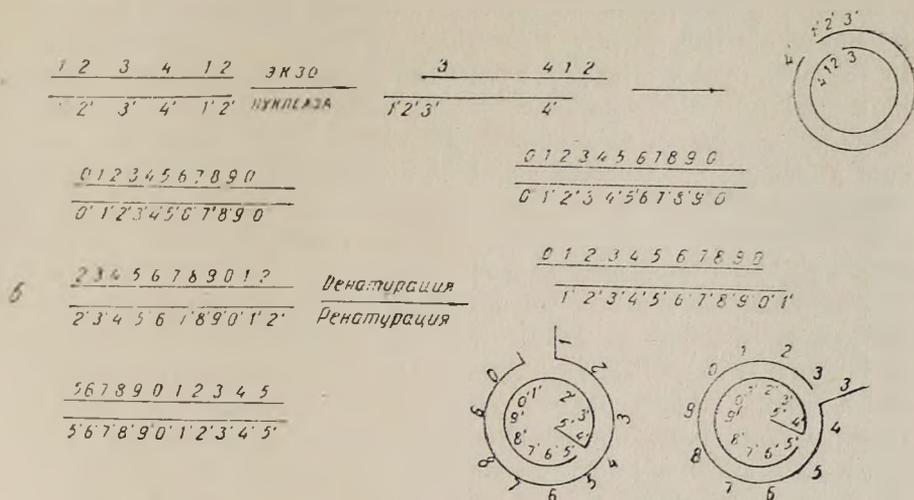


Рис. 2. Образование кольцевых структур из линейной ДНК с концевой избыточностью (0—9—последовательности нуклеотидов; 0'—9'—последовательности им комплементарные); а) образование колец после действия экзонуклеазы и самоотжига ДНК [19]; б) образование двуцепочечных колец с одноцепочечными хвостами после денатурации и самоотжига ДНК с циклической перестановкой и концевой избыточностью [26].

Оригинальная разновидность избыточного материала на концах молекул обнаружена при самоотжиге ДНК аденоассоциированного вируса (ААВ). В вирионах такого гибрида содержатся отдельно «+» и «-» цепи ДНК.

Если взятые отдельно «+» и «-» цепи отжечь на себя, то электронномикроскопически удастся визуализировать однонитевые кольца с одним небольшим дуплексным участком [24]. Это говорит о наличии

та концах одноцепочечных молекул ДНК инвертированных (обращенных) повторов. Гидролиз последних переводит кольцевые молекулы в линейные формы, а по степени необходимого для этого гидролиза можно определить величину обращенного повтора. Помимо обращенных повторов, в ДНК этого вируса при помощи электронной микроскопии была обнаружена перестановка генома [49]. В процессе отжига «+» и «-» цепей ААВ формируются двуспиральные линейные молекулы, не способные циклизироваться.

Обращенные повторы показаны также в ДНК аденовирусов. В результате денатурации и последующей ренатурации ДНК электронно-микроскопически были выявлены одноцепочечные кольца, соединенные при помощи обратных комплементарных участков на концах молекул [103].

Обращенные повторы имеются в плаزمиде R и F [94]. Ген резистентности к тетрациклину (Tet^b), присутствующий во многих плаزمиде, несет в себе внутренний обращенный повтор. Этот палиндром используется как репер при картировании плазмид [101]. Именно он обеспечивает интеграцию плазмид в хромосому бактерий [61].

Геном фага МЮ также имеет внутренний обращенный повтор [55]. В результате самоотжига происходит образование двуцепочечных молекул ДНК с однонитевыми участками на одном из концов и в середине молекулы. В серединном участке каждая из цепей отжигается на себя, что указывает на обращенный повтор. ДНК этого фага внедряется в большом количестве участков в хромосому *E. coli*, инактивируя при этом гены в точке интеграции. Обращенный повтор у фага МЮ может служить в качестве репера при картировании генов *E. coli*, которые фаг МЮ инактивирует [54].

Обращенные повторы, палиндромы, обнаружены также при изучении генома эукариотов [108]. Причем палиндромные локусы у них составляют от 2 до 15% всей ДНК, а размеры их варьируют от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов [18, 40, 108]. В электронном микроскопе обращенные повторы после отжига денатурированной ДНК в пределах одной нити имеют вид петель, если палиндромы располагаются на расстоянии в несколько тысяч нуклеотидов друг от друга, и шпилькоподобных структур—при tandemном расположении. Обращенные последовательности могут быть как повторяющимися, так и неповторяющимися [11, 40]. Примечательно, что палиндромы обнаруживаются и в составе единиц транскрипции генома [90]. Визуальное исследование частично денатурированной ДНК (асцитный рак Эрлиха мыши) с помощью электронного микроскопа показало наличие различных циклондных структур, в частности колец и так называемых лариатов (колец с хвостами) [8]. Предполагается, что формирование циклондов обоих типов обусловлено наличием повторяющихся последовательностей в частично денатурированных участках ДНК.

Геномы многих организмов содержат также внутренние прямые повторы. Для прокариотных геномов большую часть повторов составля-

ют гены рибосомальной РНК. От 7 до 9 наборов рибосомальных генов обнаружено при помощи электронной микроскопии в хромосоме *Vac. subtilis* [31].

Эукариотные геномы прямых повторов содержат значительно больше и они представлены не только рибосомальными генами [36]. Это так называемые перемежающиеся умеренные повторы, ограниченные с обеих сторон уникальными последовательностями. Эта характерная для эукариотов организация ДНК составляет около 70% генома. Наличие множества tandemно расположенных повторов в молекулах ДНК способствует после ренатурации образованию двуспиральных колец, идентифицируемых электронномикроскопически. Кинетика такого феномена детально исследована для ДНК *Xenopus laevis* [83].

Исследование структуры ДНК с помощью гетеродуплексов. Если при ренатурации расплавленных молекул ДНК ввести в раствор частично гомологичную ДНК, то часть этих молекул будет состоять из гетеродуплексов, в которых двунитевые участки будут представлены областями с гомологией между двумя ДНК, а одноститевые — районами, в которых последняя отсутствует. Примером гетеродуплексного анализа может служить эксперимент по совместному отжигу исходной ДНК и ДНК делеционного мутанта. В результате формирования гетеродуплекса появляется одноститевая петля, по величине равная исследуемой делеции. Впервые выявление делеционного мутанта фага λ в электронном микроскопе (одноститевая петля в гетеродуплексной ДНК) было продемонстрировано Дэвисом и Дэвидсоном [37]. Однако делеционная петля была представлена в виде «кустиков» — закрученной сама на себя. Для преодоления этого феномена в растворы для приготовления электронномикроскопических препаратов ДНК был введен формамид, который обеспечил одновременную визуализацию развернутой одноститевой петли на фоне двунитевого гетеродуплекса [107]. Метод гетеродуплексного анализа облегчается также, если для гибридизации используются разделенные цепи ДНК. Для «привязывания» делеций к физическим концам молекулы используют гетеродуплексную технику, но не с ДНК фага дикого типа (без делеций), а с ДНК, имеющей в качестве репера [96] характерную делецию. Анализ гетеродуплексных молекул позволил картировать гены для головки и хвоста бактериофага λ и исследовать тонкую структуру интегрируемого локуса этого вируса ($att^{\Phi 80}$) в бактериальный геном [38]. Аналогичные результаты с помощью электронной микроскопии гетеродуплексов были получены в отношении фагов SPO2 и Ф105 [31]. Полное картирование района ранних генов фага T7 с помощью делеционных мутантов было проведено на основании сравнительного анализа длин двуспиральных участков ДНК дикого фага и гетеродуплексов с делеционными мутантами [96]. При этом были получены электронномикроскопические данные, полностью совпадающие с результатами генетического анализа.

Весьма интересные данные были получены при выяснении степени родства ДНК фагов P2 и P2H YLis с помощью конструирования гетеродуплексов. Оказалось, что геномы этих фагов отличаются только в

участке иммунности, который и был локализован при помощи гетеродуплексов [29]. Высокая степень гомологии была продемонстрирована при исследовании гетеродуплексов между геномами Т-четных фагов. Было показано чередование областей полной гомологии, включающих несколько генов, с областями, полностью негомологичными. В целом эти фаги, как и лямбдоидные, имеют значительную степень родства и близкие молекулярные веса ДНК, несмотря на наличие нескольких вставок и делеций.

Широкое использование техники гетеродуплексного анализа позволило изучить тонкую структурную организацию генома опухолеродного вируса SV-40 [73]. Интеграционный локус, перестановки в адено-SV-40 гибридах были также определены при помощи гетеродуплексов с рестриктазными фрагментами ДНК SV-40 [59]. Электронномикроскопическое изучение гомологии между ДНК различных серотипов аденовируса человека показало, что внутри групп, объединенных по степени онкогенности, существует большая гомология (около 70%), а между серотипами, принадлежащими к разным группам, она невелика (до 10%). Примечательно, что наиболее значительная гомология наблюдается между ДНК серотипов, входящих в группу А. Эта группа характеризуется тремя локусами полной гомологии, ограниченными участками, сравнительно мало комплементарными. В противоположность группе А, серотипы аденовирусов, входящих в группу С, сильно различаются по нуклеотидной последовательности.

Выяснение степени родства геномов эукариотических клеток было проведено при помощи электронной микроскопии рибосомальных ДНК двух близкородственных видов южноафриканских лягушек [45]. Области геномов, кодирующие 18S и 28S рибосомальные РНК этих двух видов, оказались полностью комплементарными друг другу, в то время как нетранскрибируемый участок ДНК имеет очень ограниченную гомологию.

В заключение хотелось бы упомянуть о приеме, позволяющем исследовать геномы, имеющие очень незначительную степень комплементарности [44]. С целью изучения родства между ДНК SV-40 и вируса полиомы жольцевую ДНК этих вирусов при помощи рестриктазы Eco RI переводили в линейную форму, в результате чего на концах линейных молекул появлялись «липкие» концы за счет разреза специфического для эндонуклеазы Eco RI сайта. После гибридизации таких молекул посредством «липких» концов и «зашивания» их лигазой образовывались ковалентно замкнутые кольцевые молекулы, составленные из ДНК SV-40 и вируса полиомы. В дальнейшем денатурация и быстрый отжиг при низких концентрациях ДНК привели к формированию двуниевых участков в тех районах, где соединенные в одну цепь ДНК SV-40 и полиомы имеют частичную гомологию. Таким образом, группе Дэвиса-Дэвидсона удалось локализовать единственный район этих онкогенных вирусов, имеющий гомологию и расположенный в области ранних генов вируса SV-40. Более того, авторам этого эксперимента,

благодаря описанной выше процедуре, удалось преодолеть техническую трудность обычного конструирования гетеродуплексов, а именно большую скорость отжига исследуемой нити ДНК со своей же комплементарной нитью, а не с чужой.

Карты частичного плавления ДНК. Первичная последовательность оснований известна в настоящее время только для ДНК двух организмов—фага MS2 и фага ϕ X174. Расшифровка первичной последовательности геномов других организмов, хотя и является в принципе возможной, но требует много средств и времени. Поэтому большое распространение получили приемы, позволяющие исследовать распределение нуклеотидов вдоль молекулы ДНК не полностью, а лишь в некотором приближении. Примером такого рода методов служит физическое картирование уникальных нуклеотидных последовательностей—специфических сайтов, узнаваемых эндонуклеазами различного происхождения, а также денатурационное картирование. Возможность построения денатурационных карт ДНК обусловлена значительной гетерогенностью распределения в ней ГЦ (гуанин—цитозин)—пар оснований. Воздействуя на ДНК денатурационными агентами, мы «расплетаем» ее легкоплавкие АТ (аденин—тимин)—обогащенные участки, в то время как тугоплавкие ГЦ-районы остаются в нативной форме (двухспиральной). Электронная микроскопия полученной частично расплавленной молекулы ДНК позволяет выявить эти легко- и тугоплавкие участки (рис. 1).

Таким образом, для картирования ДНК нужно зафиксировать ее в денатурированном виде и перевести молекулу из трехмерного состояния в двумерное, пригодное для электронной микроскопии. Для приготовления электронномикроскопического препарата используются денатурационные методики с применением метода белкового монослоя, который разбирался в первой части данного обзора.

Приступая к изложению основных данных о структуре ДНК, полученных с помощью построения карт частичной денатурации, отметим, что метод тепловой денатурации не дает точной воспроизводимости степени денатурации при разных температурах, однако положение легкоплавких участков хорошо воспроизводится. Гораздо большую воспроизводимость плавления можно достигнуть, используя для денатурации ДНК щелочные растворы [57].

При построении карт частичной денатурации обращает на себя внимание тот факт, что АТ-обогащенные районы у ДНК различного происхождения могут быть распределены в двух вариациях: в случаях асимметричности легкоплавких участков в молекуле карты характеризуются выраженными пиками и небольшим фоном (это так называемые блочные плотности АТ-пар); в тех же случаях, когда ДНК обладает последовательностью оснований, близкой к случайной, на картах с пиками, как правило, отмечается высокий фон.

В качестве денатурирующего агента обычно используют карбонатный буфер (рН 11—12) с 10%-ным содержанием формальдегида. За-

тем приготовление электронномикроскопических препаратов проводят с использованием метода белкового монослоя с формамидом.

Классическим подтверждением того факта, что АТ-пары располагаются в легкорасплетаемых районах ДНК, являются результаты частичного щелочного плавления ДНК фага λ [95]. Частичной денатурации были подвергнуты ДНК фага λ и ДНК этого же фага, в которой тимин был замещен на бромурацил. При сравнении этих двух щелочных карт плавления было обнаружено, что в целом они совпадают. Таким образом, был сделан вывод, что легкоплавкие участки ДНК, выделяемые при плавлении в присутствии формальдегида, соответствуют АТ-обогащенным последовательностям, т. е. денатурационные карты представляют собой карту распределения АТ-богатых участков.

В этой части обзора мы хотели бы остановиться также на технической стороне составления карт частичного плавления. Обычно длина участков молекул промеряется при помощи курвиметра после фотографического увеличения [62]. Далее для сопоставления отдельных частично расплавленных молекул друг с другом обычно проводится нормализация их изображений по длине. Следующим этапом является взаимная ориентация полученных нормализованных схем частично расплавленных молекул. Сначала изображения схем молекул наносятся на узкие полоски бумаги, затем вся совокупность изображений разбивается на подгруппы, внутри которых прослеживается очевидное сходство в расположении денатурированных участков. Далее строится гистограмма распределения расплавленных районов по длине.

Большинство сведений относительно расположения нуклеотидных последовательностей вдоль молекул ДНК, полученных с помощью анализа денатурационных карт, касается вирусных геномов. Построение таких карт, в частности, позволяет визуально различить левый и правый концы молекулы ДНК, что дает возможность непосредственно сопоставлять результаты физико-химических и генетических исследований. Так, при помощи этого метода были определены места прикрепления РНК- [51] и ДНК-полимераз к геному фага Т7, а также направление репликации ДНК Т7 [30, 42] и участок терминации синтеза рибонуклеиновых кислот. Было показано, что у фагов Р2 и 186 правый, а у фагов Р4 и λ левые концы ДНК первыми упаковываются при морфогенезе этих вирусных частиц [80]. Метод непосредственной щелочной денатурации дал возможность картировать фрагменты рестрикции на молекулах ДНК и, таким образом, ответить на вопрос, на каком участке, по длине и нуклеотидному составу располагаются рестрикционные сайты эндонуклеаз [74].

Денатурационное картирование в щелочных условиях было применено для идентификации в ДНК вируса герпеса вставок рибонуклеотидов, а также наличие обращенных повторов [102]. Оказалось, что внутренние районы ДНК этого вируса имеют ту же характерную картину частичной денатурации, что и концевые участки молекулы. Для ДНК мутанта вируса герпеса при помощи этого методического приема

было обнаружено тандемное удвоение некоторых ГЦ-обогащенных районов ДНК [46]. На карте щелочного плавления амплифицированной 5S рибосомальной ДНК спорцевой лягушки имеется повторяющийся локус, состоящий из денатурированного и нативного районов. Анализ ГЦ-состава амплифицированной ДНК и 5S РНК позволил сделать вывод, что трудно расплетаемый участок величиной в 700 нуклеотидных пар содержит последовательность, комплементарную 5S РНК [7].

В большинстве перечисленных выше работ изучали ДНК, обладающие выраженными флуктуациями плотности АТ-пар (блочностью оснований). Действительно, карты, построенные для таких ДНК, асимметричны, имеют хорошо заметные пики.

Для других ДНК с последовательностями оснований, близкими к случайной (о чем можно судить по узкому интервалу плавления), построение денатурационных карт в большинстве случаев не позволяет легко отличить один конец от другого [2, 91], хотя встречаются вирусные геномы с характерным репером [3, Акопян и др.—неопубликованные данные]. Наличие таких реперов для ДНК фага Tg9, лизирующего штамм *Bac. thuringiensis*, и ДНК фага FT4, лизирующего *Pseudomonas putida* (в нашем случае), создает возможность точной ориентации частично расплетенных молекул относительно друг друга по концам.

Заканчивая этот раздел, следует также отметить, что для составления карт сверхскрученных вирусных ДНК применяются оригинальные методические подходы с использованием в качестве денатурирующих агентов в одном случае 32 белка—продукта 32 гена фага T2, в другом—водорастворимого карбодимида. 32 белок позволяет обнаружить мелкие области денатурации из-за высокого контраста одноцепочечных районов [41], а карбодимид модифицирует гуанин и тимин [81]. В обоих случаях в электронном микроскопе видны открытые кольцевые молекулы с одним хорошо заметным денатурированным районом. Как полагают авторы, эти расплетенные участки определяют степень сверхспиральности изученных ими ДНК.

Наконец, внесение специфических двуспиральных разрывов (с помощью нуклеазы Eco R1) позволило успешно картировать щелочное плавление ДНК вирусов полиомы [69] и SV-40 [75].

Структура кольцевых, автономно реплицирующихся молекул ДНК
Существенную роль при изучении структурных особенностей циркулярных ДНК играет электронномикроскопический анализ, основанный на определении конфигураций, размеров, молекулярного веса, а также ряда деталей тонкой организации этих молекул. Мы рассмотрим в первую очередь данные о структуре плазмидных ДНК прокариотических клеток, затем остановимся на основных результатах электронномикроскопических исследований, посвященных изучению митохондриальных ДНК эукариотических организмов.

Хотя бактериальные плазмиды открыты сравнительно недавно, к

настоящему времени в мировой литературе накоплено значительное количество фактов, касающихся проблем генетики и биогенеза плазмидных ДНК. Такое положение сложилось в результате как резко возросшего в последние годы интереса к теоретическим аспектам проблемы внехромосомных факторов наследственности, так и ее весьма важного прикладного значения.

Проведенные с помощью электронномикроскопического метода прямые наблюдения плазмидных ДНК подтвердили те данные о размере, кольцевой форме и сверхскрученности, которые были получены косвенным путем при других различных исследованиях. Так, измерение контурных длин индивидуальных молекул плазмид позволило определить их молекулярный вес [64], и уже отсюда был непосредственно выведен один из параметров репликации—среднее число плазмид на хромосому бактериальной клетки [14]. Существенные различия в количестве копий кольцевых молекул на хромосому и размерах были выявлены при исследовании нетрансмиссибельных (неспособных переносить из одной клетки в другую собственный и чужой генетический материал) и трансмиссибельных плазмид. Последние, детерминирующие процесс конъюгации, как правило, имеют крупные размеры и молекулярный вес их превышает 50 мегадальтон. Молекулярный вес нетрансмиссибельных плазмид практически не бывает выше 10 мегадальтон. Репликация их находится под так называемым релаксивным (ослабленным) контролем и количество копий их может достигать 10 и более на хромосому, в то время как число трансмиссибельных, репликация которых строго контролируется, не превышает 1—2 копии на клетку [33]. Исключением являются плазмиды, занимающие промежуточное положение,—плаزمида R6K имеет число копий на хромосому 10 и молекулярный вес 26 мегадальтон. Описан также целый ряд кольцевых ДНК с различными молекулярными весами—так называемые крипточеские плазмиды, функции которых до настоящего времени не известны [9, 67, 93]. О большой вариабельности молекулярных весов говорят электронномикроскопические данные, свидетельствующие о наличии у некоторых микроорганизмов гигантских плазмидных ДНК. Так, кольцевая ДНК с молекулярным весом 400 мегадальтон, выделенная из бактерий рода *Rhizobium*, идентифицирована как плазмида, обуславливающая клубеньковость у бобовых растений [77].

Гигантских размеров плазмидные ДНК обнаружены также у бактерий рода *Agrobacterium*, с молекулярными весами 77—180 мегадальтон [72, 111]. Бактериальная плазмида с молекулярным весом 202 мегадальтон была электронномикроскопически идентифицирована у бактериальных клеток *Pseudomonas putida* [35].

По-видимому, гетерогенность плазмид по длине связана с их своеобразными метаболическими свойствами, т. е. с фенотипическими признаками, сообщаемыми клетке-носителю. Исследование в электронном микроскопе многокопийных плазмид R6K и RP4 (факторов устойчивости к ампициллину, стрептомицину, тетрациклину, конамицину)

выявило различия в молекулярных весах—26 и 36 мегадальтон соответственно [65]. В клетках *Pseudomonas putida*, способных в качестве единственного источника углерода утилизировать ряд ароматических соединений (нафталин, салицилаты, бензилсульфонат и др.), электронномикроскопически было обнаружено у штамма P^dG7 [1, 10] три типа плазмидных молекул: 29—33; 15—18, 3—5 мегадальтон. Крошечные кольцевые молекулы ДНК (мини-плазмиды) с молекулярными весами от 1 до 5 мегадальтон были также обнаружены у ряда кишечных микроорганизмов [35] и энтомоцидных бактерий (Захарян и др., Галушко и Акопян, в печати).

Во всех случаях для определения молекулярных весов плазмидных ДНК с помощью количественного анализа контурных длин используются развернутые (релаксированные) молекулы, т. е. ДНК, лишенные сверхскрученного состояния [51].

Большую роль в изучении тонкой организации плазмидных геномов сыграл отмеченный выше метод конструирования гетеродуплексов [37, 39]. Целая серия электронномикроскопических исследований, посвященных выявлению степени родства между различными плазмидными геномами (F и R плазмидами *E. coli*), была проведена при помощи этого технического приема [22, 78]. Не исключено, что выявленные гомологичные области между этими плазмидами являются детерминантами формирования у бактерий половых ворсинок, обеспечивающих конъюгативный процесс.

Важнейшей характеристикой плазмидных ДНК является построение электронномикроскопических карт этих молекул. Визуальное исследование [16] однитетовой молекулы ДНК R6K выявило наличие трех структур типа «стебель—петля», хорошо дифференцируемых друг от друга, так как две из них образуют характерную структуру, которую можно назвать «транспозон на транспозоне» (от английского слова transposition, что означает способность данной структуры переноситься и встраиваться в определенных условиях в другие участки генома). «Стебли» этих структур представляют собой обращенные повторы в цепи ДНК, а «петли»—цуклеотидные последовательности между ними. Как было отмечено выше, плаزمида R6K детерминирует устойчивость клеток к ампициллину, в связи с чем было высказано предположение о соответствии одной из структур «стебель—петля» на ее ДНК какому-либо из известных ампициллиновых транспозонов. Как показал гетеродуплексный анализ плазмид R6K и RSF 2124 (плазмида Col E1 с внедренным в нее ампициллиновым транспозоном), область гомологии соответствовала ампициллиновому транспозону и локализовалась на одном из указанных участков ДНК R6K обращенных повторов, т. е. у таких гетеродуплексных молекул структура «транспозон на транспозоне» уже не выявлялась: одна из структур «стебель—петля» замещалась двуинтевым участком гомологии. Наличие инверсивных повторов было выявлено и у плазмиды pAS3—делеционного мутанта плазмиды R6K, утратившей детерминант устойчивости к стрептомицину, с молекулярным весом 18,8 мегадальтон [16].

До сих пор мы касались плазмидных ДНК, представленных в клетках в виде кольцевых мономерных молекул. Однако нередко встречаются плазмиды и в мультимерной форме—так называемые катенаны. В электронном микроскопе последние выглядят в виде двунитевых колец, сцепленных между собой как звенья одной цепи. Так, в клетках *Proteus mirabilis* электронномикроскопически были идентифицированы ДНК фактора Col E1-K30 с разными молекулярными весами: 4,2; 8,5; 12,7 мегадальтон. Соответственно первая из них была представлена мономером, вторая—димером, третья—тримером [49]. Совершенно аналогичная картина была ранее продемонстрирована в отношении ДНК эукариотических клеток [32, 56, 84]. Такие мультимерные формы циркулярных молекул были идентифицированы при электронномикроскопическом изучении митохондриальных ДНК (мтДНК) человека (HeLa и лейкемических лейкоцитов), а также мтДНК, выделенных из ооцитов вьюна [7]. Хотя к настоящему времени накоплено большое число работ, касающихся функций и роли мультимерных молекул в жизнедеятельности как прокариотических, так и эукариотических клеток [6, 14], данные эти противоречивы, и многие вопросы в этой связи остаются еще открытыми.

Морфология и размер мономерной мтДНК с помощью электронной микроскопии были впервые изучены в 1966 году [25, 76]. В исследуемых препаратах мтДНК присутствовали, как правило, в виде кольцевых молекул с молекулярным весом 10 мегадальтон. Исключение составляла лишь мтДНК, выделенная из фибробластов мышей линии LD, где молекулы в основном представляли собой димеры с молекулярным весом 20 мегадальтон. В основном этот физический параметр для мтДНК различных эукариотических организмов, исследованных до настоящего времени, составляет 10 мегадальтон с некоторой вариабельностью в контурной длине (в пределах 15—20%) в зависимости от ионной силы растворов, применяемых для образования белкового монослоя [106]. С другой стороны, небольшие различия в молекулярных весах мтДНК (на примере *Drosophila*) могут быть обусловлены различным содержанием АТ-нуклеотидных пар, определенных построением карт частичной денатурации изученных мтДНК [43].

Отсутствие в митохондриальных геномах повторяющихся последовательностей затрудняет анализ первичной структуры данных молекул в животных клетках. Сведения по этому вопросу ограничены единичными сообщениями [20, 53]. В этих исследованиях приводятся данные, указывающие на наличие в мтДНК повторяющихся нуклеотидных последовательностей размером около 350 пар [20] и коротких гомополимерных районов длиной в несколько десятков (20—30) нуклеотидов. Имеется также ряд исследований по составлению денатурационных карт [20, 43, 110]. На основании анализа карт частичной денатурации у различных мтДНК было выявлено 3—4 легкоплавких участка. Относительно каких-то функциональных свойств этих районов в составах молекул мтДНК пока ничего не известно, хотя имеются предположения

[20], что они могут соответствовать промоторным участкам, узнаваемым РНК-полимеразой.

Весьма перспективным подходом к изучению первичной структуры митохондриальных геномов стало построение рестрикционных карт с помощью расщепления мтДНК различными эндонуклеазами [89].

Электронномикроскопический анализ мтДНК, выделенных из различных источников (клеток мартышек—BSC, человека—HeLa, мыши—LA9, а также клеток крысиной печени), показал, что такие нуклеазы, как Eco RI, Hind III, Hpa I, Hpa II, Bam I, расщепляют митохондриальные геномы на фрагменты с различными контурными длинами и большим разбросом числа самих рестрикт (2—6).

Наиболее интересные данные получены при анализе рестрикционных карт мтДНК после гидролиза рестриктазой Hae III [79]. В этом случае, в зависимости от источника, из которого выделялась мтДНК, число фрагментов составляло 20—30. Примечательно, что у близкостоящих видов (например, у лошади и осла) была выявлена значительная общность фрагментов—50%, в то время как у отдаленных видов (лошадь—собака) такой картины не удавалось наблюдать.

Заканчивая эту часть обзора, отметим, что здесь мы коснулись в основном структурной организации мтДНК, выделенных из нормально развивающихся клеток высших эукариотов. Что же касается данных о структуре мтДНК растений, грибов, одноклеточных водорослей, низших эукариотов и морфологических особенностей мтДНК при различных патологиях, они также представлены в литературе [6, 15].

Структура молекул одноцепочечных нуклеиновых кислот (РНК).

