

KINETICS OF OXYGEN SEPARATION DURING CATALASE REACTION OF MOUNTAIN-MEADOW SOIL

M. G. GEVORKIAN, S. SH. YAVRIAN, A. SH. GALSTIAN, N. M. BEJLERIAN

Kinetics of oxygen formation — one of the products of the catalase reactions occurring in soils, has been studied. The results have been compared with the kinetics data received for the same reaction, using substratums' expenditure. The data confirm the earlier expressed hypothesis on the presence of both catalytic and non-catalytic ways of the oxygen peroxide decomposition.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алиев С. А., Гаджисов Д. А., Микайлов Ф. Д. Почвоведение 9, 107, 1981.
2. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван, 1974.
3. Галстян А. Ш. Определение активности ферментов почв. Ереван, 1978.
4. Геворкян М. Г., Галстян А. Ш., Петросян А. А., Бейлерян Н. М. Биолог. ж. Армении, 36, 4, 291, 1983.
5. Геворкян М. Г., Галстян А. Ш., Бейлерян Н. М. Уч. зап. ЕГУ, естеств. науки, 3, 80, 1983.
6. Хазисов Ф. Х. Ферментативная активность почв. М., 1976.
7. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., 1974.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVII, А. 5, 1984

УДК 579.253.4:579.842.11

ДЕЙСТВИЕ РИФАМПИЦИНУСТОЙЧИВЫХ МУТАЦИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ *lon*-МУТАЦИЙ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Г. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

У изогенных, устойчивых к рифампицину *lon*⁺ штаммов, отличающихся аллельным состоянием генов *tenA*, контролирующего биосинтез β-субъединицы РНК-полимеразы, обнаружены различия в чувствительности к УФ-лучам, скорости роста и процессе клеточного деления. Установлена четкая корреляция между скоростью роста и чувствительностью культур к УФ-облучению. Существующая корреляция, связанная с изменением одного и того же компонента клетки, в данном случае РНК-полимеразы, указывает на прямую зависимость УФ-чувствительности *lon*⁺ культур от скорости роста. Добавление рифампицина в пострепликативную среду роста вводило коррективы в УФ-чувствительность *lon*⁺ культур с обязательным соблюдением зависимости от скорости их роста.

Ключевые слова: деление клетки, мутации, РНК-полимеразы, рифампицин

Возникновение *lon*⁺ мутаций у *E. coli* K-12 сопровождается повышением чувствительности культуры к ультрафиолетовым лучам (УФ-лучам) и ингибиторам синтеза ДНК, сверхсинтезом экзополисахаридов и другими изменениями [5, 8, 10]. После временной остановки репликации ДНК УФ-облучением или воздействием ингибиторов ее синтеза

Iop^- клетки теряют способность делиться и растут в виде длинных, мультитядерных, несептированных филаментов, которые впоследствии лизируют [5, 8, 10, 12]. Ряд авторов нарушение клеточного деления связывают с нарушением нормального соотношения ДНК: масса клетки, возникающего вследствие ингибирования синтеза ДНК, при котором белковый метаболизм продолжается [10, 12].

Чувствительность Iop^- мутантов к УФ-лучам и другим агентам может быть понижена за счет ряда пострадикационных обработок, таких, как выдерживание в жидкой непитательной среде [19], или при повышенной температуре [17, 19], высеве на минимальную среду [17, 19] или на полноценную среду с пантоил лактоном [4, 9], добавлении к питательной среде субингибирующих концентраций ингибиторов белкового синтеза [11, 15, 20]. Характерно, что все эти обработки приводят к замедлению роста культуры. Однако точно не установлено, что замедление роста является основной причиной повышения устойчивости культур.

Механизм действия рифампицина, стрептомицина, хлорамфеникола и некоторых других антибиотиков на белковый синтез хорошо изучены. Однако это не дает возможности объяснить механизм их влияния на Iop^- функцию, ввиду того, что они могут взаимодействовать с любым другим, неспецифичным для них компонентом клетки, минуя белковый синтез. В связи с этим изучение влияния мутаций, приводящих к устойчивости к вышеуказанным антибиотикам и затрагивающих процессы транскрипции и трансляции, на проявление Iop^- мутаций может пролить свет на роль белкового синтеза в этом процессе.

В настоящей работе изучено влияние groV^- мутаций, приводящих к рифампицинуустойчивости и затрагивающих структуру β -субъединицы РНК-полимеразы, на экспрессию Iop^- мутаций.

Материал и методики Бактериальные штаммы: A200 ($F^- \text{Iop}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{metB}^- \text{trpA}^-$) получен нами после конъюгационного скрещивания $\text{Mux 154-2 (HfrH lac}^- \text{Iop}^-) \times \text{JC 335 (F}^- \text{Ieu}^- \text{supE}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{metB}^-)$; производные штамма CN327 ($F^- \text{thr}^- \text{argH}^- \text{trp}^- \text{SupE}^-$), содержащие различные аллели groV^- гена, определяющие их устойчивость к рифампицину.

