

2. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. II. Дискретные фрагменты ДНК и уровни структурной организации хроматина // Там же.— № 6.— С. 43—51.
3. Nelson F. M., Tewey K. M., Liu L. F. Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-*n*-anisidide // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81.— P. 1361—1365.
4. Liu L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs // Annu. Rev. Biochem.— 1989.— 58.— P. 351—375.
5. Italligan B. D., Edwards K. A., Liu L. F. Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus // J. Biol. Chem.— 1985.— 260.— P. 2475—2482.
6. Zwelling L. A. DNA topoisomerase II as a target of anticancer drug therapy // Cancer Metastasis Rev.— 1985.— 4.— P. 263—276.
7. Glisson B. S., Ross W. E. DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy // Pharm. Ther.— 1987.— 32.— P. 89—106.
8. Ross W. E. DNA topoisomerases as target for cancer therapy // Biochem. Pharm.— 1984.— 34.— P. 4191—4195.
9. Osheroff N. Effect of anticancer agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide // Biochemistry.— 1989.— 28.— P. 6157—6160.
10. Sander M., Hsieh T.-S. Double-strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster* // J. Biol. Chem.— 1983.— 258.— P. 8421—8428.
11. Liu L. F., Rowe T. C., Yang L. et al. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II // Ibid.— P. 15365—15370.
12. Osheroff N., Zechiedrich E. L. Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form // Biochemistry.— 1987.— 26.— P. 4303—4309.
13. Earnshaw W. C., Heck M. M. S. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes // J. Cell. Biol.— 1985.— 190.— P. 1716—1725.
14. Gasser S. M., Laemmli U. K. The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site // EMBO J.— 1986.— 5.— P. 511—518.
15. Berrios M., Osheroff N., Fisher P. A. *In situ* localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of *Drosophila* nuclear matrix fraction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82.— P. 4142—4146.
16. Filipitsky J., Leblanc J., Youdale T. et al. Periodicity of DNA folding and higher order chromatin structures // EMBO J.— 1990.— 9.— P. 1319—1327.

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

Получено 11.12.92

УДК 577.161.2

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА Са И РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ СОЕДИНЕНИЙ D-ВИТАМИННОЙ ПРИРОДЫ НА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ КОЛЛАГЕНОВ I ТИПА КОЖИ ЦЫПЛЯТ

В опытах на цыплятах изучено влияние избытка Са и различных доз соединений D-витаминовой природы на изоэлектрические спектры коллагенов I типа кожи.

Установлены значения рI коллагенов I типа кожи цыплят и показано, что при рахите коллагеновая спираль имеет более сильный положительный заряд, чем в случае нормального белка. Избыток Са в рационе не оказывал заметного воздействия на рI молекул коллагенов I типа кожи. Влияние производных витамина D₃, хотя и было аналогичным по характеру его действия, но отличалось степенью выраженности.

Введение. Одним из основных путей обеспечения животного организма витамином D является его фотобиогенез в коже под влиянием ультрафиолетовых лучей. Регуляторами этого процесса выступают концентрация Са и метаболитов витамина D₃ в плазме крови, интенсивность УФ-облучения, пигментированность кожных покровов [1].

Нельзя исключить также вклада в регуляторный процесс коллагеновых структур, служащих ориентиром для клеток кожи и своеобразным «триггерным механизмом», возможно, непосредственно влияющим на обменные процессы, в том числе обмен Са и витамина D₃ в

© Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, 1993

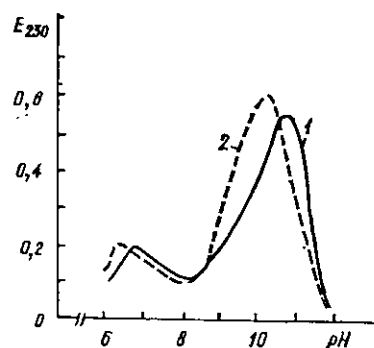
организме [2]. Важное значение при этом имеет поверхностный заряд, который несут коллагеновые структуры.

Предварительные данные [3] свидетельствуют о наличии тесной взаимозависимости между обменом коллагена и витамина D₃ в коже. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение влияния различных концентраций Ca и D-витаминных соединений на поверхностный заряд молекул коллагенов I типа кожи цыплят.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на цыплятах породы Хайсекс белый кросс с 1-го по 30-й день их жизни. Первой группе

Изоэлектрические точки коллагенов I типа кожи цыплят, получавших различные дозы Ca и вещества D₃-витаминной природы

№ группы	pI ₁	pI ₂
1	10,8	6,8
2	10,7	7,0
3	10,3	6,2
4	10,3	6,3
5	10,3	6,3
6	10,2	6,2
7	10,5	6,3
8	10,4	6,2
9	10,7	6,8
10	10,4	6,8
11	10,3	6,2



Изоэлектрические спектры коллагенов I типа кожи цыплят: 1 — рахит; 2 — витамин D₃ (условная норма)