Электронная микроскопия природных однонитевых нуклеиновых кислот с помощью метода белкового монослоя выявляет характерный для них вид «кустиков», лишенных регулярной структуры [37]. Хотя контурные длины таких «кустов» и дают некоторое представление о форме и размерах молекул, значительно больше информации о структуре РНК было получено при помощи электронной микроскопии денатурированных молекул [88]. При этом для приготовления препаратов РНК обычно в качестве денатурирующего агента используют раствор 8М мочевины в одном литре формамида. Приготовленные таким способом препараты РНК имеют удовлетворительный контраст и индивидуальные молекулы при этом бывают в достаточной степени расправленными с характерными для вторичной структуры стабильными элементами—так называемыми «шпильками». Так, для картирования элементов вторичной структуры рибосомальных РНК (рРНК) из клеток HeLa был применен метод получения препаратов из 80%-ного комбинированного раствора формамида и мочевины [105]. Было показано при этом, что 18S рРНК не имеет видимых элементов вторичной структуры, в то время как в более обогащенной гуанином и цитозином 28S рРНК имеется несколько отчетливых, закономерно расположенных «шпильек» (обращенных повторов вдоль молекул). Хотя в литературе имеются данные о гетерогенности вторичной структуры в 45S рибосомальном пред-

шественнике [97], столь же характерные стабильные «шпильки» были обнаружены и у ряда предшественников рибосомальных рРНК из клеток HeLa. Сопоставление карт вторичной структуры рРНК и их предшественников позволило картировать участки рРНК и промежутки между ними в предшественниках. Таким образом, на основании электронномикроскопических данных была предложена схема процессингирования (созревания) рРНК в клетках HeLa. Обработка специфической экзонуклеазой 3' конца 28S рРНК позволила ориентировать карту вторичной структуры относительно физических (визуализированных в электронном микроскопе) концов 28S рРНК. Аналогичную картину наблюдали с помощью этого технического приема при изучении процесса созревания рРНК в температурно-чувствительном мутанте клеточной линии ВНК-21 [109]. Имеются сравнительные сведения относительно структурной организации рРНК и их предшественников также для большого числа видов позвоночных [92]. Обнаружено, что в ходе эволюции увеличивался как молекулярный вес предшественников рРНК, так и величина «шпилек» вторичной структуры. Взаимное же расположение «шпилек» вдоль молекул РНК и их число в общем не изменялись. Таким образом, было показано, что участки предшественников, отсутствующие в созревших рРНК, претерпели большую эволюцию, чем элементы вторичной структуры 28S рРНК.

Метод электронномикроскопического картирования вторичной структуры использовался и для анализа рДНК [104]. ДНК денатурировали и готовили препараты из растворов с 10%-ным содержанием формамида и 0,4 М мочевины. При этом обнаруживались те же элементы вторичной структуры, что и в рРНК, денатурированных в 80%-ной мочевино-формамиде. Таким образом, были выявлены гетерогенность в транскрибируемых и нетранскрибируемых промежуточных районах рДНК и гомогенность в участках, кодирующих рРНК.

Методы построения денатурационных карт и конструирования гетеродуплексов успешно были использованы также при изучении структурной организации геномов РНК-содержащих вирусов [12, 19]. Сравнительный анализ физических карт геномов двух пикорнавирусов—вируса энцефаломиокардита и вируса полиомиелита типа I (репликативные двунитевые РНК) показал значительные отличия в количестве денатурированных участков. Большая степень денатурации (распределения АУ-пар) наблюдалась у вируса полиомиелита. Построение таких карт вирусов позволит в дальнейшем выявить делеции у дефектных интерферирующих частиц [19]. Анализ гетеродуплексных РНК (геномы вирусов полиомиелита типов I и III) обнаружил, что молекулярный вес этих двух типов вирусов приблизительно одинаков и эволюция геномов у них осуществляется путем накопления точечных мутаций, а не за счет протяженных вставок и делеций. На это указывает отсутствие характерной одноцепочечной петли, отходящей от двуспиральных областей сконструированных гетеродуплексов [12].

Относительно недавно появились данные, свидетельствующие о наличии в ядрах эукариотов стабильных видов РНК (нерибосомальной

природы) с параметрами седиментации 28S и 18S [13, 17, 98]. Так, выделен из эритробластов голубя новый вид стабильной ядерной РНК (28S) с характерной для нее вторичной структурой, заметно отличающейся от структуры как информационной РНК голубя, так и 28S рРНК [17]. Предполагается [48], что стабильная 28S ядерная РНК соответствует интерхроматиновым гранулам, выявляемым электронномикроскопически в интерфазных ядрах эукариотических клеток [82]. Что же касается назначения этих ядерных РНК, то этот вопрос остается еще открытым. Однако авторы полагают, что «в ядре могут запасаться не только зрелые информационные РНК, но и их гигантские предшественники» [28]. Такая форма запасаения информационных РНК может иметь определенный смысл в плане расширения возможностей посттранскрипционной регуляции, так как большее число неинформативных последовательностей открывает возможности для более сложной системы селекции и переноса в цитоплазму требуемых информационных РНК. Роль узнавающих сайтов могут выполнять многочисленные «шипильки» и копии с повторов, имеющиеся в стабильных ядерных РНК [5].

Электронномикроскопическое картирование вторичных структур ядерных стабильных РНК находится в стадии изучения (рис. 1).

Резюмируя, следует отметить, что приведенный материал демонстрирует существенное преимущество электронномикроскопического подхода к анализу структуры нуклеиновых кислот: без особых модификаций одни и те же методы могут быть успешно использованы для изучения как эукариотического, так и прокариотического геномов. С помощью одних и тех же технических приемов обнаружены повторы и АТ-, ГЦ-богатые участки в структуре как прокариотов, так и эукариотов, а также выявлена степень гомологии геномов различных видов в зависимости от их эволюционного родства.

Если в структурной организации геномов на уровне ДНК особых различий между эукариотами и прокариотами не выявляется, то в основных молекулярных механизмах функционирования генома эукариотов обнаружен целый ряд особенностей: разобщенность в процессах транскрипции и трансляции; более сложная организация генома, а также механизма регуляции генной активности и, наконец, способность к дифференцировке. Тот факт, что геномы многих организмов имеют нуклеотидные последовательности в избыточном количестве (например, на один ген у дрозофилы в среднем приходится в 20—30 раз больше ДНК, чем это требуется для синтеза соответствующего белка [1], или гигантская плазмиды с молекулярным весом 202 мегадальтон, для которой единственные известные функции—это катаболизм толуола и конъюгационный перенос [35]), скорее говорит в пользу усложнения регуляторных процессов, по крайней мере у эукариотов (точка зрения Бриттена—Дэвидсона), чем об увеличении числа генов. Поэтому, когда еще нет единого мнения относительно организации и функционирования геномов, особенно у эукариотических организмов, очевидна

необходимость сочетанного анализа данных генетических, биохимических и электронномикроскопических исследований, проводимых в настоящее время.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 12.11 1979

ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԸ

(էլեկտրոնային մանրադիտակի տվյալների հիման վրա)

Ս. Մ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Մ. Հ. ԳԱԼՈՒՍՏՅԱՆ

Աշխատանքում ներկայացված են վերջին տարիներին կատակված էլեկտրոնամանրադիտակային տվյալները պրո- և էուկարիոտների, ինչպես նաև վիրուսների ԴՆԹ-ի կառուցվածքի մասին:

Առանձին բաժնում քննարկվել է արտաբրոմատոմալ տարրերի (պլազմիդներ, միտոքոնդրիալ ԴՆԹ) կառուցվածքի առանձնահատկությունները: Նկարագրված են հիմնական էլեկտրոնամանրադիտակային մոտեցումները, որոնց շնորհիվ ուսումնասիրվում են նշված օրգանիզմների նուկլեինաթթուների կառուցվածքը և էլեկտրոնային մանրադիտակի դերը գենոմի դետերմինացիայի ֆունկցիայի և քսպրեսիայի մոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրման մեջ:

STRUCTURAL ORGANIZATION OF NUCLEIC ACIDS

(according to new electron-microscopic data)

S. M. AKOPIAN, M. G. GALUSTIAN

The electron-microscopic data of last years on the structural organization of nucleic acids of pro- and eucaryotes and DNA viruses are presented. In a separate section the peculiarities of the extrachromosomal elements structure (plasmides and mitochondrial DNA) are examined.

The general electron-microscopic methods for study of the structural organization of nucleic acids are described. The importance of the electron-microscopic research of molecular mechanisms for determination of genom functions and its expression is shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабян А. С., Захарян Р. А., Акопян С. М., Бакунц К. А., Израелян Ю. А., Азарян Н. Г. Микробиология, 27, 97, 1978.
2. Акопян С. М., Захарян Р. А., Агабян А. С., Захарян Э. Г., Кочарян Ш. М. XV Чехослов. конф. по электронной микроскопии. 13, 1977.
3. Бозуш В. Г., Каратаев Г. И., Баев А. С., Пермогоров В. И. Мол. биол., 11, 5, 1167, 1977.
4. Бозуш В. Г., Смирнов В. Б., Ребенкиш Б. А., Пермогоров В. И., Азизбекян Р. Р. Мол. биол., 11, 4, 901, 1977.
5. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Онтогенез, 9, 1, 20, 1977.

6. Гаузе Г. Г. Митохондриальная ДНК. М., 1968.
7. Гаузе Г. Г., Михайлов В. С. ДАН СССР, 217, 1197, 1974.
8. Дектярев С. В., Акифьев А. П. ДАН СССР, 224, 2, 449, 1975.
9. Захарян Р. А., Агабалин А. С., Акопян С. М., Гаспарян Н. С., Кочарян Ш. М. Биолог. ж. Армении, 8, 818, 1978.
10. Захарян Р. А., Агабалин А. С., Акопян С. М., Кочарян Ш. М., Боронин А. М. ДАН СССР, 232, 482, 1977.
11. Куприянова Н. С., Тимофеева М. Я., Баев А. А. Мол. биол., 10, 412, 1976.
12. Липская Г. Ю., Чулаков Н. М., Агол В. И. ДАН СССР, 235, 965, 1977.
13. Лихтечштейн А. В., Картошкин В. М., Пикер Е. Г., Шапот В. С. Мол. биол., 8, 703, 1974.
14. Майнелл Г. Бактериальные плазмиды. М., 1976.
15. Насс М. М. К. Сб.: Молекулярная генетика митохондрий. 184, Л., 1977.
16. Степанов А. И., Якубов Л. З., Абаланина Е. Г., Бабуров М. Ю. ДАН СССР, 238, 1462, 1978.
17. Тирантул В. З., Липасева В. А., Баранов Ю. И., Газарян К. Г. Мол. биол., 3, 864, 1974.
18. Черч Р. Б., Рысков А. П., Георгиев Г. П. Мол. биол., 8, 631, 1974.
19. Чулаков Н. М., Липская Г. Ю., Агол В. И. ДАН СССР, 232, 969, 1977.
20. Шугалий А. В., Митрохин Ю. Н., Герман А. В., Галкин А. П., Тодоров И. Н. ДАН СССР, 214, 1218, 1976.
21. Якубов Л. З., Абаланина Е. Г., Бабуров М. Ю., Степанов А. И. Генетика, 14, 1863, 1978.
22. Antoni N. W., Deonier R. C., Lee H.-J., Hsu M.-T., Ohtsubo E., Davidson N., Broda P. J. Mol., 89, 647, 1974.
23. Beermann W. In: Results and problems in cell differentiation, Springer. Berlin—Heidelberg—N. Y., 4, 1, 1973.
24. Berns K. G., Kelly T. J. J. Mol. Biol., 82, 267, 1974.
25. Borst P., Rattenberg G. J. C. M. Biochem. et Biophys. Acta, 114, 645, 1966.
26. Brown W. M., Vinograd J. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 71, 4617, 1974.
27. Brown D. D., Wensink P. C., Jordan E. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 68, 3175, 1971.
28. Chan L.—N. L. Nature, 261, 157, 1976.
29. Chattazaj D. K., Inman R. B. Virology, 55, 174, 1973.
30. Cherny D., Aleksandrow A. A., Larudnaya L. J., Kasaganow Yu. N., Lazurkin Yu. S., Beabealashvilli R. Sch., Savochkina L. P. Eur. J. Biochem., 79, 309, 1977.
31. Chow L., Davidson N. J. Mol. Biol., 75, 265, 1973.
32. Clayton D. A., Vinograd J. Nature, 216, 652, 1967.
33. Clowes R. S. Bact. Rev., 36, 361, 1972.
34. Cozzarelli N. K., Kelly R. B., Kornberg A. A. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 60, 992, 1968.
35. Daggley C. J., Bayley S. A., Worsley M. J., Williams P. A., Broda P. J. of Bacter., 130, 1274, 1977.
36. Davidson E. H., Gatan G. A., Angerer R. C., Britten R. J. Chromosoma, 51, 253, 1975.
37. Davits R., Davidson N. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 60, 243, 1968.
38. Davis R., Parkinson J. S. J. Mol. Biol., 56, 403, 1971.
39. Davis R., Simon M., Davidson N. Methods in Enzymology, 21D, 413, 1971.
40. Deininger P. L., Schmidt C. W. J. Mol. Biol., 105, 773, 1976.
41. Delius H., Westphal V., Axelrod N. J. Mol. Biol., 74, 677, 1973.
42. Dressler D., Wolfson J., Magarin M. Proc. Nat. Acad. Sci Wash., 69, 998, 1972.
43. Fauron C. M.—R., Wolstenholme D. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3623, 1976.
44. Ferguson J., Davits R. W. J. Mol. Biol., 94, 135, 1975.
45. Forshett A. B., Davidson N., Brown P. B. J. Mol. Biol., 90, 301, 1974.

46. Frenkel N., Jacob R. J., Honess K. W., Hayward G., Koczer H. J. of Virology 16, 153, 1975.
47. Garon C. F., Berry K. W., Hierholzer J. C., Rose J. A. Virology. 54, 414, 1973.
48. Gasaryan K. G., Nicolaew A. J., Tarantul V. Z. FEBS Lett., 84, 320, 1977.
49. Gerry N., Kelly T. J., Berns K. Y. J. Mol. Biol., 79, 207, 1973.
50. Goebel W., Hellnski D. R. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 61, 1406, 1968.
51. Gomez B., Lang D. J. Mol. Biol., 70, 239, 1972.
52. Helinski D. R., Clewel D. B. Ann. Rev. Biochem., 40, 885, 1971.
53. Hradecna Z., Szybalski W. Virology, 32, 633, 1967.
54. Hsu M.—T., Davidson N. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 69, 2823, 1972.
55. Hsu M.—T., Davidson N. Virology, 58, 229, 1975.
56. Hudson B., Vinograd J. Nature, 216, 647, 1967.
57. Inman R. B., Sehnos M. J. Mol. Biol., 49, 93, 1970.
58. Janiv M., Croissan T. O., Cuzin F. Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 1074, 1974.
59. Kelly T. J. J. of Virology, 15, 1267, 1975.
60. Kelly T. J., Lewis A. M., Lewine A. S., Siegel S. J. Mol. Biol., 89, 113, 1974.
61. Kleckner N., Chan R., Tye B., Batstein D. J. Mol. Biol., 97, 561, 1975.
62. Kleinschmidt A. K. Methods in Enzymology, 12B, 361, 1968.
63. Kleinschmidt A. K., Zanu R. Z. Naturforsch., 14b, 770, 1959.
64. Kocrot F. T., Carter B. J., Garon C. F., Rase J. A. Proc. Nat. Acad. Sci USA 70, 215, 1973.
65. Kontomichalon P., Maitani M., Clowes R. C. J. Bact., 104, 33, 1970.
66. Lang D., Maitani M. Biopolymers, 9, 373, 1970.
67. Lee C. S., Davidson N. Biochem. Biophys. Res Commun., 32, 757, 1968.
68. Lai G. G., Nathans D. J. Mol. Biol., 89, 179, 1974.
69. Lerense R., Yavin M. J. of Virology, 16, 720, 1975.
70. Mac Hattie L. A., Thomas C. A. Science, 144, 1142, 1964.
71. Mac Hattie L. A., Ritchie C., Thomas C. A. J. Mol. Biol., 23, 355, 1967.
72. Merlo D. J., Nester E. W. J. of Bacter., 119, 76, 1977.
73. Mertz J. E., Berg P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4879, 1974.
74. Monjardino J., James A. W, Nature, 255, 242, 1954.
75. Mulder C., Delius H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3215, 1972.
76. Nass M. M. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1215, 1966.
77. Nuti M. P., Ledebor A. M., Lepidl A. A., Schilpercort P. A. J. Gen. Microbiol, 100, 241, 1977.
78. Ohtsubo E., Doenier R., Lee H.—J., Davidson N. J. Mol. Biol., 84, 565, 1974.
79. Potter S. S., Newbold J. E., Hutchison C. A., Edgell M. H. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 72, 4496, 1975.
80. Pruss G., Goldstein A. N., Calendar R. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 6, 2367, 1974.
81. Pulleyblank D., Morgan A. J. Mol. Biol., 94, 1, 1975.
82. Puvion E., Bernhard W. J. Cell Biol., 67, 200, 1975.
83. Pyeritz R. E., Thomas C. A. J. Mol. Biol., 87, 463, 1974.
84. Radloff R., Baner W., Vinograd J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1514, 1967.
85. Rhoades M., Rhoades E. J. Mol. Biol., 69, 187, 1972.
86. Rhoades M., Thomas C. A. J. Mol. Biol., 37, 45, 1968.
87. Ritchie D., Thomas C. A., Mac Hattie L. A., Wensink P. C. J. Mol. Biol., 23, 365, 1967.
88. Robberson D., Aloni Y., Attardi G., Davidson N. J. Mol. Biol., 60, 473, 1971.
89. Robberson D., Clayton D. A., Morrow J. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4447, 1974.
90. Ryskov A. P., Kramerov D. A., Georgiev G. P. Biochem. et. biophys. Acta, 447, 214, 1976.
91. Saigo K. Virology, 68, 166, 1975.

92. Schibler U., Wyler T., Hagenauhle O. J. *Mol. Biol.*, 91, 503, 1975.
93. Shahrabadi M., Bryan L., Van Den Elzen H. J. *Gen. Microbiol.* 21, 592, 1975.
94. Sharp P., Cohen S., Davidson N. J. *Mol. Biol.*, 75, 235, 1973.
95. Schnos M., Inman R. B. J. *Mol. Biol.*, 51, 612, 1970.
96. Simon M., Studier F. M. J. *Mol. Biol.*, 79, 249, 1973.
97. Slach J. H. W., Sartirana M.—L., Loening H. E. *Nature*, 253, 282, 1975.
98. Spohr G., Imaizumi T., Scherrer K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 5009, 1974.
99. Szybalski W., Szybalski J. *H. Cancer*, 4, 536, 1974.
100. Thomas C. A., Pyeritz R. E. et. al. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 38, 353, 1974.
101. Tye B., Chan R., Batstein D. J. *Mol. Biol.*, 85, 485, 1974.
102. Wadsworth S., Jacob R. J., Roizman B. J. *J. of Virology*, 15, 1487, 1975.
103. Walfson J., Dressler D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3054, 1972.
104. Wellauer P. K., David I. B. J. *Mol. Biol.*, 89, 379, 1974.
105. Wellauer P. K., David I. B., Kelly D. E., Perry R. P. J. *Mol. Biol.*, 89, 357, 1974.
106. Wellauer R. K., Weber R., Wyler T. J. *Ultrastruct. Res.*, 42, 377, 1973.
107. Westmoreland B., Szybalski W., Ris H. *Science*, 163, 1343, 1969.
108. Wilson D., Thomas C. A. J. *Mol. Biol.*, 84, 115, 1974.
109. Wintcow I. J. *Mol. Biol.*, 100, 141, 1976.
110. Wolstenholme D. R., Kirschner R. G., Gross N. J. J. *Cell Biol.*, 53, 393, 1972.
111. Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. J. *Mol. Biol.*, 86, 109, 1974.

ЦИРКУЛЯРНЫЕ ДНК ИЗ КЛЕТОК САРКОМЫ-45 КРЫС

А. С. АГАБАЛЯН, Р. Г. ПОГОСЯН, Г. М. СТЕПАНЯН, С. А. ПАШИНЯН,
 Ю. А. ИСРАЕЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, Б. Т. ГАРИБДЖАНЫАН

В работе изучались физико-химические и биологические свойства ДНК, выделенной из субклеточных фракций клеток саркомы-45, полученной химическим канцерогенезом. В ядерной и митохондриальной фракциях обнаружены добавочные ДНК с молекулярными весами 3 и 5 мгд, установлена их циркулярная природа. Обнаруженные добавочные молекулы циркулярных ДНК обладали выраженной биологической активностью.

Одним из важнейших открытий в области изучения структуры и функции онкорнавирусов явилось открытие обратной транскриптазы, фермента, посредством которого осуществляется синтез ДНК на матрице РНК. В результате этого процесса формируется промежуточная форма ДНК, «провирус», которая в клетке находится в различных состояниях—интегрированной и свободной, линейной и циркулярной, но почти всегда обладает инфекционными свойствами. Молекулярный вес этих ДНК обычно варьирует в пределах 2—10 мегадальтон (мгд) [4, 5].

В свете сказанного представлялось интересным изучить некоторые физико-химические и биологические свойства ДНК в клетках трансплантированной саркомы-45, первоначально полученной химическим канцерогенезом.

Материал и методика. Опухоль, саркома-45, трансплантировалась крысам по общепринятой методике [2]. Опухолевые клетки, полученные от животных на 15-е сутки перевивки, разрушали в стеклянном гомогенизаторе в 10-ти объемах буфера, содержащего 0,05 М трис-НСl, рН 7,7, 0,005 М MgCl₂, 0,025 М KCl, 0,25 М сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин при 4°. Осадок (ядерная фракция) отбирали, а надосадочную жидкость (митохондриальная—микросомальная фракция) центрифугировали при 16000 об/мин в течение 30 мин при 4°. В результате чего получали митохондриальную фракцию. Оба осадка (ядерная и митохондриальная фракции) суспендировали в указанном выше буфере и использовали в дальнейшей работе. Экстракцию ДНК из субклеточных фракций проводили по Мармуре [7]. Количественные и качественные характеристики препаратов ДНК определяли спектрофотометрически.

Электрофоретическую идентификацию ДНК из субклеточных фракций проводили в 0,6%-ном геле агарозы с интеркалирующей краской, этидий бромидом. Окрашенные полосы ДНК элюировали с гелей, элюат осаждали холодным свежеперегнаным этанолом при —20° в течение 4 час., после чего осадок растворяли в буфере с 0,05 М трис-НСl, рН 7,4, и 0,05 М NaCl. Гидролиз РНК в препаратах осуществляли при помощи панкреатической РНК-азы (20 мкг/мл) при 37° в течение 30 мин.

Результаты и обсуждение. После экстракции ДНК получили два препарата: ДНК из ядерной и митохондриальной фракций. На рис. 1 показано, что при электрофорезе в 0,6%-ном агарозном геле в ДНК ядерной фракции наряду с высокомолекулярной хромосомной ДНК (около 30 мгд) присутствуют по крайней мере еще три добавочные ДНК с различными молекулярными весами (10, 5 и 3 мгд). В препаратах ДНК из митохондриальной фракции выявлены две добавочные полосы низкомолекулярной ДНК (5 и 3 мгд).

В серии экспериментов, поставленных с целью изучения добавочных ДНК, было обнаружено, что низкомолекулярные добавочные ДНК обеих фракций имеют циркулярную природу. Этот факт был установлен в результате неоднократного замораживания и оттаивания препаратов ДНК. После двух-трехкратного замораживания и оттаивания при электрофорезе выявляются уже не две окрашенные полосы в нижней части геля, а четыре, которые в свою очередь после последующих замораживаний и оттаиваний вновь проявляются в виде двух полосок (рис. 2). Однако миграция этих молекул в геле четко различает-

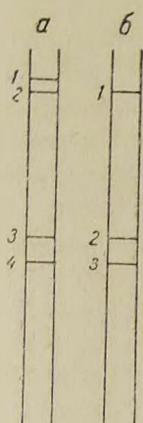


Рис. 1.

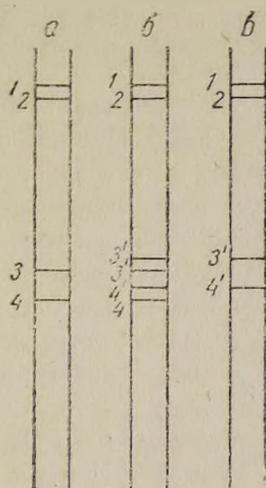


Рис. 2.

Рис. 1. Электрофорез ДНК, выделенной из саркомы-45 крыс. а) ДНК из ядерной фракции. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. б) ДНК из митохондриальной фракции. 1—митохондриальная ДНК—10 мгд, 2—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—3 мгд.

Рис. 2. Электрофорез ДНК, выделенной из саркомы-45, после неоднократного замораживания и оттаивания. а) ДНК из ядерной фракции до замораживания и оттаивания. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. б) ДНК из ядерной фракции после замораживания и оттаивания. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3'—открытая циркулярная форма ДНК—5 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4'—открытая циркулярная форма ДНК—3 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. в) 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3'—открытая циркулярная форма ДНК—5 мгд, 4'—открытая циркулярная форма ДНК—3 мгд.

ся от первоначальной. Описанное явление имеет место при переходе суперспирализованных молекул ДНК в открытые циркулярные формы. Подобный конформационный переход ковалентно замкнутых циркулярных ДНК в открытую циркулярную форму вследствие неоднократного замораживания и оттаивания описан в ряде сообщений [3, 8].

Полученные нами данные о конформационном изменении ДНК из субклеточных фракций опухоли саркомы-45 доказывают циркулярную природу обнаруженных низкомолекулярных добавочных ДНК. ДНК же с молекулярным весом 10 мгд аналогична митохондриальной и, возможно, является примесью последней.

В специальных экспериментах изучались канцерогенные свойства суммарных препаратов ДНК, экстрагированных из саркомы-45.

В опыт брали белых беспородных крыс-самцов весом 90—110 г. Суммарные препараты ДНК из ядерной и митохондриальной фракций растворяли в физиологическом растворе, содержащем ДЭАЭ-декстран (0.5 мг/мл). Суспензию вводили интактным животным, причем одна половина получала препарат в дозе 1 мг, а другая—0.5 мг. Контрольные животные получали только физиологический раствор с ДЭАЭ-декстраном. Препараты вводились подкожно в левый бок животного. Введение препаратов ДНК с ДЭАЭ-декстраном обеспечивало защиту ДНК от действия клеточных нуклеаз. Это свойство ДЭАЭ-декстрана описано нами ранее [1].

Ежедневные наблюдения показали, что через 6 суток у всех крыс подопытной группы образовались небольшие, размером с чечевичку, опухолеподобные образования. У контрольных животных подобные образования полностью отсутствовали. Наблюдения, проводимые в течение месяца, не выявили дальнейшего роста этих образований.

На 30-е сутки по 5 крыс из подопытной и контрольной групп были забиты для гистологического анализа. У подопытных животных в подкожной клетчатке были обнаружены плотные, капсулированные опухолевидные образования размером с чечевичку, которые отсутствовали в контроле.

Микроскопический анализ подкожной клетчатки показал, что у подопытных животных, по сравнению с контрольными, произошло заметное разрастание опухолеподобной ткани, с выраженным клеточным и тканевым атипизмом, что напоминает картину изменений при опухолях соединительнотканного происхождения. В паренхиме опухолеподобного разрастания встречаются очаги некроза и лимфогистоцитарные инфильтраты (рис. 3).

Полученные нами данные говорят о биологической активности обнаруженных циркулярных молекул ДНК. Имеют ли эти ДНК вирусную природу или являются нуклеиновыми кислотами клеточного происхождения, сказать пока трудно.

Хюбнер и Тодаро [6] сформулировали гипотезу, предполагающую вертикальную передачу информации РНК-содержащего вируса С-типа (виروهена) у большинства позвоночных. Этот виروهен служит эндогенным источником онкогенной информации онкогеном, который транс-

формирует нормальную клетку в опухолевую. По предположению авторов, все спонтанные или индуцированные химическим или физическими канцерогенными агентами опухоли являются результатом депрес-

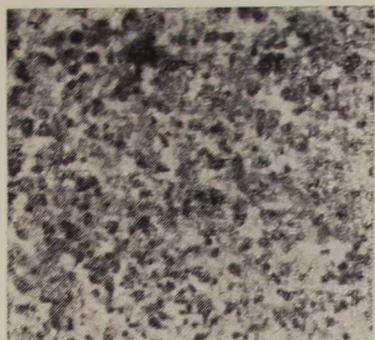


Рис. 3. Очаги некроза на паренхиме опухолеподобной ткани. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. 250.

сии онкогена в геноме клетки. Выявленные нами добавочные ДНК в субклеточных фракциях опухоли могут быть следствием активации онкогена в геноме и стимуляции нового синтеза, в результате которого формируются циркулярные ДНК, обладающие биологической активностью.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна
АН АрмССР

Поступило 21.II 1979 г.