Бактериофаги: P1 vir, T2, T4 и различные поисенс мутанты последнего.

Питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), синтетическая среда M9 [1] с необходимыми добавками факторов роста; Г-среда, для осуществления трансдукции, содержала (г/л) пептон—10, дрожжевой экстракт—5, глюкоза—1, хлористый натрий—5, для адсорбции фага в среду добавляли 5×10^{-4} М хлористого кальция, фосфатный буфер pH 6,8.

УФ-облучение и микроскопическое изучение культур производились по ранее описанному методу [2]. Трансдукцию фагом P1 vir осуществляли по Леноксу [13]. Наличие поисенс супрессоров проверялось по росту тесторных фагов, несущих в своем геноме поисенс мутации. Скорость накопления биомассы определялась по мутности культуры на ФЭК-56М.

Результаты и обсуждение. В работе были использованы три устойчивых к рифампицину (риф-р) мутанта, различающиеся между собой рядом фенотипических признаков, таких, как скорость роста, морфология колоний, рост тесторных фагов, несущих различные поисенс мутации, термочувствительность и другие [3]. Все риф-р мутации локализи-

ровались в *groV* локусе и затрагивали β -субъединицу РНК-полимеразы. Перенос *groV* мутаций в *lon*⁻ штамм A200 осуществлялся с помощью фага Pl vir, после которого производился отбор *metV*⁻ и рифампициноустойчивых рекомбинантов. Контрандукция рифампициноустойчивости с *metV*⁻ маркером составляла 20–30% в зависимости от примененного донора. Проверка морфофизиологических и биохимических особенностей рекомбинантов показала, что риф-р мутации в реципиентном штамме обладали примерно тем же плеiotропным эффектом, что и в донорных штаммах. Отсутствие некоторых фенотипических признаков связано с различиями в генетических конституциях штаммов.

Повышенная чувствительность к ультрафиолетовому облучению является одной из характерных черт *lon*⁻ мутантов. При этом замечено, что гибель *lon*⁻ мутантов при низких дозах УФ происходит в основном за счет нарушения цитокинеза, вследствие которого клетки удлиняются более чем в 50 раз, а затем лизируют. В таких удлинённых клетках (филаментах) синтез ДНК и выщепление пиримидиновых димеров происходит с нормальной скоростью, и ядерный материал распределяется по всей длине равномерно в виде фрагментов. Ингибирование синтеза межклеточных перегородок, по-видимому, является основной причиной гибели облученных клеток. Гибель же этих мутантов при высоких дозах УФ происходит из-за повреждений ДНК, которые репарационная система клетки не успевает восстанавливать.

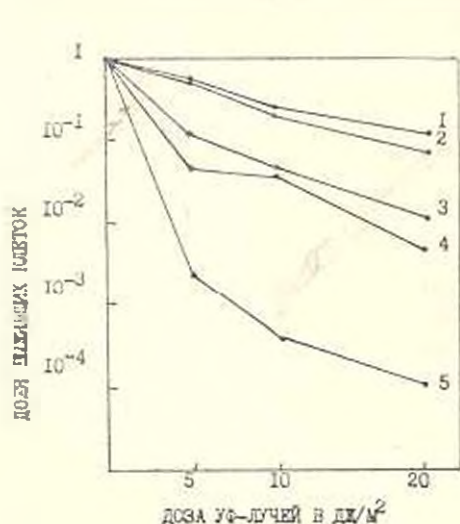


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние риф-р мутаций на УФ-чувствительность *lon*⁻ штаммов. Обозначение штаммов: 1 — дикий штамм JC335 (*lon*⁻ *groV*⁻), 2 — АСР12 (*lon*⁻ *groV*401), 3 — АСР94 (*lon*⁻ *groV*409), 4 — А200 (*lon*⁻ *groV*⁻), 5 — АСР32 (*lon*⁻ *groV*493).

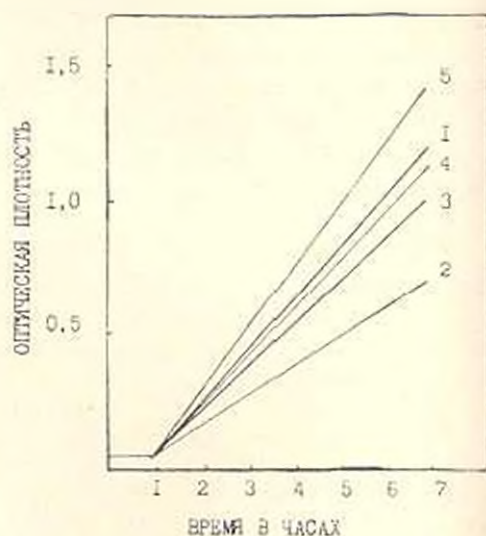


Рис. 2.