цыплят давали рацион, не содержащий витамина D₃, но сбалансированный по остальным питательным веществам, и с 0,8 % Ca и 0,6 % P_n (рахит) [1]. Птицы второй группы такой же рацион получали уже с избытком Ca и P_n (2 и 1 % соответственно). Третья группа птиц, кроме рациона с 0,8 % Ca и 0,6 % P_n, получала по 10 МЕ витамина D₃ в день на цыпленка и служила условной нормой. Четвертой группе вводили те же дозы витамина на фоне нагрузки рациона избытком Ca и P_n. Остальные семь групп цыплят получали препараты D-витаминных соединений и рацион с нормальным содержанием Ca и P_n: группа № 5 — по 5000 МЕ витамина D₃ в день на птицу, № 6 — по 2 МЕ 1,25-диоксивитамина D₃, № 7 — по 2,5 МЕ 1α-оксивитамина D₃, № 8 — по 100 МЕ 24,25-диоксивитамина D₃, № 9—11 — по 10, 100 и 500 МЕ 3β-фторвитамина D₃ соответственно.

На 30-й день эксперимента цыплят декапитуировали. Из кожи выделяли коллаген I типа по методу [4].

Для получения изоэлектрических спектров коллагенов использовали борат-полиольный градиент [5]. Эксперименты проводили в режиме: $V=1200$ В, $I=4$ мА/см², $t=4$ °С; 24 ч.

Результаты и обсуждение. Экспериментальные данные приведены в таблице и на рисунке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что коллаген I типа кожи цыплят в борат-полиольной системе фокусируется двумя пиками. Основной пик расположен в области pH от 10,2 до 10,8, а небольшой второй пик — от 6,2 до 7,0. Причиной появления второго пика в изоэлектрическом спектре коллагена I типа кожи может быть переход молекулы коллагена из одного конформационного состояния в другое в ходе изофокусирования, по-видимому, сопровождаемый изменением числа внутримолекулярных сшивок (образованных оксализином, лизином и гистидином) и маскированием или демаскированием ионогенных групп [5]. В условиях, при которых производится изофокусирование коллагенов I типа кожи, возможен разрыв имидной связи одного из типов внутримолекулярных сшивок с последующим восстановлением образующихся при этом азотсодержащих катион-ради-

калов и формированием свободных ионогенных групп данных аминокислот [6].

При рахите по сравнению с условной нормой изоточки молекулы коллагена I типа кожи сдвинуты в более щелочную область. При сопоставлении этого результата с ранее полученными данными об аминокислотном составе коллагена I типа кожи цыплят в норме и при рахите [3] обнаружено, что в случае этой патологии несколько повышено содержание аргинина и лизина (т. е. двух из трех аминокислот, чьи боковые радикалы несут положительный заряд). Помимо некоторого абсолютного увеличения содержания данных аминокислот на заряд молекулы белка, возможно, будет оказывать влияние та часть боковых радикалов лизина и гистидина, которая не принимает участия в образовании различных типов внутримолекулярных сшивок и обращена к поверхности коллагеновой спирали.

Избыток Са без витамина D₃ не приводит к существенным изменениям в pI молекулы коллагена по сравнению с рахитом. Нагрузка Са вместе с витамином также не вызывает отклонений pI от уровня условной нормы. Эти данные могут служить косвенным доказательством преобладания прямого, а не опосредованного кальцием механизма действия витамина D₃ на коллаген кожи.

Введение избыточных доз витамина (группа № 5) не сопровождается видимым изменением изоэлектрических точек коллагена I типа кожи при сопоставлении с условной нормой, что вполне согласуется с данными аминокислотного анализа [3]. Когда же вместо витамина D₃ цыплятам вводили его гормонально активную форму — 1,25-(ОН)₂D₃, то pI₁ и pI₂ образовавшегося коллагена кожи сдвигались в более кислую область по сравнению с уровнем условной нормы, что также подтверждается данными аминокислотного анализа, свидетельствующими о снижении содержания в коллагене I типа кожи данной группы лизина и гистидина не только относительно рахита, но и нормы.

Введение вместо витамина 1α-ОНD₃ и 24,25-(ОН)₂D₃ приводило к небольшому сдвигу в щелочную область pI₁, но не pI₂, молекул коллагенов данных групп в сравнении с нормой. Это может быть обусловлено как некоторым возрастанием в составе данных белков содержания лизина, гистидина и аргинина, так и изменением числа и типа внутримолекулярных сшивок и, следовательно, числа положительно заряженных групп на поверхности коллагеновой молекулы.

Минимальная же доза 3β-FD₃ не вызывала заметных отклонений pI₁ и pI₂ от уровня рахита. С увеличением дозы фторпроизводного этот эффект ослабевал, и при максимальном количестве 3β-FD₃ значения pI₁ и pI₂ коллагеновой молекулы соответствовали условной норме.

В результате проведенных экспериментов установлены значения pI коллагенов I типа кожи цыплят при рахите и различной обеспеченности кальцием и веществами D-витаминной природы. При рахите молекула коллагена I типа несет более положительный заряд, чем в норме. Избыток Са в рационе не оказывает существенного влияния на заряд коллагеновой спирали. Влияние производных витамина D₃ зависит от дозы. Характер их действия при этом аналогичен таковому самого витамина, но степень выраженности его различна.