ՅԻՐԿՈՒԼՅԱՐ ԴՆԹ ՍԱՐԿՈՄԱ—45 ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՌԻՌՈՒՅՔԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻՑ

Ա. Ս. ԱՂԱՐՍՅԱՆ, Ռ. Գ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Գ. Ս. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ս. Ա. ՓԱՇԻՆՅԱՆ,
ՅՈՒ. Ա. ԻՍՐԱՅԻՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Բ. Տ. ՂԱՐԻՔՉԱՆՅԱՆ

Հոդվածը նվիրված է ԴՆԹ-ի ֆրիզիկա-քիմիական և կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրմանը, որն անջատված է քիմիական կանցերոգենով ստացված սարկոմա—45 ուռուցքային բջիջների ենթաբջջային ֆրակցիաներից:

Պարզվել է, որ միջուկային և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում կան լրացուցիչ ԴՆԹ-ներ՝ 3 և 5 մդզ մոլեկուլյար կշիռներով: Հաստատվել է նրանց ցիրկուլյար բնույթը: Յույց է տրվում, որ այդ լրացուցիչ ԴՆԹ-ներն ունեն խիստ արտահայտված կենսաբանական ակտիվություն, քանի որ նրանց ներմտումը ինտակտ կենդանիների օրգանիզմի մեջ վերջիններիս մոտ առաջացնում է ուռուցքանման աճեր:

THE CIRCULAR DNA FROM SARCOMA TUMOR CELLS

A. S. AGABALIAN, R. G. POGOSIAN, G. M. STEPANIAN, S. A. PASHINIAN,
Y. A. ISRAELIAN, R. A. ZAKARIAN, B. T. GARIBDJANIAN

The physico-chemical and biological properties of DNA isolated from subcell fractions of sarcoma 45 tumor cells received by chemical cancerogen has been studied. Supplementary DNA with molecular weights 3 and 5 megadaltons in the nuclear and mitochondrial fractions have been found and the circular nature of these DNA has been established. Supplementary DNA possesses sharply expressed biological activity—after their injection into intact animals in latters appear tumor-like accretions with all the features characteristic for the tumor-like tissue.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабян А. С., Мельших Л. К., Ершов Ф. И. *Вопр. вирусол.*, 5, 527—531, 1971.
2. Чернов В. А. *Методы экспериментальной химиотерапии*. 357, М., 1971.
3. Aaij C., Borst P. *Biochim. Biophys. Acta*, 269, 197—200, 1972.
4. Canaoni E., Duesberg P., Dino D. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 29—33, 1977.]
5. Gianni A., Hulton J., Smotcin D., Weinberg R. *Science*, 191, 569—571, 1972.
6. Huebner R., Todaro J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 1087—1094, 1969.
7. Marmur J. J. *Mol. Biol.*, 12, 468—487, 1961.
8. Meyers J., Sanchez D., Etwell L., Falkow S. *J. Bacteriol.*, 127, 1529—1537, 1976.

О СИНТЕЗЕ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Ю. Т. АЛЕКСАНЯН

В работе приводятся данные о способности опухолевых клеток в культуре синтезировать сывороточные белки. Рассматривается значение этих белков для маркирования длительно культивируемых опухолевых клеток.

Одной из актуальных задач молекулярно-клеточной биологии является иммунологический анализ способности культивируемых опухолевых клеток синтезировать альфа-фетопротейн и другие сывороточные белки.

В 1963 г. Г. И. Абелевым с сотр. было установлено, что в печени новорожденных мышей в большом количестве содержится антиген, который ранее считался специфичным для мышинной гепатомы [1]. Этот антиген был идентифицирован как нормальный компонент сыворотки плода—эмбриоспецифический глобулин (альфа-фетопротейн). Концентрация его в сыворотке мышей—носителей гепатомы была выше, чем в самой опухоли. Был сделан вывод, что альфа-фетопротейн синтезируется клетками гепатомы и секретирует в кровь и, таким образом, является специфическим секретлируемым белком, синтез которого возобновляется в клетках печени при их малигнизации [2]. В дальнейшем тест на выявление альфа-фетопротейна приобрел большое практическое значение при диагностике первичного рака печени и тератобластом [9, 12, 17].

Изучение альфа-фетопротейна представляет также значительный теоретический интерес. Считается, что «...эмбриоспецифические антигены являются уникальной моделью для исследования механизмов, участвующих в регуляции белкового синтеза в онтогенезе и при злокачественной трансформации тканей» [1]. Существует представление, согласно которому эпигеномные изменения играют огромную роль в механизмах канцерогенеза [5, 8, 10]. Они обусловлены стойкими изменениями уровней и характера регуляции транскрипции при неизменном генотипе. Поскольку неопластическая трансформация клетки означает нарушение дифференцировки, а не просто возврат к эмбриональному состоянию, следует признать правильным использование термина дисдифференцировка [3]. Способность опухолевых клеток синтезировать эмбриональные антигены, по-видимому, свидетельствует об эпигеном-

ных изменениях в клетках при их малигнизации. Думается, что роль этих изменений в механизмах малигнизации если не решающая, то, по-видимому, весьма значительная и, следовательно, детальное изучение этого вопроса поможет понять сущность злокачественного роста. В этом аспекте значительный интерес представляет вопрос об использовании альфа-фетопротейна в качестве маркера при изучении дифференцировочных процессов в нормальных и опухолевых тканях [14].

Для иммунобиологической характеристики опухолевых клеток большое значение имеет изучение способности этих клеток при культивировании вне организма синтезировать альфа-фетопротейн, однако литература по этому вопросу представлена единичными данными.

В целях исследования способности культивируемых клеток асцитной формы перевиваемой мышинной гепатомы XXIIa синтезировать альфа-фетопротейн были получены три штамма культур асцитной гепатомы [16]. В течение первых недель роста они синтезировали альфа-фетопротейн, однако по мере дальнейшего пассирования утрачивали эту способность. Следует отметить, что в двух культурах произошла обратимая утрата способности синтезировать альфа-фетопротейн (у мышей при прививке культивируемых клеток образовывались опухоли и в сыворотках мышей-опухоленосителей обнаруживался альфа-фетопротейн). В третьей же культуре утрата синтеза альфа-фетопротейна оказалась необратимой. Однако опухоли, возникшие от прививки клеток этой культуры, хотя и не продуцировали альфа-фетопротейн, продолжали оставаться гепатомами. Авторами высказано мнение, что утрата культивируемыми клетками способности к синтезу этого белка связана с условиями роста клеток вне организма.

Синтез альфа-фетопротейна был выявлен также в культуре клеток рака печени человека [18]. Опухоли различных локализаций в отношении их способности синтезировать альфа-фетопротейн изучены еще не полностью. В этом аспекте определенный интерес представляет работа [15], авторы которой изучали наличие этого белка в культурах, полученных из тканей человеческого зародыша. С помощью методов иммуноавторадиографии и иммуноэлектрофореза альфа-фетопротейн был обнаружен в культурах, полученных из тканей печени, желточного мешка и желудочно-кишечного тракта. В культурах же из тканей других органов он не был обнаружен. Эти данные в определенной мере свидетельствуют о большей вероятности появления опухолей, синтезирующих альфа-фетопротейн, в желудочно-кишечном тракте (включая и печень), чем в других органах и тканях организма.

Нами была изучена возможность синтеза альфа-фетопротейна клетками линии МГХХIIa, полученной из солидной формы перевиваемой мышинной гепатомы XXIIa [4]. С помощью метода иммуноавторадиографии [11] было показано, что клетки гепатомы на протяжении трех лет культивирования сохраняли способность синтезировать альфа-фетопротейн. Была установлена также способность клеток клоновой культуры линии МГХХIIa (клоновая культура получена на третьем году

культивирования клеток гепатомы) продуцировать этот белок. Как показали наши последующие исследования, в культуральной среде клеток гепатомы, находящихся на 5-м году культивирования, методом иммуноавтордиографии альфа-фетопротени не обнаруживается. Однако этот белок выявляется методом микропреципитации в агаре с помощью тест-системы в сыворотках мышей с опухолями, образовавшимися после прививки клеток гепатомы тех же сроков культивирования. Эти данные свидетельствуют о том, что на 5-м году культивирования утрата клетками гепатомы способности синтезировать альфа-фетопротени носила обратимый характер. Однако на 8-м году культивирования отмечалась необратимая супрессия синтеза этого белка.

Следует отметить, что для разработки проблемы иммунобиологии опухолевых клеток огромное значение имеет выяснение вопроса о сохранении или утрате опухолеспецифических антигенов длительно культивируемых опухолевых клеток. Синтез альфа-фетопротенина опухолевой клеткой является иммунологическим проявлением процесса дифференцировки при малигнизации. Поэтому большое значение приобретает изучение способности культивируемых клеток синтезировать эмбриоспецифические белки. Это открывает возможность для изучения на молекулярно-клеточном уровне механизмов регуляции синтеза клетками эмбриональных белков, а также факторов, играющих роль в этом процессе. Культивирование опухолевых клеток, обладающих способностью синтезировать эмбриональные белки, имеет определенное значение для выяснения вопроса о том, является ли синтез эмбриоспецифических белков лишь характерным признаком опухолевых клеток или же отражает саму сущность злокачественного роста. В опытах Ирлина и соавт. [16], как было отмечено, одна из культур гепатомных клеток утратила способность синтезировать альфа-фетопротенин, однако опухоли, возникшие от прививки клеток этой культуры, хотя и не синтезировали этот белок, тем не менее продолжали оставаться гепатомами. Нами было показано, что при прививке мышам клеток гепатомы, находящихся на 8-м году культивирования, образовывались опухоли, но они не продуцировали альфа-фетопротенин. В этом же аспекте интересны данные о существовании «сероположительных» и «сероотрицательных» гепатом, т. е. гепатом, продуцирующих и не продуцирующих альфа-фетопротенин [1]. Учитывая эти соображения, можно, по-видимому, предположить, что синтез альфа-фетопротенина является характерным, но не обязательным признаком малигнизированной клетки.

Сохранение или утрата способности синтезировать альфа-фетопротенин длительно культивируемыми опухолевыми клетками, по-видимому, зависит от самой ткани и клеток, используемых для эксплантации. Иначе трудно объяснить причину сохранения в течение нескольких лет

Работа по изучению способности клеток линии МГХХ1а синтезировать альфа-фетопротенин, альбумин и трансферрин выполнена нами в лаборатории иммунохимии опухолей ОНЦ АМН СССР.

способности к синтезу альфа-фетопротейна клетками линии МГХХIIa, полученными из солидной формы мышинной гепатомы ХХIIa, и утрату через несколько недель этой способности клетками, полученными из асцитной формы той же гепатомы. Определенную роль, по-видимому, играют также какие-то факторы, влияющие на клетки в условиях культивирования их вне организма.

В последнее время способность культивируемых клеток продуцировать альфа-фетопротейн была использована в качестве маркера при гибридизации культивируемых соматических клеток [6]. В этом аспекте значительный интерес представляет также способность культивируемых клеток синтезировать другие сывороточные белки.

Показано, что культуры эмбриональной мышинной печени сохраняют способность синтезировать сывороточный альбумин [7]. Культуры, полученные из асцитной формы перевиваемой мышинной гепатомы ХХIIa, постоянно на протяжении многих месяцев синтезировали характерные белки сыворотки (альбумин и трансферрин) [16]. Исключение составляла одна культура, в которой на 7-й неделе культивирования прекратился синтез сывороточного альбумина.

Нами с помощью метода иммуноавторадиографии показано сохранение способности клеток гепатомы (клеток линии МГХХIIa), находящихся на 5-м и 8-м годах культивирования, синтезировать трансферрин. Этот белок синтезировался и клоновыми культурами, полученными на 8-м году культивирования клеток гепатомы. На 5-м году клетки гепатомы продолжали синтезировать альбумин, однако на 8-м году этот белок не синтезировался. С помощью метода иммуноавторадиографии трансферрин и альбумин были обнаружены также в культуральной среде эксплантата опухоли (1—3-й месяцы эксплантации клеток), образовавшейся у мышей линии СЗНА после прививки клеток гепатомы пятого года культивирования и пассированной в течение четырех генераций.

Сохранение синтеза трансферрина и альбумина длительно культивируемыми клетками мышинной гепатомы является одним из немногочисленных примеров сохранения органоспецифических свойств опухолевых клеток при их длительной эксплантации.

Способность культивируемых клеток крысиной гепатомы синтезировать альбумин была использована при изучении дифференцировочных процессов при гибридизации соматических клеток [13].

Таким образом, маркирование культивируемых опухолевых клеток по их способности синтезировать определенные сывороточные белки может быть широко использовано в целях изучения ряда вопросов экспериментальной онкологии, клеточной дифференцировки и генетики соматических клеток.

ԿՈՒՎՏԻՎԱՅՎՈՂ ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ
ՇԻՃՈՒԿԱՅԻՆ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԻ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

ՅԵՒ. Ք. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ

Հոդվածում քննվում է շիճուկային սպիտակուցների (ալֆա-ֆետոպրոտեին, ալբումին, տրանսֆերին) սինթեզի հարցը երկարատև կուլտիվացվող ուսուցքային բջիջների կողմից:

Ներկայացված են տվյալներ կուլտիվացվող բջիջների դրոշմման նշանակության մասին՝ ըստ այդ սպիտակուցների սինթեզի:

ON THE SYNTHESIZE OF THE SERUM PROTEINS
BY CULTIVATED TUMOR CELLS

Yu. T. ALEKSANYAN

The data on the ability of tumor cells to synthesise serum proteins in culture are cited. The significance of the protein study for marking the long cultivated tumor cells is considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абелев Г. И. Вестн. АМН СССР, 7, 49, 1970.
2. Абелев Г. И., Перова С. Д., Храмова Н. И., Постникова З. А., Ирлин И. С. Биохимия, 28, 4, 625, 1963.
3. Лишарин И. П., Лызлова С. Н., Саямон Л. С. Цитология, 14, 12, 1538, 1972.
4. Басмаджян М. Е., Алексанян Ю. Т. Бюлл. exper биол., 10, 84, 1974.
5. Голубев Д. Б., Шлянкевич М. А. Современные аспекты вирусной теории происхождения злокачественных новообразований. Л., 1972.
6. Кассио Д. Тез. докл. XIV Междунар. генетич. конгр., 1, 399, 1978.
7. Лурия Е. А., Бакиров Р. Д., Абелев Г. И., Фриденштейн А. Я. Бюлл. exper. биол., 3, 95, 1969.
8. Саямон Л. С. Рак и дисфункция клетки. Л., 1974.
9. Татаринцов Ю. С., Ногаллер А. М. Вопр. онкологии, 12, 26, 1966.
10. Фель В. Я., Швембергер И. Н. Морфологическое и иммунологическое изучение цитодифференцировки экспериментальных опухолей. Л., 1968.
11. Эльгорт Д. А., Абелев Г. И. Бюлл. exper. биол., 2, 118, 1971.
12. Эльгорт Д. А., Абелев Г. И., О'Конор Г. Т. Вестн. АМН СССР, 10, 69, 1972.
13. Эфрусси Б. Гибридизация соматических клеток. М., 1976.
14. Abelev G. I. Transplant. Rev., 20, 3, 1974.
15. Gittlin D., Perricelli A., Gittlin G. Cancer Res., 32, 5, 979, 1972.
16. Irllin I. S., Perova S. D., Abelev G. I. Int. J. Cancer, 1, 337, 1966.
17. O'Connor G. T., Tatarinow Yu. S., Abelev G. I., Uriel I. Cancer, 25, 5, 1091, 1970.
18. Quelin S., Rioche M., Bresson Y., Masseur R. C. R. Acad. Sci., 274, 5, 768, 1972.

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ ИЗОФЕРМЕНТОВ
 ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС

К. С. ДАНИЕЛЯН, Ж. П. АКОПЯН

Установлено соответствие наборов изоферментов лактатдегидрогеназы (ИФ ЛДГ) в тканях крыс закону биномиального распределения. Представлена теоретическая таблица с пропорциями Н:М, генерирующими наборы, близкие к полученным экспериментально; в ряде случаев числа раскладывались на 2 биномиальных набора с дополнительным указанием процентного состава гетерогенной клеточной популяции. Полученные результаты согласуются с представленными ранее расчетами относительно ИФ ЛДГ в тканях кроликов, а также с современными гистохимическими исследованиями и указывают на отсутствие существенного посттрансляционного контроля на уровнях агрегации мономеров Н и М в тетрамеры и деградации ИФ, избирательного к отдельным изоферментам ЛДГ.

В литературе нет единого мнения о доли вклада регуляторных процессов на уровнях транскрипции, трансляции, образования третичной и четвертичной структур и деградации в формировании стационарных наборов изоферментов лактатдегидрогеназы в тканях млекопитающих. Анализ степени близости экспериментальных данных по наборам ИФ ЛДГ закону биномиального распределения, описывающего процесс случайной независимой ассоциации мономеров ЛДГ в тетрамеры, может помочь выяснению роли посттрансляционного контроля в образовании тканеспецифических спектров ЛДГ [16, 19].

В настоящей работе проведен подобный математический анализ распределений ИФ ЛДГ в тканях крыс. Ранее нами были представлены аналогичные расчеты для имеющихся в литературе данных о наборах ИФ ЛДГ в тканях млекопитающих [5] и для собственного экспериментального материала по тканям кроликов [1].

Материал и методика. Опыты проводили на взрослых крысах-самцах весом 170—210 г. Гомогенаты тканей центрифугировали при 60 тыс. г. В надосадочной фракции разделяли и определяли ИФ ЛДГ методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле [9]. Гели сканировали с помощью специальной приставки, приспособленной к прибору Spесord uv vis [3].

Отношение Н:М рассчитывали на основе сравнения экспериментальных данных по наборам ИФ ЛДГ в тканях с числами, теоретически ожидаемыми в соответствии с известной в теории вероятностей формулой Бернулли $p_n(m) = C_p^m p^m q^{n-m}$ (в рассматриваемом случае $p = 4$, $q = 1 - p$). Экспериментально полученные числа в ряде случаев были разложены на 2 биномиальных набора в соответствии с формулой

$$P_{(m)} = z C_n^m p_1^m (1 - p_1)^{n-m} + (1 - z) \cdot C_n^m p_2^m (1 - p_2)^{n-m}$$

Коэффициент корреляции рассчитывали по известной в вариационной статистике формуле:

$$r = \frac{\sum xy - n\bar{x}\bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - n\bar{x}^2)(\sum y^2 - n\bar{y}^2)}}$$

Результаты и обсуждение. На рис. 1, 2 представлены электрофореграммы ИФ ЛДГ в исследованных тканях крыс. В табл. 1 приведены соответствующие им числа, характеризующие распределения изоферментов.

Электрофореграммы наборов ИФ ЛДГ из тканей крыс.

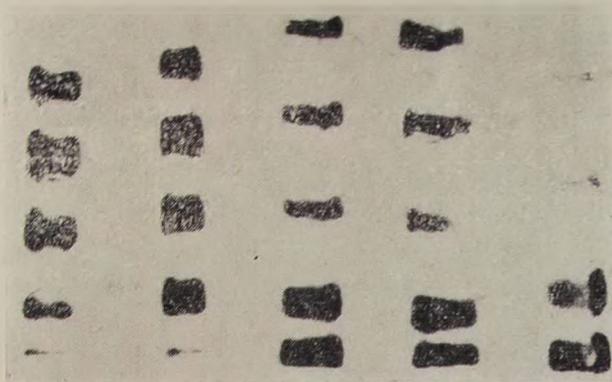


Рис. 1. ИФ ЛДГ из сердечной, камбаловидной, икроножной, пяточной и большой поясничной мышц.

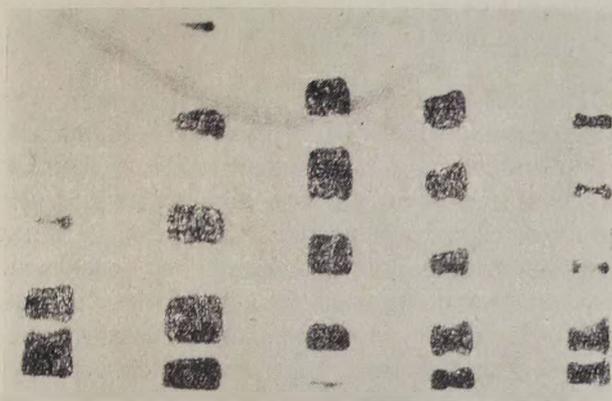


Рис. 2. ИФ ЛДГ из печени, селезенки, кожного (представлены 2 набора), мозгового и сосочкового слоев почек.

тов, а в табл. 2 — пропорции Н:М, генерирующие в соответствии с вышеуказанными формулами наборы ИФ, близкие к установленным. При значительном приближении экспериментальных данных к теоретическим ткань представлена как гомогенная популяция клеток с определенным соотношением Н:М, в остальных же случаях полученные числа раскладывались на 2 биномальных набора и ткань представлена в ви-

Распределение изоферментов лактатдегидрогеназы в % ($M \pm m$)
в тканях крыс (n—число опытов)

Ткань (n)	ИФ ЛДГ				
	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅
Сердечная мышца (7)	23,58±0,94	29,33±0,89	24,20±0,71	17,36±0,72	5,53±0,42
Камбаловидная мышца (6)	22,23±1,16	27,66±1,26	24,11±0,43	21,24±1,58	1,76±0,72
Икроножная мышца (9)	14,89±1,34	19,50±1,40	16,52±1,29	24,82±1,58	24,27±1,34
Пяточная мышца (7)	13,79±1,96	18,41±1,31	19,63±0,75	27,14±1,18	21,03±2,36
Большая поясничная мышца (6)	7,51±0,37	12,13±1,22	17,72±1,22	33,11±1,30	29,53±1,70
Печень (7)	0	0	9,35±1,11	33,02±1,36	57,62±1,74
Селезенка (9)	3,63±0,67	11,10±0,94	25,21±0,95	36,91±1,68	23,15±1,81
Корковый слой почек (6)	25,81±1,71	26,40±2,37	21,82±0,65	17,95±2,25	8,02±1,59
Мозговой слой почек (6)	23,09±1,27	23,22±0,98	18,80±0,93	22,41±0,74	12,48±1,56
Сосочки почек (4)	17,16±2,68	19,98±2,95	13,74±0,57	27,55±2,45	21,57±3,23

де совокупности 2 видов популяций клеток с указанием процентного состава популяций и специфичной для каждой популяции пропорции Н:М. Коэффициенты корреляции, характеризующие степень приближения экспериментальных данных к теоретически ожидаемым, для всех опытов довольно близки к 1: $0,908 \leq r \leq 1$, для большинства случаев $0,998 \leq r \leq 1$.

Полученные результаты полностью коррелируют с данными аналогичного анализа наборов ИФ ЛДГ в тканях кроликов, проведенного ранее [1], с той лишь разницей, что спектры ИФ в тканях крыс характеризуются меньшими значениями пропорции Н:М (см. рис. 1-4) и отсутствием закономерности в отклонениях экспериментальных данных от теоретических. Приблизительное соответствие спектров ИФ ЛДГ в тканях закону биномиального распределения ныне констатируется в целом ряде работ [2, 4, 17]. Естественно, однако, что наборы в большинстве тканей обнаруживают недостаточную близость к теоретически рассчитанным числам вследствие известной по анатомо-морфологическим данным гетерогенности исследуемого материала относительно ИФ ЛДГ. Проведенные нами расчеты позволяют в первом приближении представить процентный состав гетерогенных клеточных популяций с соответствующими пропорциями Н:М. Подобная интерпретация согласуется с результатами ряда гистохимических исследований, установивших гетерогенность клеток миокарда [7, 21] и скелетных мышц [6, 8, 10, 18] относительно лактатдегидрогеназы. Особенный интерес представляет работа Дукса с соавт. [10], в которой количественно установлена законо-

Таблица 2

Соотношение содержания субъединиц Н и М лактатдегидрогеназы (Н:М) в тканях крыс (числа, представленные рядом с Н:М, отражают состав популяции в процентах)

Ткань	№ опыта									Величина коэффициента корреляции	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Сердечная мышца	53,70 (4,5:1) 46,30 (1:1,5)	63,74 (3:1) 36,26 (1:1,5)	65,27 (4,5:1) 34,73 (1:1,5)	69,01 (3:1) 30,91 (1:2)	55,86 (3,5:1) 44,14 (1:1,5)	63,27 (3,5:1) 36,73 (1:2)	52,20 (4,5:1) 47,80 (1:1,5)				0,989 ≤ r ≤ 1 0,989 ≤ r ≤ 1
Камбаловидная мышца	81,35 (2,5:1) 18,65 (1:2,5)	81,93 (2,5:1) 18,07 (1:3)	54,47 (3,5:1) 45,53 (1:1,5)	79,59 (4:1) 20,41 (1:2,5)	41,38 (5:1) 58,62 (1:1,5)	2,5:1					0,908 ≤ r ≤ 1
Икроножная мышца	38,58 (3:1) 61,42 (1:3,5)	41,52 (3,5:1) 58,49 (1:4)	62,06 (3,5:1) 37,94 (1:5)	37,16 (3,5:1) 62,84 (1:3,5)	38,14 (3,5:1) 61,86 (1:4)	33,31 (4:1) 66,69 (1:4)	45,67 (4:1) 54,33 (1:4)	40,40 (4,5:1) 59,60 (1:4)	23,44 (3,5:1) 75,56 (1:3,5)		0,994 ≤ r ≤ 1
Пяточная мышца	32,04 (4:1) 67,96 (1:2,5)	39,69 (4:1) 60,31 (1:3)	43,28 (4,5:1) 56,72 (1:2,5)	31,29 (3:1) 68,71 (1:4)	30,32 (2,5:1) 69,98 (1:4)	48,02 (2:1) 51,98 (1:4)	47,61 (4:1) 52,39 (1:2,5)				0,987 ≤ r ≤ 1
Большая квадратично-поясничная мышца	26,77 (2,5:1) 73,23 (1:4)	32,39 (2,5:1) 67,61 (1:3,5)	28,52 (2:1) 71,48 (1:4,5)	29,16 (2:1) 70,84 (1:3)	12,45 (8:1) 87,55 (1:3,5)	24,25 (3:1) 75,75 (1:3,5)					0,982 ≤ r ≤ 1 0,991 ≤ r ≤ 1
Печень	1:8,5	1:5	1:7,5	1:7	1:7	1:6,5	1:5,5				
Селезенка	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:3	31,69 (1,5:1) 68,31 (1:3,5)	23,20 (2:1) 76,80 (1:2,5)	31,91 (2:1) 68,09 (1:3)		0,994 ≤ r ≤ 1
Корковый слой почек	44,90 (5,5:1) 55,10 (1:2)	62,73 (4:1) 37,27 (1:2)	48,23 (4:1) 51,77 (1:2,5)	48,98 (4,5:1) 51,02 (1:2)	69,11 (4,5:1) 30,89 (1:1,5)	73,00 (4,5:1) 27,00 (1:1,5)					0,989 ≤ r ≤ 1
Мозговой слой почек	49,13 (5,5:1) 50,87 (1:2,5)	53,10 (4,5:1) 46,90 (1,3)	45,74 (4:1) 54,26 (1:3)	45,08 (4:1) 54,92 (1:2,5)	54,23 (4,5:1) 45,77 (1:1,5)	52,12 (4:1) 47,88 (1:3)					0,992 ≤ r ≤ 1



Рис. 3. ИФ ЛДГ из сердечной, камбаловидной (представлены 2 набора), икроножной и большой поясничной мышц.

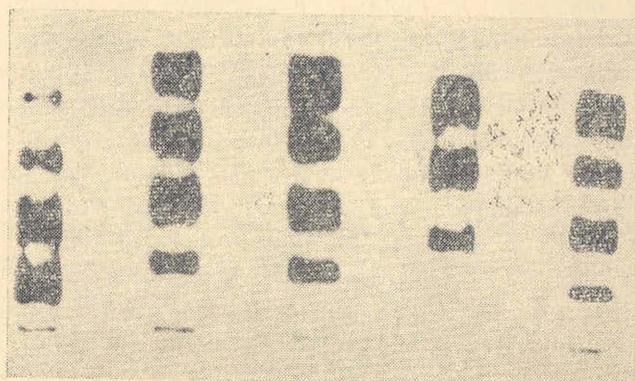


Рис. 4. ИФ ЛДГ из печени, селезенки, коркового (2 набора) и мозгового слоев почек.

мерная зависимость содержания Н и М мономеров от соотношения белых и красных волокон в ряде скелетных мышц крыс. Эти результаты коррелируют с отмеченным у обоих исследованных нами видов четким переходом от преобладания содержания красных волокон с высоким значением пропорции Н:М в сердечной и красной скелетной мышце через промежуточные наборы в смешанных мышцах к преобладанию белых волокон с пропорцией Н:М < 1 в белой мышце. Числа же, характеризующие содержание красных и белых волокон в камбаловидной мышце крыс (к сожалению, единственная совпадающая ткань в сопоставляемых работах),—80,24% красных волокон и 19,74% белых волокон—довольно близки к нашим данным по камбаловидной мышце как у крыс, так и в ряде опытов у кроликов [1].

Известно, что почки—гетерогенный орган, состоящий из трех слоев с разными биохимическими и физиологическими характеристиками. Следовательно, мы исследовали наборы ИФ ЛДГ в отдельных слоях почек, которые, однако, в свою очередь обнаружили гетерогенность по ИФ ЛДГ. Несоответствие спектров ИФ ЛДГ в почках биномальному

распределению в силу их гетерогенности отмечено также Надал — Гинардом [17] у мышей.

Можно допустить, что ткани, однотипные по нашим данным относительно ИФ ЛДГ, будучи гетерогенными по другим параметрам содержат тем не менее популяции клеток с близкими наборами ИФ ЛДГ. Не исключено, однако, что в некоторых редких случаях смесь 2, 3 или более биномов, соответствующих далеким пропорциям Н:М, может результироваться в существенно отличное биномиальное распределение, имитируя однотипность ткани.

Установленная высокая степень близости наборов ИФ формуле Бернулли указывает на то, что, по-видимому, параметры посттрансляционного контроля на уровнях агрегации субъединиц в тетрамеры и деградации ИФ значительной избирательности к отдельным изоферментам не проявляют. Этот вывод полностью противоречит фигурирующей в литературе так называемой «новой теории контроля концентраций белков», которая постулирует наличие существенного, избирательного к ИФ посттрансляционного контроля в тканях млекопитающих, определяющего тканеспецифические наборы ИФ ЛДГ [11, 12]. В связи с этим нами [1] были проанализированы те экспериментальные данные, на основе которых строилась гипотеза. Результаты обнаружили большую близость этих чисел к нашим теоретическим выкладкам, что привело нас к заключению о необоснованности рассматриваемой гипотезы. Наличие противоречий в «новой теории» отмечены также Лебгерцем [14] и Надал-Гинардом [17]. В работе последнего представлены значения констант синтеза и деградации в некоторых тканях мышей и сделан вывод об идентичности констант деградации отдельных ИФ ЛДГ в пределах гомогенных популяций клеток, что противоречит отправным пунктам «новой теории», но согласуется с нашими результатами.

Необходимо учесть, однако, что хотя соответствие наборов ИФ ЛДГ закону биномиального распределения отрицает избирательность механизмов посттрансляционного контроля к ИФ ЛДГ, при этом не исключается возможность избирательности к самим субъединицам Н и М. Это допущение согласуется с мнением Гласса и Доэля [13] о том, что в клетке существует динамическое равновесие мономеров \rightleftharpoons тетрамеры ЛДГ, причем скорость ассоциации — диссоциации субъединиц много выше скорости их деградации. Но относительно наличия в клетках подобного динамического равновесия в настоящее время нет единого мнения. Противоречивы также данные о возможной роли метаболитов и коферментов в регуляторных процессах на уровне формирования третичной структуры мономеров ЛДГ [15, 20, 22].

Таким образом, хотя соответствие наборов ИФ ЛДГ в тканях млекопитающих закону биномиального распределения ныне можно считать установленным, однозначно объяснить этот факт пока не в состоянии ни одна из альтернативных гипотез.

Ուսումնասիրությունների միջոցով հաստատված է առնետների հյուսվածքներում լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների հավաքների համապատասխանությունը բինոմական բաշխմանը: Ներկայացվում է տեսական աղյուսակ, որը պարունակում է փորձական թվերին մոտեցող հավաքներ առաջացնող H:M հարաբերությունները: Մի շարք դեպքերում թվերը բաշխվել են 2 բինոմական հավաքների, միաժամանակ նշելով տարակազմ բջջային պոպուլյացիայի տոկոսային բաղադրությունը: Ստացված տվյալները համապատասխանում են ժամանակակից հյուսվածքաբանական ուսումնասիրությունների արդյունքներին և առանձին իզոֆերմենտների նկատմամբ ցուցադրում են ընտրական հետտրանսլյացիոն հսկողության բացակայություն:

MATHEMATICAL ANALYSIS OF THE LDN ISOZYME PATTERNS IN RAT TISSUES

K. S. DANIELIAN, Zh. I. AKOPIAN

The correspondence of LDN (lactatedehydrogenase) isozyme pattern in rat tissues to the binomial distribution has been established. A theoretical table of H:M proportions, generating close to experimental patterns is given. Numbers in some cases have been decomposed to two binomial distributions with additional indication of per cent composition of heterogenous cellular population.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Даниелян К. С., Мовсесян С. Г. Биолог. ж. Армении, 28, 5, 98, 1975.
2. Коломбет Л. В. Онтогенез, 8, 269, 1977.
3. Мовсесян Н. О., Хумарян М. А., Мовсесян С. Г. Лабораторное дело, 7, 445, 1976.
4. Неркарарян А. В., Застухова Ж. С. Молодой научный работник. ЕГУ, 22, 2, 139, 1975.
5. Паросян Г. А., Даниелян К. С., Б е б.: Вopr. молек.-клеточной биологии, Ереван, 143, 1974.
6. Резвяков Н. И. Арх. Анестезиол., гистол. и эмбриол., 66, 89, 1974.
7. Basile C., Tota B. Boll. Soc. ital. cardiol., 16, 788, 1972.
8. Diegenbach P. G., Krayenhof R. Acta histochem., 59, 21, 1977.
9. Lutz A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246, 1967.
10. Dux L., Mazarean H., Guba F. Kiserletes Orvostudomány, 29, 472, 1977.
11. Frutz P. J., White E. L., Vesell E. S., Pruitt K. M. Nature New Biol., 230, 19, 1971.
12. Frutz P. J., White, Pruitt K. M., Vesell E. S. Biochemistry, 12, 4034, 1973.
13. Gloss R. D., Dryle D. J. Biol. Chem., 274, 5234, 1972.
14. Leberherz H. G. Experientia, 30, 655, 1974.
15. Lindy S. J. Biol. Chem., 249, 4961, 1974.
16. Markert C. L. Science, 140, 1329, 1963.

17. *Nadal-Ginard B.* J. Biol. Chem., 253, 170, 1978.
18. *Nolte J., Pette D.* J. Histochem. and Cytochem., 20, 577, 1972.
19. *Palmer H. S. J.* Theoret. Biol., 27, 453, 1970.
20. *Rainer R., Rainer J.* Eur. J. Biochem., 63, 409, 1976.
21. *Sito H.* Japan Circulat. J. Engl. Ed., 33, 701, 1969.
22. *Tenenbaum-Bayer H., Levitzki A.* Biochim. biophys. acta, 445, 261, 1976.

УДК 616—006—008.9:577.151.5+577.151.5.05

ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

А. В. НЕРКАРАЯН, Г. А. ПАНОСЯН

При развитии асцитной карциномы Эрлиха наблюдаются изменения изоферментного состава лактатдегидрогеназы в головном мозге, сердечной мышце, наиболее резкие—в печени мыши.

Увеличение содержания Н-субъединиц, общей активности лактатдегидрогеназы и изменение отношения М:Н в печени отмечаются уже через 1 час после введения опухолевых клеток и достигают максимума через 6—12 час.

Величина и скорость проявления изменений зависят от количества вводимых клеток асцитной карциномы и скорости роста опухоли.

Введение разрушенных опухолевых клеток и гомогената печени не приводит к подобным изменениям.

Исследование изоферментного состава лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клетках высших организмов при различных функциональных и патологических состояниях представляет значительный интерес. Последний обусловлен, с одной стороны, особенностями структуры фермента (состоящего из четырех субъединиц одного или двух типов) и, с другой—чувствительностью изоферментного состава к различного рода воздействиям, его зависимостью от дифференциации тканей, функционального состояния и других обстоятельств.

Известно, что изоферментный спектр лактатдегидрогеназы меняется при различных патологических состояниях, в частности, при гепатитах, острых интоксикациях, инфекциях, туберкулезе легких, ревматоидном артрите и др. [8, 10, 15, 17, 19] наблюдается смещение изоферментного спектра в сторону преобладания М-форм, т. е. изменения, характерного для сыворотки крови опухоленосителей или самой опухоли [3—5, 13, 18, 22].

Многочисленные исследования ЛДГ-спектров сыворотки крови больных со злокачественными опухолями обнаружили зависимость отклонений от степени злокачественности и стадий заболеваний, что было использовано при дифференциальной диагностике опухолевого роста [7, 11, 20, 21].

Однако, как было указано выше, сходные изменения наблюдаются в сыворотке крови также при неопухолевых заболеваниях, что не позволяет использовать этот тест (увеличение активности лактатдегидрогеназы с преобладанием М-форм в сыворотке крови) для дифференци-

альной диагностики злокачественного роста. Поэтому оправданы те исследования, в которых авторы пытались обнаружить какие-либо изменения в изоферментном составе лактатдегидрогеназы в непораженных опухолю тканей животных, несущих опухоль. Такой подход является чрезвычайно важным с точки зрения ранней диагностики злокачественного роста.

Имеющиеся по этому вопросу литературные данные разноречивы [1, 2, 6, 16] и не позволяют прийти к однозначным выводам о характерных изменениях в тканях животных, несущих ту или иную опухоль. Поэтому перед нами была поставлена задача дальнейшего и более детального исследования этого вопроса.

Материал и методика. Опыты проводили на белых беспородных мышах весом 25—30 г. Тканевые экстракты, обладающие ЛДГ-активностью, получали гомогенизацией ткани в 0,25 М сахарозе в течение 3—5 мин.

Гомогенат центрифугировали при 32000 г в течение 30 мин. Использовали надосадочную жидкость.

Изоферменты разделяли методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле [14]. Активность изоферментов определяли денситометрированием и в элюатах. Элюировали с полиакриламидного геля 0.1 М калий-фосфатным буфером, рН 7.4.

Каждый образец белка наносили на два геля по 250 γ. После электрофореза один из пары гелей инкубировали в течение 1 часа в инкубационной смеси при 37°. Соответственно выявленным после инкубации полосам вырезали диски из неокрашенного геля, которые гомогенизировали в соответствующем буфере. Элюирование проводили в течение 12 час. Полученный элюат центрифугировали при 3000 г в течение 5 мин.

Активность ЛДГ в тканевых экстрактах и элюатах определяли спектрофотометрически на СФ-4А в термостатированной ячейке при 25° по изменению оптической плотности исследуемого раствора при 340 нм.

Активность выражали в мкмольх окисленного НАД·Н за единицу времени на мг белка по формуле

$$A = \frac{\Delta D}{2,07 \cdot B \cdot t}$$

где А—активность ЛДГ, ΔD—изменение оптической плотности, 2,07—коэффициент экстинкции НАД·Н при 340 нм, В—содержание белка, t—время измерения.

На денситограммах активность изоферментов рассчитывали по формуле

$$A = \frac{a}{2} \lg H,$$

где А—активность изофермента, $\frac{a}{2}$ —полуширина пика, H—высота пика.

Количество белка определяли по методу Лоурри.

Процентное содержание М (Н)—субъединиц рассчитывали по формуле

$$M = \frac{1}{4} (4M_4 + 3M_3H_1 + 2M_2H_2 + M_1H_3) \%,$$

где M₄, M₃H₁, M₂H₂, M₁H₃—процентное содержание изоферментов ЛДГ.

Изменение активности генов, направляющих синтез субъединиц ЛДГ, рассчитывали по формулам

$$X = \frac{a_1}{a_0} \quad \text{и} \quad Y = \frac{A - a_1}{b_0}.$$

где X—изменение активности В гена. Y—изменение активности А гена, a_1 —процентное содержание Н-субъединиц в опытной последовательности, a_0 —процентное содержание Н-субъединиц в контроле, b_0 —процентное содержание М-субъединиц в контроле, А—общая активность ЛДГ (в % относительно контроля).

Отношение активностей генов М:Н определяли по величине отклонений от четков расчетной последовательности (9), оно соответствовало отношению с наименьшим отклонением.

Использовали два штамма асцитной опухоли Эрлиха. Штамм I был получен из Института онкологии и рентгенологии Минздрава АрмССР и 10 лет пассировался на кафедре биофизики биологического факультета ЕрГУ. Штамм II получен из Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (ныне Онкологический научный центр АМН СССР).

Для перевивки брали асцитную жидкость у мышей с 10–12-дневной опухолью и вводили внутривенно по 0,2 мл. При введении дозированного количества опухолевых клеток подсчет последних проводили в камере Горяева. Клетки асцитной опухоли Эрлиха разрушали многократным замораживанием—оттаиванием в жидком азоте.

Результаты и обсуждение. Необходимо было выяснить изменяется ли изоферментный состав ЛДГ различных тканей мышей при развитии асцитной карциномы Эрлиха. С этой целью был определен изоферментный состав ЛДГ в головном мозге, печени, сердечной мышце мышей через 7 дней после введения им клеток асцитной карциномы Эрлиха (табл. 1).

Таблица 1
Изоферментный состав ЛДГ в тканях мышей опухоленосителей, $M \pm m$

Ткань		H_1	H_2M_1	H_2M_2	H_1M_2	M_4	М:Н	М, %
Мозг	о	$25 \pm 2,3$	$23 \pm 2,5$	$22 \pm 3,1$	21 ± 3	$9 \pm 0,9$	1:1	41,5
	к	25 ± 3	27 ± 1	27 ± 5	15 ± 2	$6 \pm 1,2$	1:2	37,5
Сердце	о	28 ± 3	$22 \pm 2,7$	26 ± 3	14 ± 2	$10 \pm 1,4$	1:2	39
	к	$25 \pm 2,4$	30 ± 2	23 ± 2	14 ± 2	$8 \pm 0,9$	1:2	37,5
Печень	о	1	$9 \pm 1,2$	13 ± 2	30 ± 2	$48 \pm 2,5$	6:1	79,25
	к	$0,93 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,8$	$11,1 \pm 1$	$80,6 \pm 2,2$	20:1	92,1

о—опыт, к—контроль.

Как видно из табл. 1, введение опухолевых клеток приводит к существенным изменениям в изоферментном составе ЛДГ только в печени, что выражается в значительном уменьшении процентного содержания М-субъединиц и уменьшении отношения М:Н.

В головном мозге и сердечной мышце наблюдается уменьшение содержания М-субъединиц, однако оно не так велико, и поэтому в дальнейших экспериментах нами исследовались изоферментные спектры только в печени.

С целью установления времени появления изменений были определены изоферментные спектры ЛДГ через разные промежутки времени после введения опухолевых клеток.

Как видно из данных, приведенных на рис., величина отношения М:Н, уменьшаясь до 3:1, вновь увеличивается, не достигая, однако, нормального уровня. Время появления этого феномена различно для

быстро и медленно развивающихся штаммов. Так, если быстро развивающийся штамм I вызывал уменьшение отношения М:Н от 20:1 до 3:1 через 6 час., и мыши гибли через 12—14 дней, то медленно развивающийся штамм II уменьшал это отношение до 4:1 через 12 час., а больные мыши гибли через 20—25 дней. Обнаружена зависимость величины отклонений в изоферментном составе ЛДГ печени от возраста штамма.

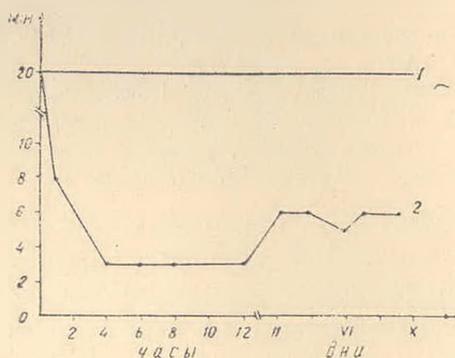


Рис. Изменение величины отношения М:Н печени в процессе развития асцитной карциномы Эрлиха. 1—контроль, 2—опыт.

Так, если введение $2,1 \cdot 10^6$ опухолевых клеток свежего штамма II через 6 час. увеличивало содержание Н-субъединиц до 11% (в контроле 7,25), то введение такого же количества опухолевых клеток штамма II, пассированного в течение 1 года (что приводило к ускоренному росту опухоли), повышало этот показатель до 15,75%. Если $8 \cdot 10^6$ клеток свежего штамма II через 6 час. после введения повышало содержание Н-субъединиц до 12%, то введение $5 \cdot 10^6$ клеток, пассированных в течение 1 года, до 24%. Через 12 час. после введения 10^7 опухолевых клеток штамма II, пассированного в течение года, отношение М:Н уменьшалось до 6:1, а после 1,5 лет пассирования—до 4:1 (табл. 2).

Таблица 2
Изоферментный состав ЛДГ печени через 12 час. после введения различных количеств опухолевых клеток (штамм II), $M \pm m$

Концентрация клеток, кл/мл	H_4	H_3M_1	H_2M_2	H_1M_3	M_4	Н, %	М:Н
$0,8 \cdot 10^6$	$2 \pm 0,5$	$6 \pm 0,5$	$10 \pm 2,2$	$13 \pm 2,9$	$69 \pm 4,8$	14,75	20:1
$2 \cdot 10^6$	$4 \pm 0,6$	$7 \pm 0,5$	$8 \pm 0,3$	$14 \pm 1,3$	$67 \pm 2,2$	19,25	10:1
10^7 (1 год)	6 ± 1	$10 \pm 1,5$	$13 \pm 2,5$	20 ± 2	51 ± 5	22,5	6:1
10^7 (1,5 года)	$6 \pm 0,6$	$12 \pm 2,1$	$17 \pm 0,8$	$28 \pm 1,8$	$37 \pm 0,9$	30,5	4:1

Поскольку изменения в изоферментном спектре ЛДГ проявляются рано, через 6—12 час., то их нельзя связывать с развитием опухоли. Можно предположить, что наблюдаемый эффект является реакцией ор-

ганизма на введение чужеродного белка. Однако введение различных количеств гомогената печени здоровой мыши и разрушенных замораживанием—оттаиванием клеток опухоли практически не вызывало изменений в изоферментном составе ЛДГ (табл. 3).

Таблица 3
Изоферментный спектр ЛДГ печени после введения гомогената
печени и разрушенных опухолевых клеток, М±т

Время, час	Количество белка, γ	Н ₄	Н ₃ М ₁	Н ₂ М ₂	Н ₁ М ₃	М ₄	П, %	
Контроль	—	<1	2±0,5	10±2,5	11±3	76±3	10,25	
А	6	250	2±0,2	6±1,9	9±1,2	11±2,1	72±1,5	13,75
		450	1±0,4	5±0,8	7±1,1	10±2,1	77±3,1	10,75
		1200	2±0,8	5±1,5	6±1,5	11±2,1	76±5,8	11,5
Б	24	700	1±0,25	5±0,9	5±0,9	11±2,5	78±4	10
	6	2·10 ⁶	<1	3±0,9	7±0,9	18±2	72±1,9	11
		5·10 ⁶	<1	5±0,4	7±1,3	13±1,1	74±1,7	11,5

А—гомогенат печени, Б—разрушенные опухолевые клетки.

Следовательно, если разрушенные опухолевые клетки не вызывают резких изменений в изоферментном составе ЛДГ, то это может быть связано с реакцией организма на введение нативных клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Увеличение количества Н-субъединиц при опухолях представляет большой интерес, тем более что подобные изменения были обнаружены и у человека при развитии опухолей молочной железы, желудка, легких [6]. Механизм этого явления не ясен. Подобную картину можно было объяснить разными скоростями диссоциации молекулярных форм ЛДГ, если бы общая активность ЛДГ не повышалась. Однако, как было нами показано, одновременно с увеличением содержания Н-субъединиц увеличивается и общая активность ЛДГ (табл. 4 и 5). Увеличение ее примерно в 2 раза говорит о возможных изменениях регуляции активности генов А и В, направляющих синтез М- и Н-субъединиц.

Исходя из полученных результатов, мы рассчитали величины изменений в активностях А и В генов, исключив любые другие возможные причины (разную скорость диссоциации молекул фермента, адсорбцию и десорбцию, активацию и инактивацию и т. д.).

Таблица 4
Зависимость изменений общей активности ЛДГ и активности генов А и В
от количества вводимых клеток опухоли

Концентрация клеток, кл./мл	А, %	М, %	М:Н	Х	У
Контроль	100	92,75	20:1	1	1
0,8·10 ⁶	105	85,25	20:1	2,03	0,97
2·10 ⁶	129	80,75	10:1	2,7	1,2
10 ⁷	158	69,5	4:1	4,2	1,4

Изменение общей активности ЛДГ и активности генов А и В при развитии асцитной карциномы Эрлиха (штамм 1)

Время	А, %	М, %	М:Н	Х	У
Контроль	100	92,1	20:1	1	1
1 час	138	85,25	8:1	1,9	1,3
4 часа	169	75,75	4:1	3,1	1,5
6 часов	177	68,75	3:1	3,9	2,1
8 часов	176	67,25	3:1	4,1	2,1
12 часов	176	65	3:1	4,4	2,2
24 часа	112	79,5	6:1	2,3	1
IV день	162	73,5	5:1	3,3	1,4
VI день	187	81,5	6:1	2,3	1,8
VII день	215	79,25	6:1	2,6	2,1
IX день	194	74	6:1	3,2	1,8

Итак, увеличение общей активности ЛДГ и изменение отношения М:Н связано с активацией и А, и В генов. При уменьшении отношения М:Н, в 5—6 раз, активность В гена увеличивается почти в 4 раза, а активность А гена и общая активность—в 2 раза.

Если же учесть, что печень является гетерогенной системой, состоящей из клеточных популяций двух типов, паренхимальных и купферовских, то при разной чувствительности их к введению опухолевых клеток может иметь место гораздо большая активация В гена.

Приняв, что количественное отношение паренхимальных и купферовских клеток в печени мышей такое же, как и в печени крыс, и равно 3:1 [12], можно рассчитать изоферментные спектры ЛДГ отдельных клеточных популяций и их возможные изменения, зная величину отношения М:Н для цельной печени.

Рассмотрим несколько вариантов. Во-первых, при введении опухолевых клеток активность генов в двух клеточных популяциях одинаково изменяется. При увеличении активности В гена в 7—10 раз изоферментный состав ЛДГ цельной печени может измениться от 20:1 до 3:1. Второй вариант—на введение асцита реагирует один тип клеток. Величина М:Н цельной печени может измениться лишь в том случае, если активность В гена увеличится в 20—50 раз в паренхимальных клетках, так как их в 3 раза больше, чем купферовских, и увеличение активности В гена в последних не вызывает столь резкого уменьшения отношения М:Н. Третий вариант—паренхимальные и купферовские клетки по-разному реагируют на введение опухолевых клеток. В этом случае в паренхимальных клетках синтез Н-субъединиц должен увеличиться в 5—10 раз, а в купферовских—в 2—3 раза (табл. 6).

Окончательный ответ на вопрос, как именно все происходит, мы можем дать только в том случае, если удастся разделить в печени мышей опухоленосителей купферовские клетки от паренхимальных и определить изменение изоферментного состава ЛДГ.

Таким образом, введение клеток асцитной карциномы Эрлиха приводит к очень быстрой реакции в печени мышей, величина и скорость которой зависят от количества клеток и скорости роста опухоли, что

Таблица 6

Отношение М:Н в гетерогенной системе

I/II	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	10:1	20:1	40:1	60:1	80:1	100:1
1:1	1:1	2:1	2:1	3:1	4:1	4:1	5:1	5:1	6:1	6:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1
2:1	1:1	2:1	3:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	6:1	7:1	9:1	20:1	20:1	20:1	20:1
3:1	2:1	2:1	4:1	4:1	4:1	5:1	6:1	6:1	6:1	7:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
4:1	2:1	2:1	4:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	7:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
5:1	2:1	3:1	4:1	4:1	5:1	5:1	7:1	7:1	7:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
6:1	2:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	7:1	8:1	8:1	9:1	10:1	20:1	20:1	20:1	40:1
7:1	2:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
8:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
9:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	10:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
10:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	10:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
20:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	8:1	9:1	10:1	10:1	10:1	20:1	40:1	40:1	40:1	60:1
40:1	2:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	10:1	10:1	20:1	20:1	40:1	60:1	60:1	80:1

I и II—две клеточные популяции, количественное отношение I:II=1:3.

выражается в активации генов А и В, направляющих синтез субъединиц ЛДГ, и в относительно большей степени—Н-субъединицы.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.11 1979 г.

ՄԿՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԼԱԿՏԱՏԳԵԶԻԳՐՈԳԵՆԱԶԻ ԻՉՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ԿԱԶՄԻ ՓՈՓՈխՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՌԼԻԽԻ ԱՍՅԻՏԱՅԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄԱՅԻ
ԲՉԻՋՆԵՐԻ ՆԵՐԱՐԿՈՒՄԻՑ ՇԵՏՈ

Ա. Վ. ՆԵՐԿԱՐԱՐՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Էռլիխի ասցիտային կարցինոմայի զարգացման ընթացքում դիտվում են լակտատգեզիդրոգենազի իզոֆերմենտների կազմի փոփոխությունների մկների գլխուղեղում, սրտամկանում և լյարդում: Առավել կտրուկ փոփոխություններ դիտվում են լյարդում:

Н-ենթամիավորի քանակի, լակտատգեզիդրոգենազի ընդհանուր ակտիվության և М:Н հարաբերության մեծացումը ի հայտ են գալիս ուռուցքային բջիջների ներարկումից 1 ժամ և հասնում են մաքսիմումի 6—12 ժամ հետո:

Փոփոխությունների մեծությունը և ի հայտ գալու արագությունը կախված են ասցիտային կարցինոմայի բջիջների քանակից և ուռուցքի աճի արագությունից:

Նման փոփոխություններ չի առաջացնում քայքայված ուռուցքային բջիջների և լյարդի հոմոգենատի ներարկումը:

THE CHANGES OF LACTATEDEHYDROGENASE ISOENZYMES
PATTERN IN MICE LIVER AFTER INJECTION OF EHRlich
ASCITES TUMOR CELLS

A. V. NERKARARIAN, G. H. PANOSYAN

The changes of lactatedehydrogenase isoenzymes patterns have been observed in brain, heart and liver of mice under the development of Ehrlich ascites carcinoma. The sharp changes have been observed in liver. The increase of quantity of H subunits, total lactatedehydrogenase activity and the change of M:H ratio in liver appear within an hour and reach the maximum in 6 or 12 hours after injection of tumor cells. The degree of changes depends upon quantity of ascites carcinoma cells and the rate of the tumor growth. No similar changes have been observed when injecting the destructed tumor cells and homogenate of liver.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агапова А. И. *Вопр. мед. химии*, 21, 3, 276—281, 1975.
2. Баева А. В., Шапиро Н. А. *Вопр. онкол.*, 16, 7, 101—107, 1970.
3. Бытка П. Ф., Мустяцэ Г. В., Андриуца К. А. *Клинич. медицина*, 52, 2, 85—88, 1974.

4. Голубев А. М., Чернухин А. А. *Вопр. онкол.*, 17, 8, 30—31, 1971.
5. Голубев А. М., Чернухин А. А., Шварц Я. И. *Вопр. онкол.*, 19, 9, 46—50, 1973.
6. Горожанская Э. Г., Шапог В. С. *Вест. АМН СССР*, 3, 28—32, 1971.
7. Комарова А. П., Суринов Б. П. *Мед. радиология*, 19, 3, 70—71, 1974.
8. Ломаченков В. Д., Аксенова О. Ф. *Клинич. медицина*, 52, 11, 47—52, 1974.
9. Паносян Г. А., Даниелян К. С. *Вопросы молекулярно-клеточной биологии*, 143, 1971.
10. Хайкина Б. И., Кузьминская У. А., Алехина С. М. *Бюлл. exper. биол. мед.*, 10, 39—41, 1970.
11. *Belitsky Ph., Elhiali M. M., Oliver J. A., Mackinnon K. J. J. Urol.*, 103, 6, 770—773, 1970.
12. *Berg T., Blix A. S. Nature new Biol.*, 245, 239—240, 1973.
13. *Damle S. R., Talavdekar R. V. Indian J. Cancer*, 11, 4, 419—432, 1974.
14. *Ditz A. A., Lubrano T. Annal. Biochem.* 20, 246—257, 1967.
15. *Fassaty M., Schon E., Fassaty P., Hucker J., Stepan J. Česk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 20, 2, 75—85, 1971.
16. *Fountain J. A., Parks M. E., Dickey A., McKee R. W. Cancer Res.* 30, 4, 998—1002, 1970.
17. *Ginsberg A. L. Amer. J. Dig. Dis.*, 15, 9, 803—807, 1970.
18. *Goldman R. D., Kaplan N. O., Hall T. C. Cancer Res.* 24, 389—399, 1964.
19. *Gotze M., Rossell I. Scand. J. Rheumatol.* 1, 4, 171—175, 1972.
20. *Jedličková J., Churý Zd. Vnitřní lěk.*, 18, 10, 949—957, 1972.
21. *Massey W. H., Dannis D. L., Fletcher W. S. Amer. J. Surg.*, 122, 2, 209—217, 1971.
22. *Tomoyuki I., Mori K., Usui T., Nihira H., Yasushi K. Urol. Int.*, 30, 6, 437—445, 1975.

ПОЗИТИВНЫЙ МЕТОД ОТБОРА МУТАНТОВ ПО
 АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЕ И БЕЛКУ-РЕЦЕПТОРУ ЦИКЛИЧЕСКОГО
 3', 5'-АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА У *ESHERICHIA COLI* K 12

Ш. М. КОЧАРЯН

Показано, что мутации по аденилатциклазе (суа) и белку-рецептору циклического 3', 5'-аденозинмонофосфата (сгр) сообщают клеткам *E. coli* устойчивость к низким концентрациям рифампицина.

Разработан позитивный метод отбора мутантов суа и сгр, основанный на использовании рифампицина в качестве селективного агента. Мутанты, отобранные этим методом, не отличаются по изученным свойствам от описанных в литературе мутантов суа и сгр.