Summary. Influence of Ca load and different doses of vitamin D analogs on skin type I collagen isoelectric specters was studied.

Chicken's skin type I collagens pI were established. It was shown that rachitic collagen molecule had more positive charge then in norm. Ca load hadn't greate influence on skin collagen molecules pI. Effects of vitamin D₃ derivatives were analogous to its influence, but with different degrees of expression.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауман В. К. Биохимия и физиология витамина D.— Рига : Зинатне, 1989.— 480 с.
2. Лебедев Д. А. Коллагеновые структуры — одна из информационных систем организма // Успехи соврем. биологии.— 1979.— 88, № 1 (4).— С. 36—49.

3. Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогоман И. В., Бауман В. К. Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1α,25-дихолевитамина D₃ на аминокислотный состав коллагена кожи цыплят // Докл. АН Украины.— 1992.— № 3.— С. 122—127.
4. Frelstad R. L., Catanese V. M., Rubin D. T. Collagen fractionation-separation of native types I, II, and III by differential precipitation // Anal. Biochem.— 1976.— 71, N 1.— P. 114—118.
5. Троицкий Г. В., Ажицкий Б. Ю. Изоэлектрическое фокусирование белков в самоорганизованных и искусственных pH-градиентах.— Киев: Наук. думка, 1981.— 215 с.
6. Органическая электрохимия / Под ред. М. Бейзера, Х. Лунда.— М.: Химия, 1988.— Т. 1.— 469 с.
7. Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К. Влияние 1α-схевитамина D₃ и 24,25-дихолевитамина D₃ на коллагены кости, кожи и хряща цыплят // Биополимеры и клетка.— 1992.— 8, № 5.— С. 38—43.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии
АН Украины, Киев

Получено 09.10.92

УДК 578.2:11:577.113

М. И. Менджул, С. А. Сырчин, А. А. Аверкиев, Б. А. Ребентиш

СПОСОБЫ ЗАЩИТЫ ДНК ЦИАНОФАГА LPP-3 ОТ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ — МОДИФИКАЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИИ PLESTONEMA BORYANUM

Для проверки наличия модифицированных оснований в ДНК цианофага LPP-3 и цианобактерии *P. boryanum* использовали метод HPLC с помощью установки «System GOLD». Анализ профиля элюции гидролизатов позволил идентифицировать, кроме канонических оснований, присутствие в ДНК *P. boryanum* 5-метилцитозина в концентрации 1,2% и N-6-метиладенина — 4,5%. ДНК LPP-3 содержит 0,8% 5-метилцитозина и не включает N-6-метиладенина. 5-Метилцитозин удалось обнаружить только модифицированным методом гидролиза ДНК фтористоводородной кислотой. Для выявления сайспецифического метилирования ДНК цианофага LPP-3 и ДНК *P. boryanum* подвергли ферментативному гидролизу рестриктазами-изоизомерами, по-разному реагирующими на метилирование остатков цитозина и аденина в сайтах узнавания. Установлено метилирование по аденину в GATC-последовательностях ДНК *P. boryanum* и по второму цитозину CC(AIT)GG-последовательностей как в ДНК *P. boryanum*, так и в ДНК LPP-3. Делается вывод о наличии у *P. boryanum* систем рестрикции — модификации *dam*- и *dstI*-подобного типа. Защита вирусного генома от систем рестрикции — модификации хозяина осуществляется метилированием последовательности *SmC(AIT)GG* и контрреакцией по сайту *BamHI*. По данным рестрикционного анализа, контрреакции, очевидно, подвержена и последовательность *GG(C/G)CC*.

Введение. LPP-3 — цианофаг, инфицирующий нитчатую цианобактерию *P. boryanum*, является перспективным объектом для изучения процессов регуляции вирусной инфекции у фототрофных прокариот.

Ранее нами показано, что ДНК цианофага LPP-3 устойчива к действию многих эндонуклеаз рестрикции с гексапалиндромными нуклеотидными сайтами узнавания. Кроме того, количество экспериментально наблюдаемых сайтов рестрикции для некоторых пента- и тетрапалиндромных рестриктаз значительно отличается от теоретически ожидаемого для такого типа ДНК [6]. Возможными причинами подобного явления могут быть метилирование генома цианофага LPP-3 либо элиминация потенциально «опасных» сайтов. Метилирование ДНК — наиболее распространенный способ защиты вирусного генома от систем рестрикции — модификации прокариотических хозяев [18]. Чаще всего метилированные основания присутствуют в ДНК в виде 5-метилцитозина и N-6-метиладенина и являются продуктами пострепликативного метилирования. Помимо этого, появляется все больше данных о другом способе защиты вирусной ДНК — контрреакции сайтов узнавания рестриктаз и метилаз хозяина. Такой процесс проходит, вероятнее всего, за счет трансверсий либо транзаций оснований в «опасных» для вируса

© М. И. Менджул, С. А. Сырчин, А. А. Аверкиев, Б. А. Ребентиш, 1993