Циклический 3', 5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) в комплексе с белком-рецептором цАМФ активирует у некоторых видов бактерий транскрипцию катаболитчувствительных оперонов [4, 17]. Мутации суа и сгр, затрагивающие соответственно аденилатциклазу и белок-рецептор цАМФ, нарушают у *E. coli* синтез катаболитчувствительных ферментов. Ген суа локализуется на 84-й мин генетической карты *E. coli* K-12, около маркера *ilv* [8, 20], а ген сгр—на 73-й мин по соседству с геном *gpsL* [11]. Мутации суа и сгр имеют плейотропное проявление: соответствующие мутанты не способны усваивать широкий круг органических соединений в качестве источников углерода и энергии [10, 16, 17], лишены жгутиков [20], дефектны по способности адсорбировать фаги λ и T6 [13, 14], обладают повышенной или пониженной устойчивостью к действию ряда химических и физических агентов, в том числе антибиотиков—стрептомицина, амнициллина [7, 14].

В настоящей работе нами показано, что мутанты суа и сгр более устойчивы к рифампицину, чем бактерии дикого типа. Предложен простой селективный метод отбора мутантов суа и сгр на индикаторных средах, содержащих низкие концентрации этого антибиотика.

Материал и методика. Генетическая характеристика и происхождение бактериальных штаммов, использованных в работе, даны в табл. 1. Фаг λ c1857b221 получен от Н. К. Янковского (ВНИИгенетика, Москва).

В качестве полноценной среды использовали бульон Лурия, минимальной—среду Адамса. Состав этих сред, а также концентрации вносимых добавок описаны ранее [2]. В качестве индикаторной среды, определяющей способность бактерий сбраживать сахара, использовали среду ЕМВ [5].

Штаммы *E. coli* K 12, использованные в работе

Наименование	Тип скрещиваемости и генотип*	Литературная ссылка
CA8306	HfrH, <i>суа</i> 854, <i>thi</i>	[9]
WZ25	F ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>crp868</i> , <i>metB</i> , <i>rel</i>	[19]
SK110	HfrH, <i>lac</i> , <i>apt110</i> , <i>thi</i> , <i>purD</i> , <i>pup8</i>	[3]
SK383	HfrH, <i>lac</i> , <i>apt110</i> , <i>rpsL</i> , <i>crp868</i> , <i>thi</i> , <i>purD</i> , <i>pup8</i>	[1]
SK385	HfrH, <i>purE</i> , <i>rpsL</i> , <i>ilv</i> , <i>pup8</i>	[1]
SK386	HfrH, <i>purE</i> , <i>rpsL</i> , <i>суа854</i> , <i>pup8</i>	[1]
HfrK10	HfrK10, <i>ilv</i>	[1]
P678	F ⁻ , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lac</i> , <i>gal</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	[2]

*—обозначение гена *apt* дано нами [3], остальных маркеров—соответствует номенклатуре, принятой Бачмэн с соавт. [8].

Стандартная методика трансдукции фагом P1кс описана ранее [2]. При использовании признака устойчивости к стрептомицину (*RpsL*⁻) в качестве селективируемого маркера трансдукционную смесь перед высевом на селективные среды инкубировали с целью огомозиготирования в бульоне Лурия в течение 4-х часов [1].

Для оценки устойчивости бактерий к фагу λ 10⁹ частиц фага растирали по поверхности полноценной агаризованной среды, затем с помощью репликаторной «щетки» наносили на агар капли суспензий исследуемых штаммов и через 18 час. инкубации при 42° сравнивали рост исследуемых и контрольных (устойчивых и чувствительных к фагу) штаммов.

Подвижность бактерий определяли по миграции зоны роста бактерий от места нанесения суспензии на поверхность полноценной среды, содержащей 0,7% агара.

Результаты и обсуждение. При работе с мутантами *суа* и *сгр* (штаммы CA8306 и WZ25, табл. 1) мы обнаружили, что в отличие от штаммов дикого типа они способны расти на средах, содержащих низкие концентрации (5—12 мкг/мл) рифампицина. Причиной такой устойчивости могло быть наличие в геноме этих штаммов мутации по гену *groV*, кодирующему синтез β -субъединицы РНК-полимеразы, поскольку все изученные мутации устойчивости к рифампицину затрагивают этот ген [4, 12, 15]. Однако из данных табл. 2 следует, что среди трансдуктантов *rigD*⁺, отобранных в скрещиваниях с использованием в качестве доноров штаммов CA8306 и WZ25, не обнаруживаются формы, устойчивые к рифампицину.

Эти данные опровергают предположение, согласно которому устойчивость к рифампицину у штаммов CA8306 и WZ25 есть следствие мутации в гене *groV*, поскольку гены *rigD* и *groV* локализируются на 89-й мин генетической карты и наследуются совместно при трансдукции [8].

В то же время устойчивыми к рифампицину являлись все те трансдуктанты, которые наследовали мутации *суа* и *сгр* (табл. 2). Такую же устойчивость к рифампицину мы обнаружили у сконструированных нами ранее штаммов SK383 и SK386, дефектных по аденилатциклазе и белку-рецептору цАМФ, хотя соответствующие родительские штаммы,

Наследование признаков устойчивости к низким концентрациям рифампицина и неспособности усваивать различные источники углерода и энергии трансдуктантами PurD⁺, Hiv⁺ и RpsL⁻

Донор	Реципиент	Селектируемый маркер*	Проверено трансдуктантов	Устойчивы к рифампицину	Не способны усваивать арабинозу, мальтозу и глицерин**
CA8306 (суа)	SK 110	PurD ⁺	84	0	0
	SK 385	Hiv ⁺	73	39	39
WZ25 (сгр)	SK 110	PurD ⁺	52	0	0
	SK 110	RpsL ⁻	96	52	52

*—отбор трансдуктантов PurD⁺ проводили на минимальной среде без пуринов, Hiv⁺ — без изолейцина и валина, RpsL⁻ — на средах, содержащих 200 ед/мл стрептомицина [1].

**—способность бактерий к усвоению арабинозы, мальтозы и глицерина оценивали по росту на средах, содержащих эти соединения в качестве единственных источников углерода и энергии, а также по интенсивности окраски колоний на средах ЕМВ [1].

SK110 и SK385, были чувствительны к этому антибиотику (табл. 1). Эти данные указывают на то, что устойчивость бактерий к низким концентрациям рифампицина есть следствие самих мутаций суа и сгр.

Мы задались целью использовать свойство устойчивости к рифампицину мутантов суа и сгр для разработки селективного метода отбора таких мутантов.

Независимые ночные культуры штаммов суа⁺, сгр⁺ высевали на полноценную агаризованную среду, содержащую 3 мкг/мл рифампицина. Колонии, выросшие на этой среде через 72 час. инкубации при 37°, ресуспендировали в буфере и высевали на полноценную среду без рифампицина для получения чистых клонов, сохраняющих устойчивость к антибиотику. Всего нами было проверено около 45-ти мутантов независимого происхождения.

Устойчивость к рифампицину у всех этих мутантов, по-видимому, была вызвана мутацией в гене groV: они были устойчивы, как правило, к концентрациям, выше 20 мкг/мл и не обладали характерным свойством мутантов суа и сгр — неспособностью использовать арабинозу, мальтозу и глицерин в качестве источников углерода и энергии.

Таким образом, если среди мутантов, устойчивых к низким концентрациям рифампицина, имеются суа и сгр, то они возникают с более низкой частотой, чем мутанты groV, и необходима процедура, облегчающая их отбор среди последних.

Мы воспользовались тем обстоятельством, что мутанты суа и сгр на индикаторной среде ЕМВ с сахарами, которые они не способны сбраживать, образуют светло-розовые колонии, а штаммы дикого типа — темные. Отбор мутантов у штамма Hfg K10 проводили на среде ЕМВ,

содержащей арабинозу и мальтозу (по 0,5%) и рифампицин (8 мкг/мл). Приблизительно 1—2% появляющихся на такой среде колоний имело светлую окраску. Выход мутантов стимулировался, если перед инкубацией в центре агара устанавливался кристаллик нитрозогуанидина. После очистки на полноценной среде светло-розовых колоний было получено 5 клонов независимого происхождения, не способных к росту на средах с арабинозой, мальтозой и лактозой как единственными источниками углерода и энергии.

Таблица 3

Свойства мутантов, отобранных на индикаторных средах с рифампицином, в сравнении со свойствами родительского штамма НfгК10 и штаммов СА8306 (суа), WZ25 (сгр)

Штамм	Устойчивость к фагу*	Подвижность**	Размер колоний***	Способность к усвоению арабинозы, мальтозы и лактозы****	
				без цАМФ	с цАМФ
СА8306	R	—	м	—	+
WZ25	R	—	м	—	—
НfгК10	S	+	к	+	+
Мутанты					
№№ 1 и 2	R	—	м	—	+
№№ 3, 4 и 5	R	—	м	—	—

*—R —устойчивость к фагу, S—чувствительность.

**—«+»—способность к миграции, «—»—отсутствие этой способности.

***—м—мелкие колонии, к—крупные колонии.

****—см. примечание ** к табл. 2. Среда с цАМФ содержали 0,1 мл 0,05 М раствора цАМФ, растертого по поверхности агара чашки Петри.

Все 5 мутантов были устойчивы к фагу λ и не способны мигрировать на среде с 0,7% агара (табл. 3). Мутанты, в отличие от родительского штамма Нfг К10, образовывали на полноценной среде мелкие колонии, характерные для штаммов СА8306 и WZ25. Экзогенный цАМФ восстанавливал способность 2-х из 5-ти мутантов усваивать арабинозу, мальтозу и лактозу.

Таким образом, данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что 2 из отобранных нами 5-ти мутантов являются мутантами суа, а остальные—сгр.

С таким предположением согласуются результаты трансдукционного анализа мутантов (табл. 4). Из этих данных следует, что у мутантов, у которых цАМФ восстанавливает способность к сбраживанию сахаров, соответствующий дефект сцеплен при трансдукции фагом P1 с маркером *ilv*, т. е. расположен на генетической карте *E. coli* K-12 [8] на том же участке, где картированы описанные в литературе мутации суа [9, 14, 20]. Мутации, которые нарушают способность бактерий сбраживать сахара независимо от присутствия в среде цАМФ, оказались, как и описанные ранее [11, 18] мутации сгр, сцепленными с маркером *grsL*. Таким образом, отобранные описанным выше способом

Фенотип мутантов при введении трансдукцией аллелей *суа⁺* и *сгр⁺*

Реципиент* (№ мутанта)	Селектируемый маркер**	Проверено трансдуктантов	Из них восстановили		
			способность к усвоению сахаров	чувствительность к рифампицину	крупный размер колоний
1	<i>ilv⁻</i>	47	29	29	29
3	<i>RpsL⁻</i>	116	63	63	63
4	<i>RpsL⁻</i>	74	45	45	45

**—см. примечание * к табл. 2.

*—донором во всех скрещиваниях служил штамм P678 (*rpsL⁻*, *ilv⁻*, *суа⁻*, *сгр⁺*).

мутации устойчивости к рифампицину оказались как по своему фенотипическому проявлению (неспособность сбрасывать сахара, мелкий размер колоний, устойчивость к фагу λ и отсутствие подвижности, табл. 3), так и по данным генетического картирования (табл. 4) идентичными описанным в литературе [7, 9, 10, 13, 14, 16, 18—20] мутациям *суа* и *сгр*.

Известно, что ингибирующее действие рифампицина на рост бактерий обусловлено его способностью связываться с β -субъединицей РНК-полимеразы и блокировать стадию инициации транскрипции [4]. Устойчивость бактерий к этому антибиотику являлась во всех изученных к настоящему времени случаях следствием изменения конформации РНК-полимеразы в результате мутации по структурному гену β -субъединицы—*groB* [4, 12, 15].

Представленные в настоящей работе данные показывают, что устойчивость к низким концентрациям рифампицина у бактерий может быть обусловлена также дефектом по аденилатциклазе или белку-рецептору цАМФ. Недавно было показано, что мутанты *суа* и *сгр* *Salmonella typhimurium* устойчивы к целому ряду антибиотиков; выдвинуто предположение, что такая устойчивость связана с нарушением транспорта антибиотиков в бактериальную клетку в результате мутаций *суа* и *сгр* [6]. Наиболее вероятно, что устойчивость мутантов *суа* и *сгр* *E. coli* к рифампицину также является следствием дефекта по транспорту.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 5.II 1979 г.

ESCHERICHIA COLI K-12-ի ԱԳԵՆԻԼՅԻՎԱԶԱՅԻ ԵՎ ՑԻՎԱՎՈՐ
3',5'-ԱԳԵՆՈՋԻՆՄՈՆՈՖՈՍՖԱՏԻ ԲԵՅԵՊՏՈՐ ՍՊԵՏԱԿՈՒՅԻ
ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅԱՆ ՊՈՋԻՏԻՎ ՄԵԹՈԴԸ

Շ. Մ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ *E. coli* մանրէի *суа* և *сгр* մուտանտները դիմացկուն են ըրիֆամպիցինի ցածր կոնցենտրացիաների ազ-

դեցույթյան հանդեպ: Հիմնվելով *cya* և *crp* մուտանտների այդ հատկության վրա, մշակված է նրանց ստացման նոր, մատչելի մեթոդ:

Ապացուցվում է, որ այդ մեթոդով ստացված *cya* և *crp* մուտանտներն իրենց հատկություններով չեն տարբերվում ավելի վաղ հայտնաբերված նման տիպի մուտանտներից:

A POSITIVE METHOD FOR SELECTION OF ADENYL CYCLASE AND CYCLIC ADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE RECEPTOR PROTEIN DEFICIENT MUTANTS OF ESCHERICHIA COLI K-12

Sh. M. KOCHARIAN

The resistance of *cya* and *crp* mutants of *Escherichia coli* to rifampicin (5—12 $\mu\text{g/ml}$) has been shown. A positive method of *cya* and *crp* mutants selection based on the use of rifampicin as a selectional agent has been worked out. Mutants selected by this method are not distinguished by studied properties from known ones.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кочарян Ш. М. Генетика, 12, 10, 108, 1976.
2. Кочарян Ш. М., Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 11, 11, 79, 1975.
3. Кочарян Ш. М., Чуканова Т. И., Суходолец В. В. Генетика, 13, 10, 1821, 1977.
4. Никифоров В. Г., Зограф Ю. Н. Молекулярная биология. 13 (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР). М., 1977.
5. Сб. методик по генетике микроорганизмов. Под редакцией Р. Клауса, У. Хейса, М., 1970.
6. Alper M. D., Ames B. N. J. Bacteriol., 133, 149, 1978.
7. Artman M., Werthamer S. J. Bacteriol., 120, 542, 1974.
8. Bachmann B. J., Low B. K., Taylor A. L. Bacteriol. Rev., 40, 116, 1976.
9. Brickman E., Soll L., Beckwith J. J. Bacteriol., 116, 582, 1973.
10. Emmer M., De Grombrughe B., Pastan J., Perlman R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 480, 1970.
11. Epstein W., Kim B. S. J. Bacteriol., 608, 639, 1971.
12. Iwakura J., Ishiama A., Yura T. Mol. Gen. Genet., 121, 181, 1973.
13. Jokota T., Kasuga T. J. Bacteriol., 109, 1304, 1972.
14. Kunar S. J. Bacteriol., 125, 545, 1976.
15. Mindlin S. Z., Ilyina T. S., Voeykova T. A., Velkov V. V. Mol. Gen. Genet., 115, 115, 1972.
16. Perlman R., Pastan J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 151, 1969.
17. Rickenberg H. V. Ann. Rev. Microbiol., 28, 353, 1974.
18. Sabourin D., Beckwith J. J. Bacteriol., 122, 338, 1975.
19. Silverstone A. E., Goman M., Scaife J. G. Mol. Gen. Genet., 118, 223, 1972.
20. Yokota T., Gots J. S. J. Bacteriol., 103, 513, 1970.

ТРАНСФЕКЦИЯ ДНК ФАГА ϕ 8 В *SALMONELLA DERBY* И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МУТАНТАХ

Ж. А. КЦОЯН, Н. Н. САРКИСЯН

Определена биологическая активность изолированной ДНК фага ϕ 8 и изучена эффективность трансфекции ДНК на радиочувствительных мутантах.

Фаг ϕ 8, выделенный из лизогенной культуры *S. derby* и являющийся представителем умеренных фагов этого штамма [1, 2, 7], оказался весьма интересным объектом для генетических исследований [3, 4].

Цель настоящей работы заключалась в выделении инфекционной ДНК из фага ϕ 8, определении ее биологической активности и изучении эффективности трансфекции фаговой ДНК на радиочувствительных мутантах.

Материал и методика. В работе использован фаг ϕ 8, выделенный из природных лизогенных штаммов. В качестве реципиента для изолированной ДНК этого фага служил природный штамм *S. derby* К 89. Генетически чистые линии фагов в высоком титре получены по Адамсу [1].

Концентрированный препарат фага, полученный центрифугированием бульонных фаголизатов, содержал $1.6 \cdot 10^{11}$ фаговых частиц в 1 мл. Очистку и концентрирование фага проводили полиэтиленгликолем (мол. вес 6000) [18]. Очищенная фаговая суспензия содержала $4.4 \cdot 10^{12}$ фаговых частиц в 1 мл.

ДНК из фаговой суспензии выделяли методом фенольной депротеинизации [14]. К ней добавляли равный объем фенола, насыщенного 0.1 М трис-НСl буфером и 0.25%-ным SDS (додецилсульфат натрия). Эту смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Водную фазу, содержащую ДНК, отделяли центрифугированием и процедуру экстрагирования повторяли. ДНК осаждали двойным объемом холодного спирта и хранили при 4° в спирте. Препарат ДНК, чистоту которого определяли спектрофотометрически, сохранял биологическую активность в течение шести месяцев. Отношение оптических плотностей при $\lambda = 230, 260$ и 280 составляло:

$$\frac{OD_{266}}{OD_{280}} = 1.92; \quad \frac{OD_{266}}{OD_{230}} = 2.28.$$

Препарат содержал 500 мкг/мл ДНК и не содержал цельных фаговых частиц, что определялось методом титрования ДНК на чувствительной к фагу культуре *S. derby*.

Опыт по трансфекции проводили компетентными клетками *S. derby* по модифицированной методике Камерона [12]. Компетентность бактериальных клеток достигалась путем кальцинирования 0.05 М раствором $CaCl_2$.

Для определения инфекционности препарата ДНК фага ϕ 8 в 0.2 мл клеточной суспензии вносили препарат ДНК, по 0.1 мл (3 мкг/мл), и инкубировали при 37° в течение 40 мин. Соответствующие разведения инфицированных клеток высевали двуслойным методом [1] на индикаторной газонной культуре *S. derby* К 89.

Результаты и обсуждение. Известно, что при постановке опытов по трансфекции методом Манделя и Хига необходимо учитывать два фактора—ионы Ca^{2+} и низкую температуру [17]—от которых зависит формирование у клеток восприимчивости к ДНК.

В наших экспериментах использован 0,05 М CaCl_2 , на основании данных Манделя и Хига о том, что максимальные показатели трансфекции ДНК фага λ получены при концентрации ионов Ca^{2+} 0,02—0,05 М. Концентрирование реципиентных клеток и инкубация в присутствии ионов Ca^{2+} проводились на холоду (4°).

Для получения высоких показателей трансфекции экспериментально были выбраны оптимальные условия проведения опытов: концентрации клеток, из которых приготовлены сферопласты; концентрация ДНК и продолжительность инкубации клеток, обработанных ионами Ca^{2+} и ДНК при температуре 37° .

Известно, что эффективность трансфекции обработанных ионами Ca^{2+} клеток *E. coli* ДНК фага λ зависит от возраста бактериальной культуры [10]. В наших экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста, после которой культура, хранившаяся в течение двух суток как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca^{2+} , теряла компетентные свойства и способность к трансфекции. Концентрация бактерий оказывала существенное влияние на эффективность трансфекции. Как видно из рис. 1, при постоянной концентрации ДНК

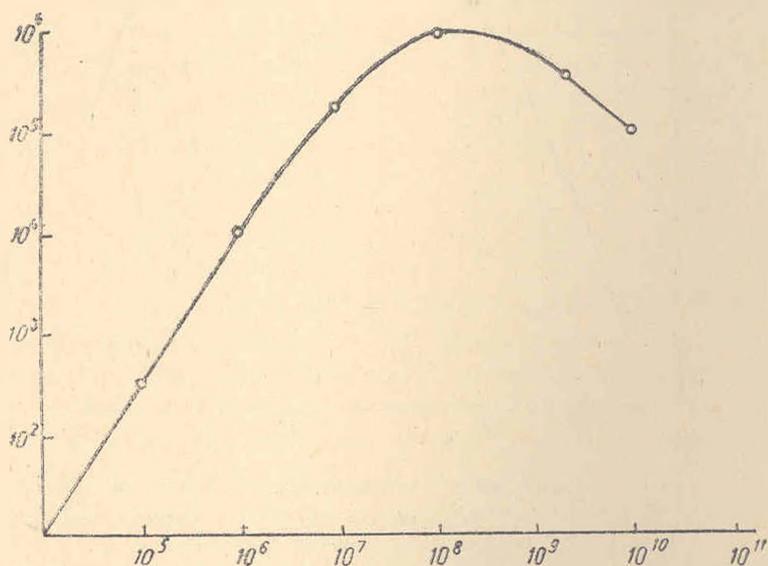


Рис. 1. Зависимость инфекционности ДНК от концентрации клеток реципиента. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—концентрация клеток реципиента в 1 мл.

(3 мкг/мл) с увеличением числа клеток, число инфекционных центров в 1 мл возрастало и достигало оптимальной величины при концентрации $1,2 \cdot 10^9$ клеток/мл. Дальнейшее увеличение числа клеток приводило к постепенному снижению этого показателя.

Изучение зависимости числа инфекционных центров от концентрации фаговой ДНК показало (рис. 2), что при малых концентрациях

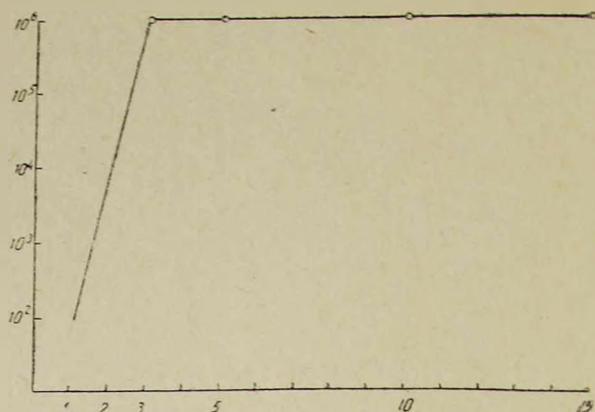


Рис. 2. Зависимость инфекционности ДНК от концентрации ДНК фага. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—концентрация ДНК (мкг/мл).

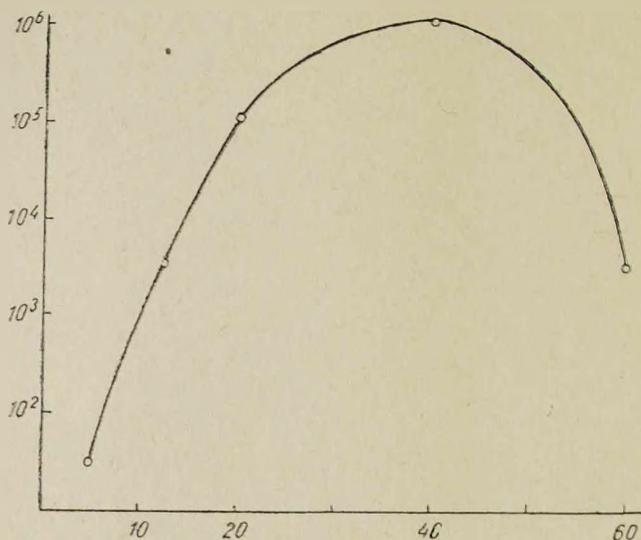


Рис. 3. Кинетика формирования инфекционных центров при инкубации клеток с ДНК при 37°. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—время инкубации (мин).

(максимум 3 мкг/мл) она носит линейный характер, при относительно высоких концентрациях (5–15 мкг/мл) пропорциональная зависимость между концентрацией ДНК и ее биологической активностью не отмечалась. Подобные результаты получены с фагом S_D и T4 [6, 8], и, вероятно, снижение эффективности трансфекции в наших экспериментах также может быть обусловлено возрастающей конкуренцией биологи-

чески неактивных молекул ДНК с инфекционными молекулами ее, что соответствует представлению об инфицировании сферопластов единичной молекулой ДНК [11, 13, 15].

Известно, что инкубация смеси клеток, обработанных ионами Ca^{2+} и ДНК при 37° , является совершенно необходимым этапом для формирования инфекционных центров [9]. На рис. 3 представлена кинетика этого процесса при инкубации смеси клеток с ДНК. Инфекционную смесь инкубировали при 37° и через различные промежутки времени пробы титровали методом агаровых слоев. На 20-й мин инкубации количество инфекционных центров начинает постепенно нарастать и на 40-й мин достигает максимума, дальнейшая инкубация до 60 мин не приводит к увеличению этого показателя.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изолированная ДНК фага $\text{dp}8$ обладает биологической активностью, инфекционный титр довольно высок и достигает $2,10^6$ инф. ц/мл.

Эффективность трансфекции необлученного фага проверялась на радиочувствительных мутантах *S. derby*, различающихся по природе дефекта.

Таблица
Эффективность трансфекции ДНК фага $\text{dp}8$ в *S. derby* и
УФ-чувствительных мутантах

Штаммы	Число инфекционных центров в 1 мл
Дикий тип KE 89	$3,6 \times 10^6$
HCR ⁻ мутанты KE 80	$4,2 \times 10^5$
KE 118	$2,8 \times 10^3$
KE 134	$1,2 \times 10^4$
HCR ⁺ мутанты	
KE 24	$2,9 \times 10^6$
KE 82	$1,6 \times 10^6$
KE 157	$4,9 \times 10^5$

Результаты этих опытов представлены в таблице, из которой видно, что фаговая ДНК в мутантах трансфецировалась с нормальной эффективностью. Лишь в мутантах KE 118 и KE 134 она примерно на 2—3 порядка ниже по сравнению с диким KE 89. Это может свидетельствовать о частичном дефекте по рекомбинации или повышении активности внутриклеточных нуклеаз [16].

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 13.X 1978 г.

**dp8 ՖԱԳԻ ԴՆԹ-Ի ՏՐԱՆՏԵԿԵԿՑԻԱՆ ՏԱԼՄՈՆԵԼԼԱ ԴԵՐԿՅ-Ի
ԵՎ ՌԱԴԻՈԳՆԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄԱՏ**

ժ. Ա. ԿՈՈՅԱՆ, Ե. Ե. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Աշխատանքում որոշված է ֆագի ԴՆԹ-ի կենսաբանական ակտիվությունը և ուսումնասիրված տրանսֆեկցիայի էֆեկտիվությունը *S. derby*-ի և մուտանտների մոտ:

Տվյալները ջրայց են տալիս, որ dp8 ֆագի ԴՆԹ-ի ինֆեկցիոն տիրու
հավասար է $2 \cdot 10^8$ ինֆ. կ/մլ: Որոշ մուտանտներ տրանսֆեկցիայի էֆեկտի-
վությունը տարբերվում են S. derby KE 89 վայրի տիպից:

TRANSFECTION OF PHAGE dp8 DNA IN SALMONELLA DERBY AND RADIOSENSITIVE MUTANTS

Zh. A. KTSOJAN, N. N. SARKISSIAN

The biological activity of isolated phage dp8 DNA has been deter-
mined and the effectiveness of DNA transfection on radiosensitive mu-
tants has been studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги М., 1961.
2. Вартамян М. К., Карабеков Б. П. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 97, Ереван, 1970.
3. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биолог. ж. Армении 30, 9, 14, 1977.
4. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П., Биолог. ж. Армении, 31, 1, 14, 1978.
5. Карабеков Б. П., Вартамян М. К. Мат-лы II научн. конф. Ин-та экспер. биол. АрмССР, 22, Ереван, 1968.
6. Лисовская К. В., Кривиский А. С. Генетика, 12, 10, 100, 1976.
7. Матевосян Н. А., Карабеков Б. П., Вартамян М. К. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 60, Ереван, 1971.
8. Назарова А. Ф. Генетика, 12, 1, 116, 1976.
9. Рудченко О. Н., Лихачева Н. А., Тимакова Н. В., Ильяшенко Б. Н. Вopr. ви-русологии. 4, 446, 1973.
10. Рудченко О. Н., Лихачева Н. А., Тимакова Н. В., Ильяшенко Б. Н. Генетика, 10, 2, 139, 1974.
11. Benzinger R., Kleber I. et all. J. Virol., 7, 647, 1971.
12. Cameron R. et all. Proc. nat. Acad. Sci., 72, 9, 3416, 1972.
13. Cohen G., Limner L. Mol. Gen. Genet., 128, 183, 1974.
14. Gurer A., Schramm G. Nature, 177, 702, 1956.
15. Hertz G., Mauser R. Mol. Gen. Genet., 104, 178, 1969.
16. Lieberman K. P., Oishi M. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 12, 4816, 1974.
17. Mandel M., Higa A. J. Mol. Biol., 52, 159, 1970.
18. Iamamoto K. et all. Virology, 40, 734, 1970.

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК ФАГА
 др 8 SALMONELLA DERBY

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, М. К. ВАРТАНЯН, К. С. КАРАГЕЗЯН

Исследованы физические свойства ДНК фага др 8 S. derby. Молекулярный вес ДНК оценен по степени сглаженности дифференциальной кривой плавления и определен методом скоростной седиментации. Процентное содержание ГЦ-пар найдено двумя независимыми методами: по кривой плавления и спектру кругового дихронизма. Судя по ширине интервала плавления ДНК, фаг др 8 относится к полумерным, что согласуется с данными о лизогенизации фагом др 8 своего хозяина К 89 derby.

Фаг др 8 входит в группу близкородственных фагов др [2], выделенных из природных лизогенных штаммов Salmonella derby. Было выяснено, что некоторые из фагов др 1—9 осуществляют генерализованную трансдукцию, способны к фаговой конверсии и осуществляют конверсию морфологии бактерий, антигенных признаков и фаговых рецепторов [3]. В связи с этим представляет интерес сравнительное изучение структурных особенностей ДНК этих родственных фагов. В данной работе рассматриваются некоторые физические свойства ДНК фага др 8.

Материал и методика. Фаг др 8 выделен из индикаторного штамма К 89 derby. Лизат получен по общепринятой методике на твердой питательной среде (по Адамсу) [1]. ДНК фага др 8 выделена из фаголизата по методу Мак-Хетье [5, 11]. Содержание белка в препарате ДНК, определенное методом Лоурн [13], составляло ~1%.

Молекулярный вес выделенной ДНК определяли по методу скоростной седиментации [10] в 1×SSC. Центрифугирование проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco E (ротор АН-Д). США, с ультрафиолетовой оптикой. Седиментограммы получали после фотометрирования пластинок на двухлучевом микрофотометре ИФО-451.

Спектры кругового дихронизма (КД) регистрировали на спектрополяриметре Сагу-60 с КД-приставкой 6001.

Кривые плавления получали на усовершенствованном для прецизионных измерений спектрофотометре Hitachi (Япония) с чувствительностью ~10⁻⁴ оптических единиц. Регистрацию кривых проводили при непрерывном повышении температуры в термостатированной ячейке со скоростью 0,15 град/мин. Кривые плавления дифференцировали графическим способом [14].

Результаты и обсуждение. Молекулярный вес ДНК (M_w), определенный методом скоростной седиментации, составил $(31,4 \pm 8,7) \times 10^6$ дальтон. Это значение согласуется с величиной молекулярного веса ДНК др 8, определенной Сафарян с соавт. [6] электрофоретически (маркером служила ДНК фага λ). О молекулярном весе этой ДНК

позволяет судить, кроме того, степень сглаженности дифференциальной кривой плавления [4], что показано также на рис. 1 (ДНК др 8 $\sim 30 \times 10^6$ дальтон).

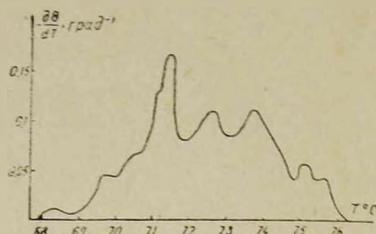


Рис. 1. Нормированная дифференциальная кривая плавления ДНК др 8 в $0,1 \times \text{SSC}$.

Как видно из дифференциальной кривой плавления, наиболее выраженный пик приходится на участок молекул ДНК, обогащенный АТ-парами. Таким образом, ДНК др 8 АТ-типа. Определенная по кривой плавления, температура плавления (T_m) ДНК др 8 в $0,1 \times \text{SSC}$ оказалась равной $(71,55 \pm 0,05)^\circ$. Это значение соответствует $(43,3 \pm 1)$ процентному содержанию ГЦ-пар в ДНК [12]. Моль-процент ГЦ-пар рассчитывали также исходя из спектра кругового дихроизма [7, 16]. При расчете амплитуды полос в спектрах КД ДНК определяются по формуле:

$$\Delta \varepsilon = \alpha (1 - x) + (\alpha + \beta) x,$$

где x —моль-процент ГЦ-пар, α и β —полуэмпирические параметры, значения которых зависят, в частности, от длины волны.

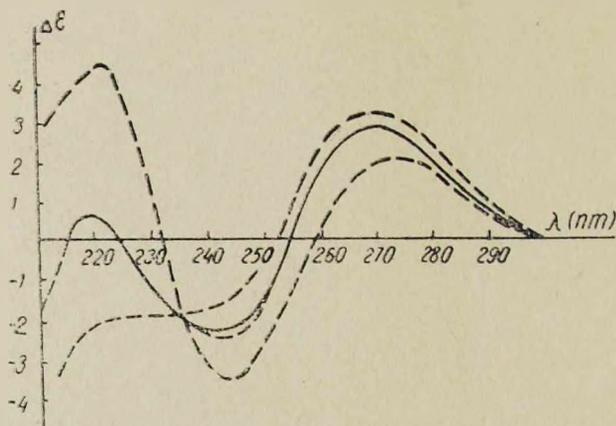


Рис. 2. КД-спектры ДНК др 8. Первая сверху пунктирная кривая—1, вторая пунктирная—2, вторая сплошная—3, третья пунктирная—4.

На рис. 2 приведены КД-спектры ДНК в единицах молярного дихроизма ($\Delta \varepsilon$) в растворителе $0,1 \times \text{SSC}$. Кривая 1 соответствует расчет-

ному спектру идеализированной ДНК со 100%-ным содержанием АТ-пар; кривая 4—расчетному спектру ДНК со 100%-ным содержанием ГЦ-пар; кривая 3—экспериментально полученному спектру ДНК $dp\ 8$, она практически совпадает с расчетной кривой 2 для ДНК в В-форме с 43%-ным содержанием ГЦ-пар.

Таким образом, процентное содержание ГЦ-пар в ДНК $dp\ 8$, определенное двумя независимыми методами, оказывается равным 43.

Ширину интервала плавления находили по кривой плавления ДНК как $\Delta T = \frac{1}{(\partial\theta/\partial T)_{T=T_m}}$, где θ —степень спиральности молекул ДНК. Ширина ΔT оказалась равной $(5,7 \pm 0,1)^\circ$. Эта величина больше, чем таковая для ДНК вирулентных фагов с квазислучайной последовательностью оснований ($\sim 3^\circ$) [8, 9]. Она приближается к величине ΔT для ДНК фагов умеренных. Однако у ДНК истинно умеренных фагов, например λ , величина ΔT больше ($\sim 10^\circ$) вследствие блочности строения. Всю ДНК в геноме умеренных фагов можно разбить на ряд последовательностей, отличающихся друг от друга средним содержанием ГЦ-пар и имеющих каждая случайную последовательность оснований [15]. Вероятно, блочное строение ДНК умеренных фагов обусловлено их способностью захватывать участки ДНК хозяина.

Вывод о полуумеренном характере фага $dp\ 8$ согласуется с данными о лизогенизации своего хозяина К 89, при которой наблюдается обратная зависимость: при увеличении множественности инфекции процент лизогенных бактерий уменьшается. Так, при множественности инфекции, равной 1, этот показатель составляет 18,5, при 100—1,3. Между тем у истинно умеренных фагов отмечается прямая зависимость процента лизогенных бактерий от множественности инфекции.

Авторы благодарят Ю. С. Лазуркина и Ю. Л. Любченко за предоставление возможности для проведения работы и Л. С. Шляхтенко, Ю. А. Банникова за помощь в работе.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 7.II 1979 г.

dp 8. SALMONELLA DERBY ՔԱՎՏԵՐԻՆՖԱԿԻ ԴՆԹ-Ի ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. Գ. ԿԱՔՐԻԵՅԱՆ, Թ. Ա. ՋԱԲԱՐՅԱՆ, Մ. Կ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Կ. Ս. ՂԱՐԱԴՅՈՂՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են $dp\ 8$ S. derby ֆագի ԴՆԹ-ի ֆիզիկական հատկությունները լուծույթում: Որոշվել է ԴՆԹ-ի մոլեկուլյար կշիռը, որը չափվել է սեդիմենտացիոն եղանակով: Այն համապատասխանում է հալման դիֆերենցիալ կորի տեսքին: Ըստ հալման ջերմաստիճանի արժեքի և շրջանային դիֆերոնիզմի սպեկտրի տվյալ ԴՆԹ-ի ԳՑ զույգերի բաղադրությունը հավասար է 43%-ի:

ΔT ԴՆԹ-ի հալման ինտերվալի լայնությունը թույլ է տալիս եզրակացնելու, որ $dp\ 8$ ֆագը կիսաշափավոր է: Վերջին եզրակացությունը հաստատվում է $dp\ 8$ ֆագով անցկացվող К 89 S. derby-ի լիզոգենիզացիայի տվյալներով:

PHYSICAL PROPERTIES OF DNA ϕ 8 BACTERIOPHAGE SALMONELLA DERBY

A. G. GABRIELIAN, R. A. ZACHARIAN, M. K. VARTANIAN,
K. S. KARAGIOZIAN

Some physical properties of DNA of ϕ 8 bacteriophage *S. derby* have been studied. The molecular weight of DNA has been determined, using sedimentation data and the differential melting curve.

The content of GC-pairs in DNA molecules has been defined by melting curve and the spectrum of circular dichroism. The ϕ 8 phage is semimoderate, as the width of melting curve permits to conclude. This conclusion agrees with lisogenization data.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Вартанян М. К., Карабеков Б. П., Матевосян Н. А. Сб. Вопросы молекулярно-клеточной биологии, Ереван, 1971.
3. Вартанян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биолог. ж. Армении, 31, 1, 3, 1978.
4. Габриелян А. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 833, 1978.
5. Захарян Э. Г., Захарян Р. А., Чарчоглян А. А., Карагезян К. С., Африкян Э. К. Биолог. ж. Армении, 31, 1, 3, 1978.
6. Сафарян А. С., Захарян Э. Г., Карагезян К. С., Саркисян Н. Н., Кцоян Ж. А., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 879, 1978.
7. Шляхтенко Л. С. Канд. дисс., М., 1974.
8. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Мол. биол., 5, 766, 1971.
9. Frank-Kamenetskii M. D., Lazurkin Yu. S. Ann. Rev. Biophys. Bioenerg., 3, 127, 1974.
10. Freifelder D. J. Mol. Biol., 54, 567, 1970.
11. MacHattie L. A., Ritchie D. A., Thomas C. A., J. Mol. Biol., 23, 355, 1967.
12. Marmur J., Doty P. J. Mol. Biol., 5, 109, 1962.
13. Layre E. Meth. Enzym., 3, 447, 1957.
14. Lyubchenko Yu. L., Frank-Kamenetskii A. L., Lazurkin Yu. S., Gause G. G. Biopolymers, 15, 1019, 1976.
15. Skalka A., Burgi E., Hersky A. D. J. Mol. Biol., 35, 1, 1968.
16. Usatyi A. F., Schlyachtenko L. S. Biopolymers, 12, 45, 1973.

КООПЕРАТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КАК ОДНО ИЗ СВОЙСТВ АССОЦИАЦИЙ МОЛЕКУЛ

М. А. НОВОСЕЛЕР, О. М. АИВАЗЯН, В. В. БАГДАСАРЯН, А. А. ШАГНИЦЯН

Показана общность некоторых свойств таких модельных систем как ДНК в водно-солевых растворах, агрегаты амфифилей в водно-солевой среде, комплексы ДНК-лиганд, мицеллы—низкомолекулярные гидрофобные субстраты.

Рассматривается влияние ионной силы растворов на степень кооперативности взаимодействий молекул в ассоциациях. Наличие кооперативных взаимодействий в изученных модельных системах вызывает самосборку компонентов в надмолекулярные структуры.

Большинство простых надмолекулярных структур клетки является результатом процесса спонтанной самосборки большого числа макромолекул. В образовании любых молекулярных ассоциаций принимают участие ионные, водородные, ван-дер-ваальсовы и «гидрофобные» связи. Изменение свободной энергии при образовании этих связей значительно меньше изменения свободной энергии образования ковалентных связей и по порядку величины совпадает (или несколько превышает) со средними значениями кинетической энергии теплового движения [8]. Поэтому ассоциаты молекул, основанные на слабых связях, будут достаточно стабильны только при наличии большого количества взаимодействующих молекул.

Это свойство кооперативности взаимодействий ярко проявляется в модельных системах, изучаемых нами: ДНК в водно-солевых растворах, агрегатах амфифилей в водно-солевой среде (мицеллы, липосомы, бимолекулярные фосфолипидные слои и т. д.), комплексах одномерная решетка (ДНК)—большой лиганд (основные полипептиды и белки), мицеллы—низкомолекулярные субстраты.

В настоящей работе нами показана общность всех перечисленных систем и рассмотрено влияние ионной силы растворов на степень кооперативности взаимодействий молекул в ассоциатах.

Об образовании агрегатов амфифилей и их свойствах судили как по данным измерения поверхностного натяжения, вязкости, плотности и активности ионов, так и по расщеплению основных полос поглощения хромофорных групп молекул амфифилей и данным протонного магнитного резонанса (ПМР).

ДНК и комплексы ДНК—большой лиганд исследовались спектрофотометрически и методом кругового дихроизма (КД).

Известно, что молекулы ДНК претерпевают переход спираль-клубок при нагревании раствора нативной ДНК или обработке его щелочью или кислотой. Этот конформационный переход происходит в узком интервале температур или концентраций денатурирующих агентов, что говорит о его кооперативности. Причина кооперативности перехода спираль—клубок заключается в том, что лишь разрыв большого числа комплементарных водородных связей и стэкинг-взаимодействий между основаниями внутри двойной спирали ДНК обеспечивает выигрыш в энтропии, достаточный для перекрывания проигрыша в энтальпии при образовании петлеобразных структур и обеспечивает переход в клубкообразное состояние [3, 16]. Для растворов ДНК тимуса телят в дистилляте интервал плавления (ΔT) равен 14° . При повышении ионной силы раствора степень кооперативности внутримолекулярного плавления ДНК увеличивается: ΔT уменьшается до 7° при ионной силе— $0,64 \text{ M NaCl}$ [2]. Интервал плавления ДНК может уменьшаться от 14 до 7°C при образовании комплексов ДНК с поли- l -лизинном (ПЛ), количество которого в комплексе характеризуется отношением $\text{NH}_2/\text{P} = 0,42$ [5].

Сравнение температур плавления (T_m) скомплексированных с ПЛ участков ДНК тимуса телят (92 — 96°) с T_m электрически нейтральной молекулы ДНК (99°) [6] показывает, что фосфаты ДНК достаточно хорошо нейтрализуются лизиновыми остатками. Поэтому возрастание кооперативности перехода спираль—клубок при комплексировании с ПЛ и при увеличении ионной силы раствора объясняется аналогично [2]. Поскольку молекула ДНК в растворе представляет собой полиэлектролит, то при оценке изменений свободной энергии перехода спираль—клубок необходимо учитывать взаимодействия дальнего порядка, которые носят в основном, характер кулоновского отталкивания [9]. В нативном состоянии флюктуационное изгибание цепи затруднено, поэтому для нативной структуры ДНК взаимодействием дальнего порядка можно пренебречь. Термодинамическая выгодность процесса плавления ДНК определяется величиной изменения свободной энергии при плавлении двойной спирали:

$$\Delta F = F_{\text{кл}} - F_{\text{сп.}}$$

В случае, когда заряд молекулы ДНК уменьшается (при увеличении ионной силы раствора или комплексировании с ПЛ), свободная энергия клубкообразного состояния $F_{\text{кл}}$ повышается, а $F_{\text{сп.}}$, как отмечалось, не зависит от степени нейтрализации фосфатов. Следовательно, по мере уменьшения степени ионизации макромолекул ДНК уменьшается изменение свободной энергии ΔF , т. е. возрастает степень кооперативности внутримолекулярного плавления.

Итак, кооперативность взаимодействий в полужестком клубке ДНК в растворе обеспечивается электростатическими взаимодействиями заряженных фосфатных групп, а в двойной спирали ДНК создается за счет стэкинг-взаимодействий и комплементарных водородных связей.

Известно, что в водных растворах нуклеотиды и нуклеозиды образуют ассоциаты, представляющие собой стопки, в которых плоские гетероциклические основания расположены друг над другом [15]. Энергетическая выгодность образования стопкообразных ассоциатов нуклеотидов обеспечивается рядом факторов. Одним из первичных и определяющих факторов считается изменение свободной энергии ΔF , обусловленное уменьшением поверхности оснований, взаимодействующей с молекулами воды. При этом изменяется степень упорядоченности молекул воды вокруг оснований. А между основаниями возникают индукционные электростатические взаимодействия, лондоновские дисперсионные силы и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, объединяемые под названием стэкинг-взаимодействий, приводящие к еще большему уменьшению свободной энергии системы, и, следовательно, к стабилизации стопки нуклеотидов.

Природа кооперативных взаимодействий в ассоциатах амфифильных веществ (АФ) ничем не отличается от природы кооперативных взаимодействий в стопкообразных ассоциатах нуклеотидов. Амфифильными называются вещества, состоящие из неполярных олеофильных и полярных гидрофильных групп, расположенных асимметрично относительно друг друга в молекуле. Характерными примерами АФ являются фосфолипиды, поверхностно-активные вещества и т. д. В первом приближении и нуклеотиды можно считать АФ.

Растворение в воде молекул АФ сопровождается сложными изменениями объемной структуры воды—образованием «айсберговых» структур вокруг углеводородных радикалов молекул АФ. Поскольку «айсберги» имеют аналогичную со льдом структуру, то увеличение концентрации АФ в системе приводит к увеличению структурированности воды и, следовательно, к уменьшению энтропии системы. По этой причине, начиная с определенной концентрации АФ, называемой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), наблюдается самосборка молекул АФ в мицеллы, в которых углеводородные радикалы спрятаны внутрь, а гидратированные полярные группы молекул АФ расположены на поверхности мицелл. При этом айсберговые структуры распадаются, что приводит к увеличению энтропии системы, а между углеводородными радикалами молекул АФ возникают взаимодействия, приводящие к еще большему уменьшению свободной энергии системы и, следовательно, к стабилизации мицеллярных структур [13]. Эта картина аналогична картине, наблюдаемой при образовании стопкообразных ассоциатов нуклеотидов.

В зависимости от типа АФ мицеллы могут быть положительно, отрицательно заряженными или электрически нейтральными. Часть заряда диссоциированных полярных групп молекул ионногенных АФ на поверхности мицелл компенсируется противоионами.

Наличие поверхностного заряда и гидрофобного ядра делают ККМ, структуру и свойства мицелл зависящими от ионной силы и рН среды, температуры и т. д. В частности, добавление электролитов в водном-

целлярный раствор ионногенных АФ приводит к уменьшению ККМ, изменяет форму и число агрегаций (число молекул АФ в одной мицелле) мицелл. Так, например, увеличение концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в системе вода—пентадецил-сульфонат натрия (ПДСН) приводит к возрастанию числа агрегаций мицеллы от 96 до 540. При этом имеет место превращение сферических мицелл в вытянутый эллипсоид вращения [10]. Увеличение степени кооперативности взаимодействий в мицелле при повышении ионной силы сопровождается уменьшением гидратации и увеличением плотности мицелл. Это означает, что в присутствии электролита увеличивается экранировка их поверхностного заряда, что благоприятствует сближению молекул АФ и стабилизации мицелл.

Подобным образом ведет себя ДНК при увеличении концентрации электролита: она в водных растворах при концентрациях электролита > 1 М переходит из канонической В-формы в более закрученную (компактную) С-форму [4].

При повышении ионной силы среды самосборка молекул ПДСН в мицеллы сопровождается усилением давидовского расщепления УФ-спектра поглощения молекул ПДСН и уширением резонансной линии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) групп $(\text{CH}_2)_n$ [11], (рис. 1, 2).

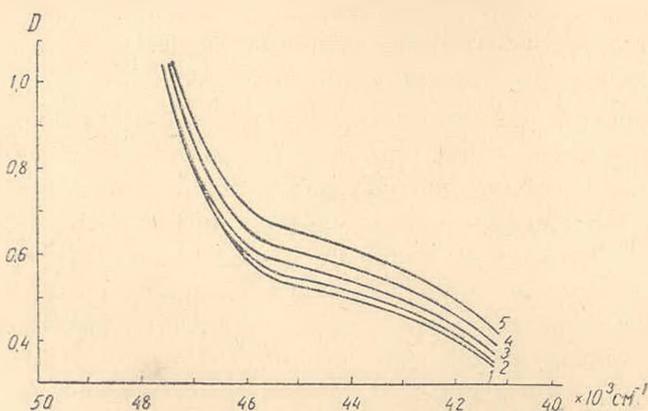


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения системы ПДСН + H_2O + NaCl при $C_{\text{ПДСН}} = 4\%$ по весу, $C_{\text{NaCl}} = 0$ (1); 0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4) и 0,8 (5) моль/л.

Следовательно, при самосборке молекул ПДСН в мицеллы имеет место взаимная ориентация как хромофорных, так и углеводородных участков молекул ПДСН, т. е. определенное упорядочение системы. Поэтому мицеллу можно рассматривать как некую трехмерную «решетку». Тогда введение низкомолекулярных субстратов в нее, приводящее к стабилизации мицеллы и возрастанию кооперативности системы, аналогично влиянию лиганда на одномерную решетку (ДНК). Под стабилизацией мицеллы мы понимаем увеличение числа включенных в нее молекул АФ и возрастание ее солюбилизующей способности (способности растворять низкомолекулярные субстраты-лиганды). Солюбилизация представляет собой не простое накопление субстрата в мицеллах. Известно, что солюбилизующий субстрат активно влияет на

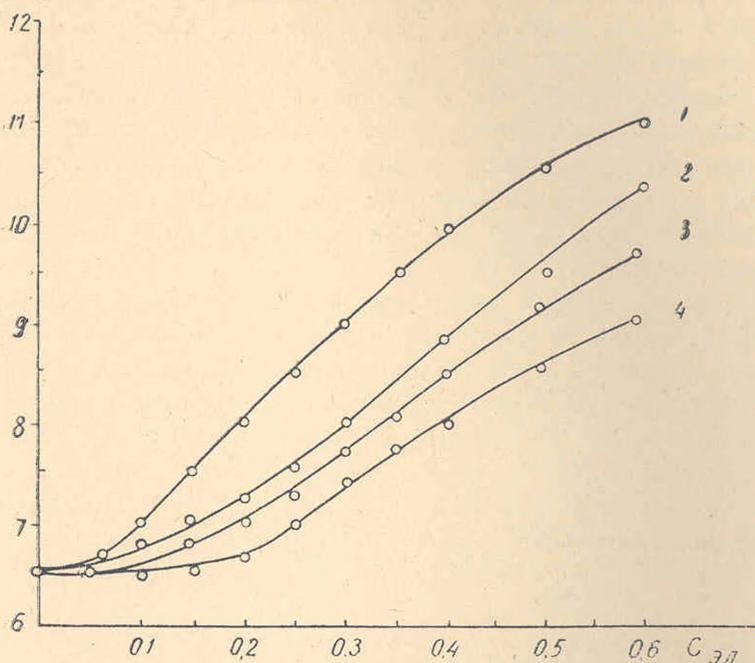
$\Delta v_{1/2}^{20}$ 

Рис. 2. Зависимость величины полуширины сигнала $(CH_2)_n$ групп молекул ПДСН от концентрации электролита: KCl (1); CsCl (2); NaCl (3) LiCl (4).

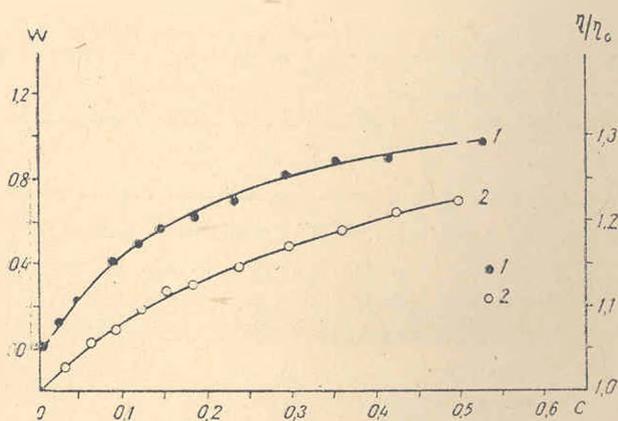


Рис. 3. Зависимость величины полуширины сигнала $(CH_2)_n$ групп в единицах w (1) и относительной вязкости (2) от концентрации солюбилизованного спирта. ($W = (\Delta v_{1/2} - \Delta v_{1/2}^0) / \Delta v_{1/2}^0$, где $\Delta v_{1/2}$, $\Delta v_{1/2}^0$ полуширина сигнала в присутствии и отсутствии спирта соответственно).

структуру, размеры и гидродинамические свойства мицелл. Это связано с тем, что появление субстрата в мицелле изменяет соотношение гидрофильных и гидрофобных сил в ней и тем самым меняет ее структурные параметры. И действительно, мы наблюдаем изменения под-

вижности углеводородных хвостов молекул ПДСН и общей вязкости системы в зависимости от концентрации добавленного субстрата (о-ксилола) [1]. Из рис. 3 видно, что при увеличении концентрации о-ксилола в мицеллах ПДСН величина полуширины сигнала ЯМР группы $(\text{CH}_2)_n$ молекул ПДСН ($\Delta\nu^{1/2}$) возрастает сначала резко до 25%-ного насыщения мицелл о-ксилолом, а затем темп роста падает. Так же меняется относительная вязкость (η/η_0) системы. Возрастание $\Delta\nu^{1/2}$ указывает на уменьшение подвижности углеводородных радикалов молекул ПДСН, а увеличение η/η_0 —на асимметризацию мицелл под воздействием о-ксилола.

Добавление лиганда к одномерной решетке также вызывает изменение ее структуры: большую или меньшую компактизацию ДНК в зависимости от состава и чередования мономерных единиц в решетке [6].

Исследование влияния электролита на солюбилизирующую способность мицелл показало, что при увеличении концентрации NaCl от 0 до 0,5 М солюбилизация о-ксилола в мицеллах ПДСН линейно возрастает от 0,8 моль ксил/моль ПДСН до 1,65 моль ксил/моль ПДСН. Причем по мере увеличения концентрации электролита число лигандов в гидрофильной зоне мицелл уменьшается, а в гидрофобной—увеличивается [12].

Итак, нами показано вполне определенное распределение лигандов внутри мицеллярной «решетки».

Исследование распределения больших лигандов на одномерной решетке спектрофотометрическим методом (табл.) свидетельствует о том,

Таблица
Распределение больших лигандов на макромолекуле ДНК тимуса теленка

Комплексы ДНК—поли- <i>l</i> -лизин				Комплексы ДНК—протамин			
NH_2/P	l_1	l_2	n	NH_2/P	l_1	l_2	n
0,084	1050	118	1	0,084	700	175	14
0,17	650	134	1	0,17	600	166	14
0,25	380	118	1	0,25	525	142	12
0,33	308	151	1	0,33	430	148	12
0,42	190	121	1	0,4	380	194	16
0,5	143	142	1	0,47	320	200	16

l_1 —средняя длина свободных участков ДНК

l_2 —средняя длина закрытых белком участков ДНК

n —среднее число молекул лиганда в кластерах

что молекулы ПЛ (молекулярный вес 52000), нейтрализующие 130 пар оснований каждая, располагаются вдоль решетки на расстоянии от 100 до 150 пар оснований друг от друга, если степень насыщения решетки лигандом изменяется от $\text{NH}_2/\text{P}=0,084$ до $\text{NH}_2/\text{P}=0,5$. Молекулы же протамина, экранирующие каждая 12 пар оснований, взаимодействуют с решеткой кооперативно, распределяясь на макромолекуле ДНК класте-

рами, содержащими 13 молекул белка, т. е. при малых концентрациях протамина наблюдается самосборка нуклеосомоподобных структур [7].

Таким образом, можно сказать, что наличие кооперативных взаимодействий во всех исследуемых нами модельных системах диктует неспецифическую самосборку компонентов в надмолекулярные структуры.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 10.I 1979 г.

ՓՈՆԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿՈՈՊԵՐԱՏԻՎՆԻԹՅՈՒՆԸ ՈՐՂԵՍ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԱՍՈԱՅՄԱՆ ՀԱՏԿԱՆԵՇ

Մ. Ա. ՆՈՎՈՍԵԼԵՐ, Զ. Մ. ԱՅՎԱԶՅԱՆ, Վ. Վ. ԲԱԳԴԱՍՅԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՇԱԶԻՆՅԱՆ

Հետազոտվել են ԴՆԹ-ի, ամֆիֆիլների անսամբլների, ԴՆԹ-լիզանգ և միցել-ցածրամոլեկուլային հիդրոֆոբ սուբստրատ մոդելային համակարգերը՝ աղաչրային միջավայրում: Յուրյ է արվում, որ քննվող համակարգերում գոյություն ունի մի շարք հատկությունների ընդհանրություն. ինչպիսիք են՝ իոնական ուժի ազդեցությունը միջմոլեկուլային փոխազդեցության, առաջացած կոմպլեքսների ձևի և չափերի փոփոխության վրա և այլն, լիզանդի և սուբստրատի համանման ազդեցությունը ԴՆԹ-ի և միցելների վրա՝ համապատասխանաբար:

Ենթադրվում է, որ նման մոդելային համակարգերում կոմպոնենտների ինքնակուտակմամբ վերմոլեկուլային կառուցվածքների առաջացումը պայմանավորված է կոմպոնենտների կոոպերատիվ փոխազդեցությամբ:

COOPERATIVE INTERACTION OF MOLECULE ASSOCIATIONS

M. A. NOVOSELER, H. M. AJVASIAN, W. W. BAGDASSARIAN,
A. A. SHAGINIAN

The community of the following model systems has been shown: 1) DNA in water-salt solutions, 2) ensemble of amfifil molecules, 3) DNA-ligand and 4) micella-lowmolecular hidrofobic substrat. The influence of ionic strength on the degree of intermolecular cooperative interaction has been studied. A supposition that cooperative interactions stimulate selfcollapsibility of components in submolecular structures has been made.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Աճառյան Օ. Մ., Այրումյան Լ. Գ., Շագինյան Ա. Ա. Կոլլոид ժուրն., 1979 (в печати).
2. Աճառյան Վ. Մ., Գոբրիելյան Ա. Գ., Նովոսելեր Մ. Ա., Կոմասյան Զ. Գ. ԴԱՆ Արմ. ՍՍՐ. 17, 4, 198, 1966.
3. Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь, М., 1965.
4. Иванов В. И. Сб.: Молекулярная биология, М., 1973.
5. Նովոսելեր Մ. Ա. Կանդ. դիսս., Երևան, 1976.
6. Նովոսելեր Մ. Ա. ԴԱՆ ԱրմՍՍՐ, 66, 1, 44. 1978.
7. Նովոսելեր Մ. Ա. ԴԱՆ ԱրմՍՍՐ, 1979 (в печати).

8. Певзнер Л. Основы биоэнергетики. М., 1977.
9. Птицин О. Б. Биофизика, 7, 257, 1962.
10. Шагинян А. А., Айвазян О. М., Налбандян Ю. Е., Мелконян Л. Г., Маркрян Ш. А. Коллоид. журн., 3, 605, 1977.
11. Шагинян А. А., Багдисян В. В., Айвазян О. М., Асланян В. М. Коллоид. журн., 1979 (в печати).
12. Шагинян А. А., Айвазян О. М., Налбандян Ю. Е., Ханданян А. Ж. Коллоид. журн., 3, 610, 1977.
13. Frank H. S. Paper presented on the 144-th National Meeting of the American Chemical Society, N. Y., 1963.
14. Li H. J., Brand B., Rotter A., Chang C., Weiscopef M. Biopolymers, 13, 1681, 1974.
15. Solie T. N., Schellman I. A. J. Mol. Biol., 33, 61, 1968.
16. Zimm B. J. Chem. Phys., 33, 1349, 1960.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОКУПРЕИНА МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

В. С. ГАСПАРОВ

Физиологическая функция нейрокупреина, одного из важнейших медьсодержащих белков мозга, точно не выяснена, однако показано, что окисленный нейрокупреин способен реагировать с адреналином с образованием адренохрома [4]. Это—кислый водорастворимый белок с изоэлектрической точкой 3,5 и одним атомом меди на молекулу белка. Молекулярный вес белка, определенный различными методами, равен 10,000. Белок, вероятно, содержит одну полипептидную цепь. Природа медьсвязывающих групп белка (т. е. окружение меди) неизвестна, однако исследованиями, проведенными методом электронного парамагнитного резонанса, установлена связь меди в белке по крайней мере с двумя азотсодержащими группами аминокислот, природа которых также неизвестна [6]. Результаты исследования скорости протонной релаксации воды раствора нейрокупреина привели к выводу о том [1], что медь расположена в участке белковой молекулы, доступном для воды, и более того, вода является одним из возможных лигандов меди.

В целях получения дополнительной информации о возможной природе других лигандов меди в белке нейрокупреин исследовался методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения.

Материал и методика. Нейрокупреин был получен из белого вещества мозга быка по методу, описанному ранее [6]. Препарат восстанавливали добавлением избытка дитионита натрия. Содержание белка определяли по методу Лоури [5], или из оптических и ЭПР спектров окисленного нейрокупреина. Для получения спектров ЯМР препараты белка лиофилизовали, затем растворяли в 98%-ном D₂O и растворы инкубировали при комнатной температуре 30—40 мин. Процедура лиофильной сушки и инкубации в D₂O была выполнена трижды, что привело почти к полному удалению обмениваемых протонов. Концентрация белка составляла 10⁻³ М, рD раствора было равно 5,0. Спектры ЯМР были получены на ЯМР-спектрометре на 360 Мгц фирмы «Брукер» (ФРГ) при 20°. Запись представляла собой накопление 1000 1,82-секундных сканирований. В качестве внутреннего стандарта использовали ДСС (2,2-диметил 2-силапентан-5 сульфидат натрия).

Результаты и обсуждение. Сравнивая спектры ЯМР окисленного и восстановленного нейрокупреина (рис.), можно прежде всего заме-

тять, что одни резонансные пики практически не изменяются при переходе от окисленного состояния к восстановленному, другие—претерпевают существенные изменения. Так, наблюдается уширение ряда линий в низкополевой области спектра у окисленного препарата по сравнению с восстановленным.

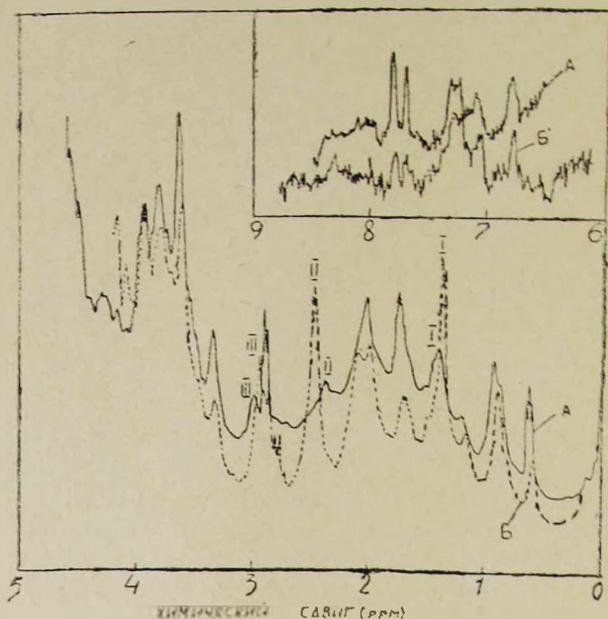


Рис. Спектры ЯМР (360 Мгц): (А) и (А') окисленного нейрокуперена соответственно в низкополевой и высокополевой областях рD 5,0; (В) и (В') восстановленного препарата рD 5,0. Концентрация окисленного препарата несколько выше восстановленного.

Заметное уменьшение интенсивности, уширение сигнала и перемещение химического сдвига в низкополевую область спектра наблюдается у глутаминна (рис., пик II). Величины химических сдвигов протонов глутаминовой (пик II) CH_2 группы соответственно равны 2,38 и 2,42. Уширение линий и уменьшение интенсивности в окисленном препарате наблюдается также для протонов ϵ - CH_2 группы лизина (пик III) и протонов CH_3 группы аланина. В окисленном белке, содержащем парамагнитный ион $\text{Cu}(\text{II})$, помимо основного механизма релаксации протонов [2, 3, 7], действует также механизм релаксации, обусловленный взаимодействием ядерного магнитного момента протона с парамагнитным центром, очевидно, эффективный только для протонов, находящихся достаточно близко к меди. Поэтому уширение некоторых пиков в окисленной форме свидетельствует о близости протонов данной группы к меди, и в частности, из приведенных спектров видно, что в результате восстановления меди наблюдается резкое изменение интенсивности и химического сдвига протонов CH_2 группы глутаминна. Можно полагать, что глутамин находится в непосредственной близости от меди

в белке. Что же касается лизина и аланина, то наблюдаемые изменения резонансных линий могут возникать в результате либо конформационных изменений в структуре белка, либо изменения магнитных свойств меди. Во всяком случае можно определенно считать, что восстановление белка приводит к резкому изменению подвижности лизина и аланина. Дальнейшее, более подробное изучение ЯМР спектров ней-рокупреина, особенно в зависимости от рН и наличия меди, возможно, позволит идентифицировать и другие лигандные аминокислоты меди в этом белке.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 28.11 1979 г.

**ՆԵՅՐՈՎԿՈՒՊՐԵԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ ԲԱՐՁՐ ԿԱՐԳԻ ԼՈՒԾՈՂՈՒԹՅԱՆ
ՄԻՋՈՒԿԱՅԻՆ ՄԱԿՆԻՍԱԿԱՆ ՌԵԶՈՆԱՆՍԻ ՄԵԹՈԴՈՎ**

Վ. Ս. ԳԱՍՊԱՐՈՎ

Հետազոտությունների ընթացքում ստացվել են բարձր կարգի լուծողու-թյան միջուկային մագնիսական ռեզոնանսի 360 Մ հաճախականության սպեկտրները՝ պղինձ պարունակող ուղեղի սպիտակուցներից և նեյրոկուպ-րեինից, օքսիդացված և վերականգնված ձևերով:

Ստացված տվյալների հիման վրա առաջարկվում է սպիտակուցում պղնձի ատոմին զլուտամինի հնարավոր մերձեցում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Гаспаров В. С.* ДАН АрмССР (в печати).
2. *Bloembergen N. J.* Chem. Phys., 27, 572—573, 1957.
3. *Dwek R. A.* Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clavendon Press, Oxford, 1973.
4. *Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch.* FEBS Letters, in press.
5. *Lowry O. H., Rosebough N. I., Farr A. L., Ranadall R. J.* Biol. Chem., 19, 265, 1951.
6. *Sharoyan S. G., Shaljian A. A., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch.* Biochim Biophys. Acta, 493, 478—487, 1977.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ
ФАГОВ PSEUDOMONAS PUTIDA

С. М. АКОПЯН, М. Г. ГАЛУСТЯН, Ш. М. КОЧАРЯН

Физико-химические свойства фага P_i-16 были изучены ранее [1, 2, 11]. Будучи трансдуцирующим, он используется в генетических исследованиях *Pseudomonas putida* [5, 12]. Имеются данные, свидетельствующие о возможности лизогенизации *P. putida* фагом P_i-16, хотя сам механизм этого феномена остается невыясненным [3, 6]. Ранее сообщалось о выделении фагов P_{fil} 1 и P_{fil} 2 из культур *P. putida*, предположительно лизогенных по фагу P_i-16 [4].

Если фаг P_i-16 лизогенизирует бактерии по механизму «классической» лизогенизации, то следовало ожидать, что выделенные фаги должны быть идентичны ему. Цель настоящей работы заключалась в сравнительном изучении физико-химических свойств фагов P_{fil} 1, P_{fil} 2 и P_i-16.

Материал и методика. Выращивание, концентрирование и очистка фагов проводились по методикам, описанным ранее [2]. Электронномикроскопическое исследование препаратов фагов в водном растворе уранил ацетата и молекул ДНК (с маркером ДНК CoI E1) по методике Кляйнмицда [9] проводили на электронном микроскопе BS-613 (ЧССР) при ускоряющем напряжении 80 кв. Размеры ДНК фагов по коилтурным длинам и их молекулярные веса определялись по методике Ланг и др. [10]. Для вычисления процентного содержания ГЦ-пар в исследуемых геномах фагов проводили температурное плавление молекул ДНК. Кривые плавления получали на регистрирующем спектрофотометре PS-1800 (Англия), с программным температурным устройством. Скорость нагревания составляла 0,25° в 1 мин. Плавление проводили в 0,05×SSC и 0,1×SSC.

Результаты и обсуждение. Как показали электронномикроскопические исследования негативно контрастированных препаратов фагов P_{fil} 1 и P_{fil} 2, вирусные частицы имели головки неправильной (несколько вытянутой по длине) гексагональной формы (рис.). Характерной особенностью этих фагов было наличие хорошо выраженного сокращающегося чехла на хвостовых отростках, заканчивающихся сложно устроенной базальной мембраной, которая представлена (вид с торца) шестью выростами, оканчивающимися парными присосками.

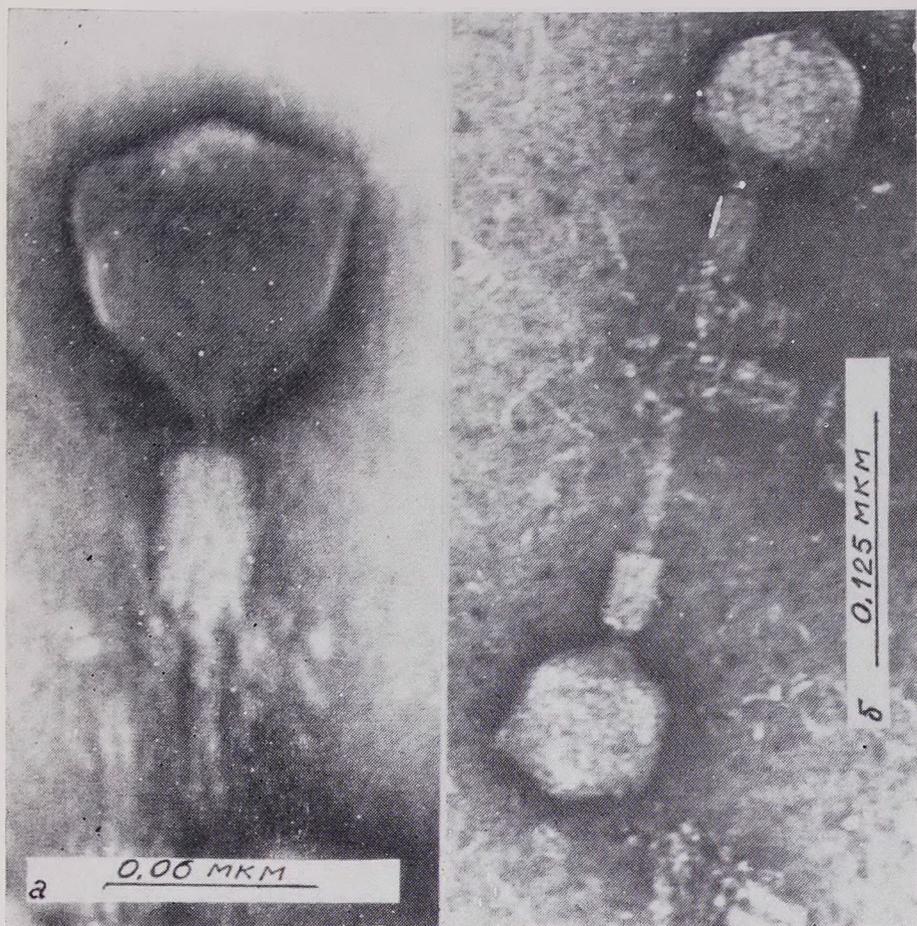


Рис. Фаговые частицы Рf1 1 (а) и Рf1 2 (б). Хорошо видны сокращенные чехлы и оголенные стержни. Окрашивание 2%-ным водным раствором уранил ацетата.

Анализ негативов электронных микрофотографий фагов Pfl 1 и Pfl 2 обнаружил следующие параметры капсидов и хвостовых отростков (табл. 1):

Таблица 1
Морфологические особенности фагов и молекулярный вес фаговых ДНК

ФАГИ	Размеры, Å		ДНК	
	головка	хвост	длина молекул, мк	молекулярный вес, Мдальтон
Pf-16	1065,5	1365,5	47	94
Pfl 1	674,6	963,7	36	72
Pfl 2	741,5	443,4	36	72

Как видно из табл. 1, у бактериофагов Pfl 1 и Pfl 2, в сравнении с фагом Pf-16, наблюдается заметная вариабельность молекулярных весов ДНК (M_L), рассчитанных нами по значению контурных длин L : $M_L = L \times K$. Коэффициент линейной плотности (K), величина которого зависит от состава оснований, определяли по формуле, предложенной Фрейфельдером [8].

Параллельно нами исследовался молярный состав оснований по температуре плавления их ДНК. С этой целью было использовано уравнение, предложенное Франк-Каменецким [7]: $T_{пл} = 176 - (2,6 - X_0) (36 - 7,04 \times \lg Na^+ /)$, где X_0 — процентное содержание ГЦ-пар в ДНК; $\lg Na^+$ для $0,05 \times SSC$ и $0,1 \times SSC$ соответственно составляют 50,15 и 48,03.

Таблица 2
Термическая денатурация фаговых ДНК

ДНК фага	Температура плавления		Молярное содержание ГЦ-пар, % (рассчитано по температуре плавления ДНК)
	в $0,05 \times SSC$ град	в $0,1 \times SSC$ град	
Pfl 1	82,5	83	79
Pfl 2	84,5	88,5	70
Pf-16	—	—	48*

*—данные Ниблак и др. [11].

Как следует из результатов, приведенных в табл. 2, ДНК изученных фагов, как и фага Pf-16, не относятся к АТ-типу.

Суммируя приведенные данные, можно отметить необычные для исследованной группы фагов свойства ДНК. Хотя фаги Pfl 1 и Pfl 2 по ряду биологических и морфологических свойств близки, они существенно различаются по нуклеотидному составу. Более того, сравнительная характеристика морфологических и физико-химических данных фагов Pfl 1, Pfl 2 и фага Pf-16 выявила заметную вариабельность этих свойств.

Таким образом, бактериофаги Pfl 1 и Pfl 2 отличаются от бактериофага Pf-16 как по морфологическим признакам, так и по суммарному нуклеотидному составу и молекулярному весу. В этой связи представляется целесообразным дальнейшее исследование, направленное на выявление степени родства геномов этих фагов: построение карт частичной денатурации ДНК фагов Pfl 1 и Pfl 2 и конструирование гетеродуплексных молекул их ДНК с ДНК фага Pf-16.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 18.II 1979 г.

PSEUDOMONAS PUTIDA ՖԱԳԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱ-ԲԻՈԼՈԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ս. Մ. ՀԱՎՈՐՅԱՆ, Մ. Գ. ԳԱՍՊՈՍՅԱՆ, Ծ. Մ. ԲՈՉԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են Pseudomonas putida ֆագերի ԴՆԲ-ի ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները, մոլեկուլյար կշիռը և ԳՑ զույգերի տոկոսային պարունակությունը:

Որոշված են ֆագային մասնիկների էլեկտրոնամանրադիտակային չափակերը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акопян С. М., Захарян Р. А., Агабалян А. С., Захарян Э. Г., Кочарян Ш. М. Мат-лы XV Чехослов. конференции по электронной микроскопии, Прага, 13, 1977.
2. Акопян С. М., Галустян М. Г., Агабалян А. С., Захарян Э. Г., Амирханова Л. М., Азарян Н. Г., Арутюнян Д. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 30, 12, 54, 1977.
3. Арутюнян Д. Г., Кочарян Ш. М., Захарян Р. А., Алиханян С. П. Тезисы докл. XIV Международного генетического конгресса, часть 1, 56, 1978.
4. Арутюнян Д. Г., Кочарян Ш. М. Сб. трудов Института эксперимент. биологии АН АрмССР, Ереван, 1979.
5. Chakrabarty A. M., Gunsalus C. F., Gunsalus I. C. Proc. Nat. Acad. Sci USA 60, 168, 1968.
6. Chakrabarty A. M., Gunsalus I. C. Virology, 30, 20, 1969.
7. Frank-Kamenetskii M. D. Biopolymers, 10, 2623, 1971.
8. Freifelder D. T. Mol. Biol., 54, 567, 1970.
9. Kleinschmidt A. K., Lang D., Jacherts D., Zahn R. K. Biochim. Biophys. Acta, 61, 857, 1962.
10. Lang D. J. Mol. Biol., 54, 557, 1970.
11. Niblack T. F., McDantel R. M., Killmer P., Gunsalus I. C. J. Bacteriol., 92, 1254, 1966.
12. Stanisich V. A., Richmond M. H. In: Genetics and Biochemistry of Pseudomonas N. Y.—London, 163, 1975.

КРТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.24:586.851.48

СНЯТИЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ
 КОНЦЕНТРАЦИИ АДЕНИНА У *ESCHERICHIA COLI*
 МУТАЦИЯМИ ПО АДЕНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЕ

Ш. М. КОЧАРЯН, А. М. КОЧАРЯН

Ингибирование роста клеток высокими концентрациями аденина исследовалось в отношении нескольких видов бактерий, но механизм его пока не выяснен [4, 5, 7, 8]. На клетках *E. coli* показано, что аденин обладает бактериостатическим действием, которое связано с ингибированием биосинтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов [6]. Известно, что экзогенный аденин может усваиваться клетками *E. coli* двумя путями: при непосредственном превращении в аденозинмонофосфат под контролем продукта гена *apt* аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ) или превращении в аденозин с помощью пурииннуклеозидфосфорилазы (ген *pur*) с последующим дезаминированием аденозина в инозин [1, 2]. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния мутаций *apt* и *pur* на бактериостатическое действие аденина.

Мы изучали влияние 2 мМ аденина на рост штаммов, несущих в геноме различные сочетания мутаций *apt* и *pur* (табл.). Использованные штаммы *E. coli* К-12, состав сред и условия культивирования бактерий описаны нами ранее [1—3].

Таблица

Влияние мутаций *apt* и *pur* на проявление бактериостатического действия аденина

Штамм (<i>pur</i> ⁺)	Генотип по генам		Отношение оптических плотностей 18-часовых культур в средах с 2 мМ аденина и без него**
	<i>apt</i>	<i>pur</i>	
SK83	+	+	0,11—0,18
SK82	+	—	0,08—0,17
SK113*	—	+	0,89—0,97
SK112*	—	—	0,86—1,02

*—штаммы несут в геноме мутацию *apt* 110, полностью нарушающую усвоение аденина с помощью АФРТ [2, 3].

**—крайние значения отношений, полученных в 5-ти независимых опытах.

Из данных таблицы видно, что штамм SK 112 (apt^{-} , pur^{-}), который не способен усваивать экзогенный аденин, устойчив к аденину. Следовательно, ингибирующее действие оказывает не сам аденин, а какой-то продукт его усвоения. Устойчивым является также штамм SK 113 (apt^{-} , pur^{+}), который сохранил способность усваивать аденин по пути аденин→аденозин→инозин, затем общий предшественник нуклеотидов аденина и гуанина—инозинмонофосфат. Следовательно, усвое-

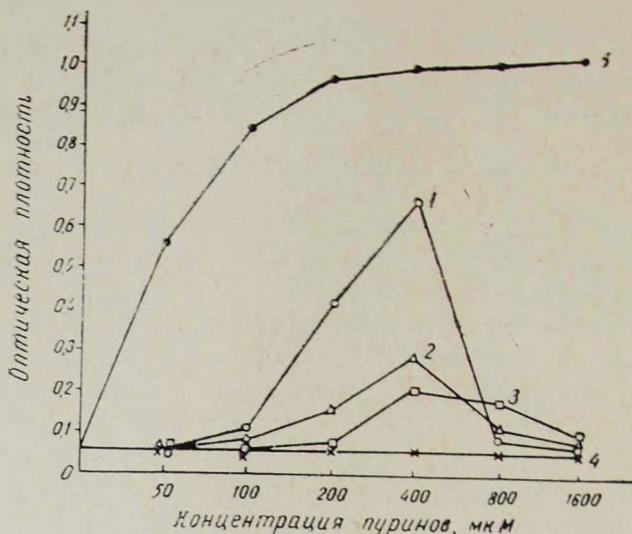


Рис. Оптические плотности 18-часовых культур штаммов *HfrgruA*—1, SK 161—2, SK 214—3 и SK 210—4 в средах с различными концентрациями аденина как единственного источника пуринов. 5—оптические плотности штамма *HfrgruA* в зависимости от концентрации гипоксантина.

ние его по этому пути не сопровождается ингибированием роста бактерий. В то же время штаммы SK 82 и SK 83 (оба apt^{+}) чувствительны к аденину. Следовательно, можно заключить, что ингибирующее действие аденина проявляется при непосредственном превращении его в аденозинмонофосфат в реакции, контролируемой АФРТ.

Этот вывод подтверждается результатами опытов по изучению влияния возрастающих концентраций аденина на рост мутантов, различающихся степенью поврежденности активности АФРТ в результате мутаций apt , и их родительского штамма (рис.). Используемые штаммы по степени поврежденности активности АФРТ располагаются в следующем порядке: *Hfrgru A* (apt^{+}), SK161 (apt 161), SK214 (apt 214) и SK210 (apt 210) (полное нарушение активности АФРТ) [3]. Поскольку указанные штаммы являются пуриновыми ауксотрофами, дефектными по пуридинуклесидфосфорилазе (pur , pur), то каждая кривая рисунка отражает как способность бактерий к усвоению аденина в качестве источника пуринов (восходящий участок кривой), так и зависимость степени ингибирования от концентрации аденина (нисходящий участок).

Из данных рисунка видно, что с повышением концентрации, необходимой для удовлетворения потребности мутантов в пуринах, наблюдается смещение нисходящего участка кривых в сторону более высоких концентраций аденина. Таким образом, бактериостатический эффект аденина прямо зависит от активности АФРТ.

Согласно опубликованным ранее данным [1], из двух путей усвоения аденина у бактерий более эффективным является тот, который не связан с функционированием АФРТ. Усваиваясь по этому пути, он превращается в серии последовательных реакций в инозинмонофосфат и, далее, как в гуанозинмонофосфат, так и аденозинмонофосфат. Несмотря на то, что этот путь усвоения аденина также приводит в конечном счете к превращению в аденозинмонофосфат, тем не менее в этих условиях бактериостатический эффект аденина не проявляется (табл.). Исходя из этого можно предположить, что указанный эффект опосредуется через нарушение соотношения пулов пуриновых нуклеотидов в сторону повышения пула нуклеотидов аденина. С таким предположением согласуются литературные данные о том, что гистидин, который нарушает превращение нуклеотидов аденина в нуклеотиды гуанина, усиливает ингибирующее действие аденина [7].

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 5.II 1979 г.

**ԱԳԵՆԻՆԻ ԲԱՐՁՐ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՆԵՐԻ ՃՆՇՈՂ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՎԵՐԱՑՈՒՄԸ ESCHERICHIA COLI K-12-Ի ՄՈՏ
ԱՎԵՆԻՆՏՈՍՖՈՐԻՔՈՂԻՍՐԱՆՖԵՐԱԶԻ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐՈՎ**

Շ. Մ. ՔՈԶՄԱՆ, Ա. Մ. ՔՈԶՄԱՆ

Հոդվածում ցույց է տրվում, որ *E. coli* K-12-ի մոտ ադենինֆոսֆորիբո-
պիրտրանսֆերազի կառուցվածքային գենին պատկանող *apt* մուտացիաները
վերացնում են անկախորեն պուրիննուկլեոզիդֆոսֆորիլազի գենի ֆունկցիո-
նալ կացույթյունից ադենինի բարձր կոնցենտրացիաների բակտերիոստատիկ
ազդեցությունը: Բակտերիոստատիկ ազդեցության վերացման աստիճանը
որոշվում է ադենինֆոսֆորիբոպիրտրանսֆերազի ակտիվության կորուստի աս-
տիճանով:

Այսպիսով, ադենինի բակտերիոստատիկ ազդեցությունը արտահայտվում
է միայն այն բանից հետո, երբ ադենինը ադենինֆոսֆորիբոպիրտրանսֆերազի
միջոցով վերածվում է ադենոզինմոնոֆոսֆատի:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кочарян Ш. М., Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 11, 11, 79, 1975.
2. Кочарян Ш. М., Суходолец В. В. Генетика, 12, 7, 100, 1976.
3. Кочарян Ш. М., Чуканова Т. И., Суходолец В. В. Генетика, 13, 10, 1821, 1977.
4. Brooke M. S., Magasanik B. J. Bacteriol., 68, 727, 1954.
5. Dalal F. R., Gots R. E., Gots J. S. J. Bacteriol., 91, 507, 1966.
6. Hosono R., Kuno S. J. Biochem., 75, 215, 1974.
7. Mosteller R. D., Goldstein R. V. J. Bacteriol., 123, 750, 1975.
8. Remy C. N., Love S. A. J. Bacteriol., 96, 76, 1963.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИМИЧЕСКИМ АГЕНТАМ
 УФ-МУТАНТОВ *SALMONELLA DERBY*

Дж. Б. БЕГЛАРЯН

Одним из подходов к изучению механизмов репарации ДНК в клетке является идентификация и анализ мутантов, обладающих пониженной способностью к восстановлению повреждений. Изучение таких мутантов выявило наличие специальных систем, восстанавливающих повреждения ДНК, вызванные УФ светом [6].

Материал и методика. В работе исследовались УФ-чувствительные мутанты К 118, К 134, полученные в нашей лаборатории [1], и дикий тип К 89.

В качестве мутагенов использовались: метилметансульфонат (ММС) в концентрации 0.2%, нитрозогуанидин (НГ), 1 мкг/мл, митоминин С (МС), 60 мкг/мл, и азотистая кислота (АК), 0.1 М.

При обработке метилметансульфонатом культуру инкубировали 2,5 час. в бульоне при 37°, встряхивая до титра 10^8 кл./мл. Затем ее отмывали центрифугированием и концентрировали в физиологическом растворе в 2 раза. В полученную суспензию добавляли ММС. Действие мутагена прекращали разведением (1:100) в физиологическом растворе.

При обработке нитрозогуанидином 18-часовую культуру отмывали от бульона и концентрировали в фосфатном буфере (рН 6.0) в 5 раз. Действие НГ прекращали путем разведения (1:100) суспензии в охлажденном фосфатном буфере (рН 7.0).

В опытах с азотистой кислотой 18-часовую культуру отмывали и концентрировали в ацетатном буфере (рН 4.6) в 5 раз. Действие мутагена прекращали разведением (1:100) в фосфатном буфере (рН 7.0).

При обработке митоминином С 18-часовую культуру отмывали и концентрировали в физиологическом растворе в 5 раз, затем смешивали с раствором митоминина С. Контакт с мутагеном продолжался в течение 30 мин при 37°. Действие его прекращали путем разведения (1:100) в охлажденном физиологическом растворе.

Результаты и обсуждение. Кинетика инактиваций ММС УФ-мутантов *S. derby* приведена на рис. 1, из которого видно, что эти мутанты и дикий тип К 89 проявили почти одинаковую чувствительность к этому агенту. То же самое следует сказать и о действии НГ (рис. 2).

Известно, что монофункциональные алкилирующие агенты, к числу которых принадлежат ММС и НГ, метилируют пуриновые основания ДНК, чем и обусловлено их мутагенное и инактивирующее действие. Метилированные основания подвергаются атаке нуклеаз, вслед-

ствие чего образуются одонитевые разрывы ДНК, обуславливающие летальное действие этих соединений [7].

В исследованиях с *E. coli* установлено, что Hcg мутация не увеличивает чувствительность бактерий к инактивирующему действию ММС [5], а также НГ [3].

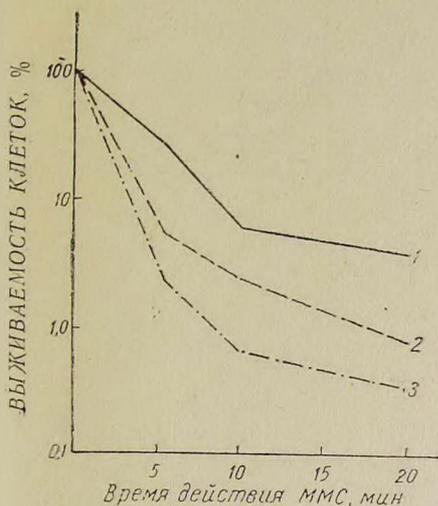


Рис. 1.

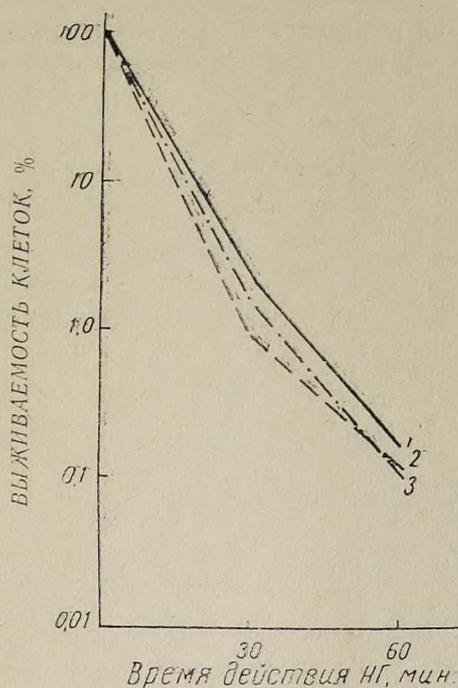


Рис. 2.

Рис. 1. Выживаемость разных мутантов *S. derby* после обработки метилметансульфонатом. 1—дикий тип К 89; 2—мутант К 118; 3—мутант К 134.

Рис. 2. Выживаемость разных мутантов *S. derby* после обработки нитрозогуанидином. 1—дикий тип К 89; 2—мутант К 118; 3—мутант К 134.

Отсутствие различий в чувствительности между этими мутантами и диким штаммом свидетельствует о том, что, по-видимому, восстановление летальных повреждений, индуцированных ММС и НГ, осуществляется у них одинаковым механизмом.

Азотистая кислота и митомицин С вызывают значительно более выраженную инактивацию мутантов К 118 и К 134 по сравнению с диким типом (рис. 3, 4).

Бифункциональные алкилирующие агенты, к числу которых относятся МС, вызывают межнитевые сшивки в ДНК. Азотистая кислота, как известно, дезаминирует основание и тоже приводит к образованию межнитевых сшивок в ДНК. Эти сшивки, не подвергаясь репарации, препятствуют репликации ДНК, что ведет к гибели бактерий. Репарация повреждений такого типа требует ферментативной активности, свойственной Hcg⁺ бактериям [5]. Анализируемые мутанты, как и

Нсг-мутанты *E. coli* по-видимому, лишены этой активности, вследствие чего чувствительны к действию МС и АК.

Известно, что репарация одиночных разрывов не требует первого этапа восстановления—выщепления поврежденных оснований. Следовательно, она будет проходить даже у штаммов, дефектных по первому этапу восстановления, но при условии, если другие звенья репарационной системы у них сохранены [6]. По всей видимости, такими мутантами являются исследуемые нами.

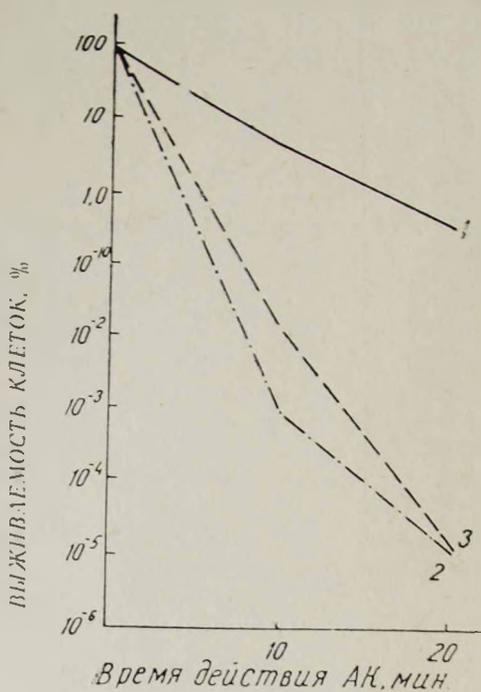


Рис. 3.

Рис. 3. Выживаемость разных мутантов *S. derby* после обработки азотистой кислотой. 1—дикий тип К 89; 2—мутант К 118; 3—мутант К 134.

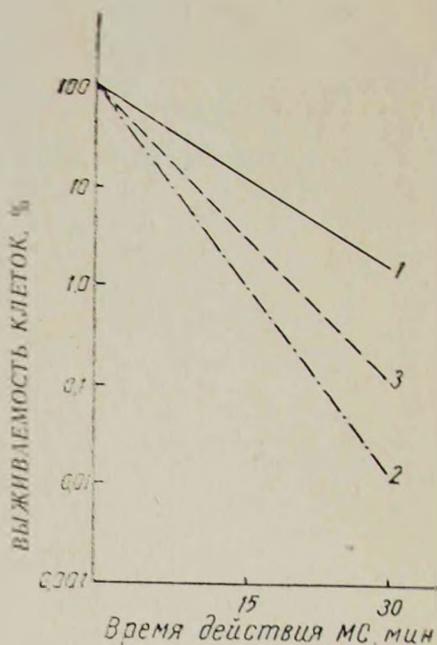


Рис. 4.

Рис. 4. Выживаемость разных мутантов *S. derby* после обработки митомицином С. 1—дикий тип К 89; 2—мутант К 118; 3—мутант К 134.

Иницизия после действия аналогов УФ, МС и АК, осуществляется теми же УвгА, В-зависимыми ферментами, которые узнают пиримидиновые димеры, а иницизия ДНК, поврежденной ММС и ПГ, проводится другими эндонуклеазами, тогда как выщепление и ресинтез после действия всех указанных агентов осуществляется в общем одними и теми же ферментативными системами [4, 6].

Таким образом, в опытах на *Salmonella derby* подтвердилась выявленная на кишечных палочках закономерность.

Исследованные мутанты, у которых способность к восстановлению повреждений фageвой и собственной ДНК нарушена, очевидно, можно

отнести к мутантам по ранней стадии эксцизионной репарации типа Uvr A, B, C, подобно известным Uvr A, B, C мутантам E. coli.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 21.II 1979 г.

SALMONELLA DERBY-ի ՈՒՖ-ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ԶԴԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ԱՂԵՆՏՆԵՐԻ ՆԿԱՏՄԱՄԲ

Ձ. Բ. ԲԵՅԱՐՅԱՆ

Աշխատանքը նվիրված է S. derby ՈւՖ-մուտանտների զգայունության ուսումնասիրությանը: Պարզվել է, որ այդ մուտանտները զգայուն են ազոտական թթվի և միտոմիցին C-ի և կայուն են մեթիլմեթանսուլֆոնատի և նիտրոզոզոնիդինի նկատմամբ: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ուսումնասիրվող մուտանտները (K 118 և K 134), E. coli Uvr A, B, C մուտանտների նման, դասակարգել էկսցիզիոն ընպարացիայի վաղ շրջանի Uvr A, B, C մուտանտների շարքին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Կժոյան Զ. Ա., Դանաջուլյան Կ. Գ. Тез. докл. юбил. сессии Арм. об-ва генет. и селекц. им. Вавилова Н. И., Ереван, 1977.
2. Смирнов Г. Б., Скавронская А. Г. Генетика, 4, 11, 111, 1968.
3. Смирнов Г. Б., Скавронская А. Г. Генетика, 4, 9, 105, 1968.
4. Томилин Н. В. Цитология, 19, 10, 1086, 1977.
5. Bridges B., Munson J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 268, 1966.
6. Howard-Flanders F., Boyce R. Radiat. Res. Suppl., 6, 156, 1966.
7. Lawly P. D. Res. Molec. Biol., 5, 89, 1966.

К ФОРМИРОВАНИЮ НАБОРОВ ИЗОФЕРМЕНТОВ
 ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ
 КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

К. С. ДАНИЕЛЯН, Ф. М. САРКИСЯН, Л. А. ПЕТРОСЯН

Факт соответствия наборов ИФ ЛДГ в тканях млекопитающих закону биномиального распределения пока однозначного объяснения не находит. Возможны два варианта: 1. Механизмы деградации не проявляют избирательности к тетрамерам ИФ ЛДГ, и за тип наборов тканей в конечном счете ответственны лишь механизмы синтеза ИФ, точнее субъединиц Н и М. Это допущение согласуется с данными Недал-Гиварда [11], но противоречит результатам и гипотезе Фритца с соавт. [8, 9]; 2. единицей деградации являются не тетрамеры, а мономеры ЛДГ, возможна избирательность механизмов деградации относительно Н и М, и наборы ИФ определяются скоростями как синтеза, так и деградации мономеров. Соответствие же спектров формуле Бернулли обеспечивается наличием в клетке процесса динамического равновесия мономеры \rightleftharpoons тетрамеры ЛДГ, существование которого предположили Гласс и Дойль [6] и Гольдберг [7]. Однако прямые эксперименты по определению наборов ИФ ЛДГ у развивающихся эмбрионов лягушки после микроинъекций ИФ ЛДГ из тканей крысы и лягушки не выявили в клетках этого процесса. Сам факт соответствия спектров ИФ формуле был бы достаточен для утверждения наличия в клетках динамического равновесия, однако содержание мономеров столь велико ($1,6 \times 10^9$ до $3,6 \times 10^8$ мол. на клетку [10]), что эта необходимость отпадает.

Весьма неожиданными, на наш взгляд, являются результаты работы Адамса [4], обнаружившего соответствие наборов ИФ ЛДГ в сыворотке крови человека закону биномиального распределения. Исследования, подтверждающие или отрицающие результаты этой пока единственной в своем роде работы, могут помочь установлению наличия или отсутствия процесса ассоциации—диссоциации ЛДГ *in vivo*, во всяком случае в сыворотке крови млекопитающих.

Материал и методика. Идентифицированы наборы ИФ ЛДГ в сыворотке крови, взятой из пупочного канатика новорожденных при рождении. Методы определения ИФ и проведения расчетов описаны ранее.

Таблица 1

Наборы ИФ ЛДГ в сыворотке крови новорожденных. %

	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	% Н	г
Экспериментальные данные	17,19	25,42	29,59	17,42	10,36	55,40	0,86
	11,94	26,67	31,82	19,40	10,14	52,70	0,95
	17,78	26,01	25,54	17,67	13,57	54,46	0,77
Теоретические	6,25	25	37,5	25	6,25	50,00 (1:1)	
Экспериментальные данные	14,49	30,20	34,11	13,40	7,80	57,55	0,98
	16,54	31,21	31,52	14,21	6,50	59,20	0,99
	19,38	28,24	35,23	12,10	5,03	61,18	0,94
	17,37	28,36	30,77	17,72	5,76	58,46	0,98
	15,45	39,23	27,14	14,32	3,83	62,02	0,94
	20,39	24,74	27,39	20,10	7,35	57,62	0,89
	17,66	28,81	31,19	14,16	8,15	58,39	0,97
	18,17	33,71	29,94	16,42	1,74	62,53	0,96
	17,51	34,31	29,81	16,72	1,64	62,33	0,96
	18,74	33,88	27,88	13,91	5,57	61,56	0,95
	13,39	35,78	31,65	15,81	3,35	60,00	0,99
	17,45	38,24	25,13	14,31	4,87	62,27	0,90
Теоретические	12,96	34,56	34,56	15,36	2,56	60,00 (1,5:1)	
Экспериментальные данные	23,18	28,34	37,09	7,67	3,69	67,51	0,88
	22,60	30,89	27,39	18,13	0,97	63,99	0,91
	25,39	28,74	29,39	14,10	2,38	65,07	0,75
	23,68	32,80	28,00	15,21	0,21	66,08	0,93
	19,79	31,11	39,25	6,79	3,03	64,44	0,91
Теоретические	19,74	39,51	29,65	9,87	1,23	66,67 (2:1)	

Результаты и обсуждение. Данные о распределении ИФ ЛДГ в отдельных сыворотках представлены в табл. 1. Результаты всех 20 опытов собраны в 3 группы, соответствующие пропорциям Н:М, равным 1:1, 1,5:1 и 2:1. Под экспериментальными данными приведены значения, теоретически ожидаемые для указанных пропорций. В табл. 2 собраны данные ряда авторов о наборах ИФ ЛДГ в сыворотке крови человека в норме. В обеих таблицах приведены значения коэффициента корреляции «г», рассчитанные для установления степени близости экспериментальных данных к теоретическим. Нужно оговорить, что в табл. 2 представлены как данные отдельных опытов, так и средние из определенного числа опытов, что в какой-то степени ухудшает качество расчетов.

Из таблиц следует, что наборы ИФ ЛДГ в сыворотке крови обнаруживают достаточную (правда, меньшую по сравнению с наборами в тканях [1]) близость к закону биномиального распределения: в табл. 1 $0,75 \leq g \leq 0,99$, а в табл. 2 $0,63 \leq g \leq 0,99$. Этот факт согласуется с возможностью наличия процесса ассоциации—диссоциации тетрамеров лактатдегидрогеназы в сыворотке крови *in vivo*. Необходимо учесть, однако, что приближение наборов к статистическим может продол-

Наборы ИФ ЛДГ в сыворотке крови человека по литературным данным, %

ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	% Н	г	Источник данных
9	17	36	26	12	41,25	0,83	[5]
6,25	25	37,5	25	6,25	50,00 (1:1)		
17,6	50,2	19,7	7,3	5,2	66,92	0,68	[4]
12,96	34,56	34,56	15,36	2,56	60,00 (2:1)		
27,6	45,6	22,0	2,9	1,9	73,52	0,95	[6]
30,1	46,4	19,8	2,9	0,8	76,00	0,99	[6]
33,5	42,0	18,5	5,7	1,8	75,67	0,97	[2]*
31,64	42,19	21,09	4,69	0,39	75,00 (3:1)		
38,0	46,1	11,2	2,3	1,3	78,84	0,98	[3]
37,2	43,0	13,0	4,7	2,1	77,12	0,98	[4]*
35,8	43,1	14,1	4,8	2,2	76,25	0,99	[4]*
32,7	45,1	18,5	2,9	0,8	76,50	0,96	[6]
36,6	41,82	17,93	3,42	0,23	77,78 (3,5:1)		

*—наборы в сыворотке крови детей.

жаться и в мягких условиях *in vitro* в периоды отстаивания сыворотки и дальнейшей работы с ней. По мнению Адамса [4], установление статистических наборов в крови происходит довольно быстро, так как наборы в сыворотке больных также обнаруживают установленную закономерность. Наш экспериментальный материал (табл. 1) также содержит несколько наборов, отражающих различные патологические состояния, но для четкого ответа на вопрос о соответствии «патологических» наборов ИФ ЛДГ формуле Бернулли необходимы дальнейшие обстоятельные исследования, тем более что проведенный нами с этой точки зрения анализ литературного материала по «патологическим» наборам ИФ выявил определенную разноречивость.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,

Ереванский медицинский институт,
кафедра акушерства и гинекологии

Поступило 21.II 1979 г.

ՄԱՐԿՈՒՆ ԱՐՅԱՆ ՍԻՃՈՒԿԻ ՄԵՋ ԼԱԿՏԱՏՅԵԶԻԴՐՈՒԿԵՆԱԶԻ
ԻՋՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՀԱՎԱՔՆԵՐԻ ԿԱԶՄԱՎՈՐՄԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Կ. Ս. ԴԱՆԵԼՅԱՆ Յ. Մ. ՍԱՐԿՍՅԱՆ, Լ. Ա. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների սպեկտրները նորածինների արյան սիճուկներում: Հաստատվել է այդ հավաքների բինոմալան բաշխման օրենքին մոտ լինելը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс А. В. В сб.: Некоторые вопросы гематологии в детском возрасте, 59, 70. М.: Медицина, 1975.

2. Шанот В. С., Ларский Э. Г. Проблемы мед. химии, М., 1973.
3. Юрков Ю. А. Автореф. канд. дисс., М., 1968.
4. Adams P. A. Intern. J. Biochem., 7, 515, 1976.
5. Dietz A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246, 1976.
6. Glass R. D., Doyle D. J. Biol. Chem., 247, 5234, 1972.
7. Goldberg A. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2640, 1972.
8. Fritz P. J., White E. L., Vesell E. S., Pruitt K. M. Nature New. Biol., 230, 19, 1971.
9. Fritz P. J., White E. L., Pruitt M., Vesell E. S. Biochemistry, 12, 4034, 1973.
10. Nadal-Ginard B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3618, 1976.
11. Nadal-Ginard B. J. Biol. Chem. 253, 170, 1978.

AMC 407

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԳԵՄԻԱ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԳԵՑ

Հիմնադրվել է 1946 թ.

Հրատարակվում է տարեկան 12 անգամ

Համար XXXII, № 4

ԵՐԵՎԱՆ

Սպրիլ, 1979 թ.

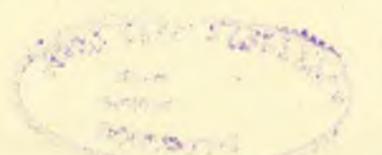
Բ Ո Վ Ա Ն Գ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ ՈՒ Ն

Փորձառական

Մաղախյան Յու. Հ. Օոցիա—օտանդակ հյուսվածքների համակարգը որպես նմուշ նուկլեինաթթուների և սպիրակուցների սինթեզի ուսումնասիրման համար՝ հյուսվածքների տարբերակման պրոցեսում	279
Հակոբյան Ս. Մ., Գալուսյան Մ. Հ. Նուկլեինաթթուների կառուցվածքը (էլեկտրոնային մանրադիտակի տվյալների հիման վրա)	391
Աղաբալյան Ա. Ա., Պոդոլյան Ռ. Գ., Ստեփանյան Գ. Ս., Փաշինյան Ս. Ա., Բաբայելյան Յու. Ս., Զամարյան Ռ. Ա., Ղարիբջանյան Բ. Տ. Ցիրկուլյար ԴնԹ սարկոմա—45 առնետների ուռուցքային բջիջներից	320
Ալեխանյան Յու. Թ. Կուլտիվացվող ուռուցքային բջիջների կողմից շիճուկային սպիրակուցների սինթեզի վերաբերյալ	325
Ղանիկյան Կ. Ս., Հակոբյան Ժ. Ի. Առնետների հյուսվածքներում լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների հավաքների մաթեմատիկական անալիզը	330
Ներկարտյան Ա. Վ., Փանոսյան Գ. Հ. Մկենի լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտային կազմի փոփոխությունը էոլիտի ասցիտային կարցինոմայի բջիջների ներարկումից հետո	337
Քոչարյան Շ. Մ. Escherichia coli K-12-ի ազենիլցիկլազայի և ցիկլավոր 3',5'-ազենոզինմոնոֆոսֆատի բեցեկտոր սպիրակուցի մուտանտների ընտրության պոպուլյուսիոն մեթոդը	345
Կծոյան Ժ. Ա., Սարգսյան Ն. Ն. dp 8 ֆազի ԴնԹ-ի տրանսֆեկցիան Salmonella derby-ի և ռադիոդայուն մուտանտների մոտ	352
Կարբելյան Ա. Գ., Զամարյան Ռ. Ա., Վարդանյան Մ. Կ., Ղարաբաղյան Կ. Ա. dp 8 Salmonella derby բակտերիոֆագի ԴնԹ-ի ֆիզիկական հատկությունները	357
Եսվա լեր Մ. Ա., Ալվազյան Հ. Մ., Բաղդասարյան Վ. Վ., Շահինյան Ա. Ա. Փոխազդեցության կոոպերատիվությունը որպես մոլեկուլների ասոցիացման հատկանիշ	361

Համաստե հաղորդումներ

Գասպարով Վ. Ս. Նեյրոկուլյուրինի հետազոտումը բարձր կարգի լուծողության միջուկային մագնիսական ռեզոնանսի մեթոդով	369
Հակոբյան Ս. Մ., Գալուսյան Մ. Գ., Քոչարյան Շ. Մ. Pseudomonas putida ֆագերի ֆիզիկա-քիմիական որոշ հատկությունները	372
Քոչարյան Շ. Մ., Քոչարյան Ա. Մ. Ազենիլի բարձր կոնցենտրացիաների ճնշող ազդեցության վերացումը Escherichia coli K-12-ի մոտ ազենիլմոնոֆոսֆորիլատրանսֆերազի մուտացիաներով	375
Քիզիբաբյան Զ. Բ. Salmonella derby-ի ՈւՖ-մուտանտների զգայունությունը քիմիական ազենտների նկատմամբ	378
Ղանիկյան Կ. Ս., Սարգսյան Յ. Ս., Պետրոսյան Լ. Ա. Մարդու արյան սիճուկի մեջ լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների հավաքների կազմավորման ուսումնասիրության մասին	382
Հայաստանի կենսաբանական հանդես	275



СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Магакян Ю. А.</i> Система «ооцит—вспомогательные клетки» как модель для изучения синтеза нуклеиновых кислот и белков в процессе дифференциации клеток	279
<i>Акопян С. М., Галустян М. Г.</i> Структурная организация нуклеиновых кислот (в свете данных электронной микроскопии)	301
<i>Агабалян А. С., Погосян Р. Г., Степанян Г. М., Пашинян С. А., Израелян Ю. А., Захарян Ф. А., Гарибджанян Б. Т.</i> Циркулярные ДНК из клеток саркомы-45 крыс	320
<i>Александрян Ю. Т.</i> О синтезе сывороточных белков культивируемыми опухолевыми клетками	325
<i>Даниелян К. С., Акопян Ж. И.</i> Математический анализ наборов изоферментов лактатдегидрогеназы в тканях крыс	330
<i>Неркарарян А. В., Паносян Г. А.</i> Изменение изоферментного состава лактатдегидрогеназы печени мышей при введении клеток асцитной карциномы Эрлиха	337
<i>Кочарян Ш. М.</i> Позитивный метод отбора мутантов по адезилатциклазе и белку-рецептору циклического 3',5'-аденозинмонофосфата у <i>Escherichia coli</i> K-12	346
<i>Кочян Ж. А., Саркисян Н. Н.</i> Трансфекция ДНК фага ϕ 8 в <i>Salmonella derby</i> и радиочувствительных мутантах	352
<i>Габриелян А. Г., Захарян Р. А., Варганян М. К., Карагезян К. С.</i> Физические свойства ДНК фага ϕ 8 <i>Salmonella derby</i>	357
<i>Новоселер М. А., Айвазян О. М., Багдасарян В. В., Шагинян А. А.</i> Кооперативность взаимодействий как одно из свойств ассоциаций молекул	361
Краткие сообщения	
<i>Гаспаров В. С.</i> Исследование нейрокупрена методом ядерного магнитного резонанса высокого разрешения	369
<i>Акопян С. М., Галустян М. Г., Кочарян Ш. М.</i> Физико-химические свойства некоторых фагов <i>Pseudomonas putida</i>	372
<i>Кочарян Ш. М., Кочарян А. М.</i> Снятие ингибирующего действия высоких концентраций аденина у <i>Escherichia coli</i> мутациями по аденилфосфорибозилтрансферазе	375
<i>Бегларян Дж. Б.</i> Чувствительность к химическим агентам УФ-мутантов <i>Salmonella derby</i>	378
<i>Даниелян К. С., Саркисян Ф. М., Петросян Л. А.</i> Формирование наборов изоферментов лактатдегидрогеназы в сыворотке крови человека	382
«Биологический журнал Армении», 1979	276.

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Vol. XXXII, № 4

YEREVAN

April, 1979

C O N T E N T S

E x p e r i m e n t a l

<i>Magakian Yu. A.</i> The oocyte-auxiliary cell system as a model for the study of nucleic acid and protein synthesis during cell differentiation . . .	279
<i>Akopian S. M., Galustian M. C.</i> Structural organization of nucleic acids (according to new electron-microscopic data)	301
<i>Agabulian A. S., Pogosian R. G., Stepanian G. M., Pashinian S. A., Israelian Y. A., Zakarian R. A., Garibdjianian B. I.</i> The circular DNA from sarcoma tumor cells	320
<i>Aleksanyan Yu. T.</i> On the synthesis of the serum proteins by cultivated tumor cells	325
<i>Danielian K. S., Akopian Zh. I.</i> Mathematical analysis of the LDH isoenzyme patterns in rat tissues	330
<i>Nerkharatyan A. V., Panosian G. H.</i> The changes of lactatedehydrogenase isoenzymes pattern in mice liver after injection of Ehrlich ascites tumor cells	337
<i>Kocharian Sh. M.</i> A positive method for selection of adenyl cyclase and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate receptor protein deficient mutants of <i>Escherichia coli</i> K-12	346
<i>Ktsojan Zh. A., Sarkissian N. N.</i> Transfection of phage ϕ 8 DNA in <i>Salmonella derby</i> and radiosensitive mutants	352
<i>Gabrielian A. G., Zacharian R. A., Vartanian M. K., Karagiozian K. S.</i> Physical properties of DNA ϕ 8 bacteriophage <i>Salmonella derby</i> . . .	357
<i>Novoseler M. A., Ajvasian H. M., Bagdassarian W. W., Shaginian A. A.</i> Cooperative interaction of molecule association	361

Short Communications

<i>Gasparov V. S.</i> The investigation of neurocureine by high resolution NMR method	360
<i>Akopian C. M., Galustian M. G., Kocharian Sh. M.</i> Physico-chemical characteristics of some <i>Pseudomonas putida</i> phages	372
<i>Kocharian Sh. M., Kocharian A. M.</i> Taking off the inhibitory action of high adenine concentration in <i>Escherichia coli</i> by adenine phosphoribosyltransferase mutations	375
<i>Beglartyan J. B.</i> <i>Salmonella derby</i> UV-mutants sensitivity to chemical agents	378
<i>Danielian K. S., Sarkisyan F. M., Petrosian L. A.</i> Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern formation in blood serum of a man	382
<i>„Biological Journal of Armenia“, 1979</i>	277