Рис. 2. Скорость накопления биомассы у *lon*⁻ *groV*⁻ штаммов. Обозначения, как на рис. 1.

Проверка показала, что при наличии риф-р мутаций отношение мутантов к УФ-облучению подвергается существенным модификациям (рис. 1). Так, включение *groV*401 аллеля повышает устойчивость к

УФ у lon^- мутанта до уровня, характерного для дикого штамма, в то время как внесение groB403 аллеля понижает уровень устойчивости до 100 раз. Внесение же groB109 аллеля существенных сдвигов в УФ-чувствительности lon^- штамма не вызывает.

Микроскопические исследования препаратов культур, облученных дозой 5 Дж/м², показали, что groB^- мутации оказывают влияние на процесс клеточного деления. Так, в популяции исходной lon^- культуры после облучения около 90% клеток теряют способность к делению и растут в виде филаментов. В популяции штамма, содержащего groB101 мутацию, их количество понижается до 5%, а у штамма, содержащего groB103 мутацию, количество филаментов, наоборот, повышается до 99,9%. Включение же groB409 мутации существенно не влияет на количество филаментов в клеточной популяции lon^- культуры.

Была изучена скорость накопления биомассы у рифампицину-устойчивых lon^- культур (рис. 2). Как видно из рисунка, включение различ-

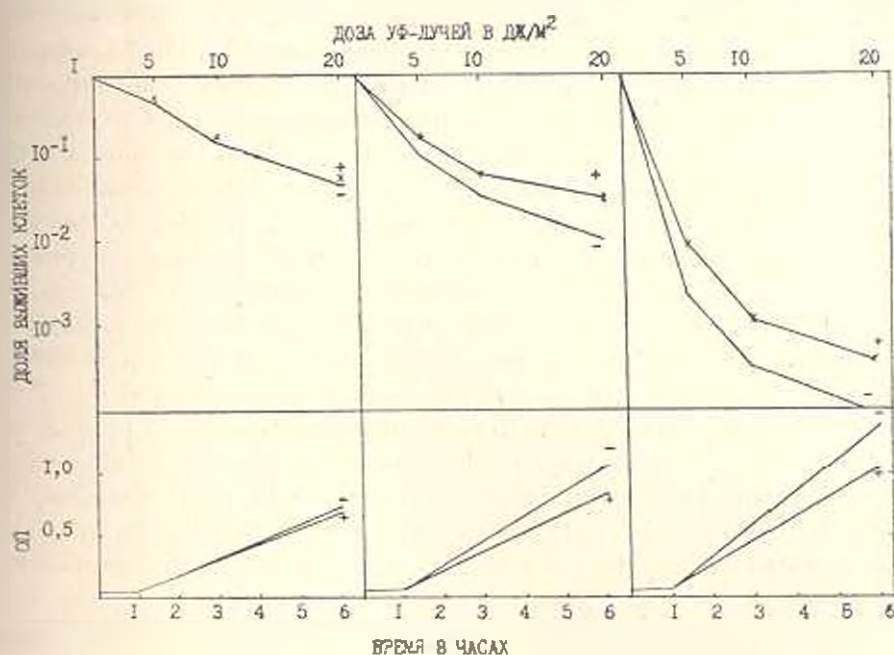


Рис. 3. Влияние рифампицина на УФ-чувствительность и скорость накопления биомассы у lon^- groB^- штаммов. + в среду добавлено 50 мкг/мл рифампицина; — рифампицин не добавлен.

ных groB^- аллелей оказывает существенное влияние на этот процесс. В то же время включение самого lon^- мутации в дикий штамм не влияет на скорость накопления биомассы. Обнаруживается корреляция между изменением скорости роста и УФ-чувствительностью культур. Быстрорастущие оказались более чувствительными к УФ-облучению по сравнению с медленно растущими.

Изучалось также влияние рифампицина на обусловленные groB^- мутациями модификации lon^- фенотипа. Как видно из рис. 3, внесе-

ние антибиотика в пострадиационную среду роста существенным образом отражается на выживаемости УФ-облученных lon^- groV^- штаммов. У lon^- культур, получивших groV403 и groV409 аллели, выживаемость на среде с рифампицином в 2–3 раза выше, чем на среде без антибиотика. Действие groV401 аллеля на lon^- мутацию со стороны рифампицина не подвергалось модификации. Аналогичным образом рифампицин влияет на скорость накопления биомассы культурами и на количество филаментов в популяциях облученных клеток.

Как следует из приведенных данных, сдвиги в скорости роста, вызванных groV^- мутациями, оказывают сильное влияние на чувствительность lon^- мутантов к УФ-облучению. Стимуляция скорости роста lon^- мутантов приводит к усилению их чувствительности, а замедление роста к устойчивости к УФ-облучению. Ранее было показано, что рифампицин при добавлении в пострадиационную среду роста приводит к увеличению выживаемости lon^- мутантов [11, 15]. В наших опытах такое же влияние он оказывал на рифампицинустойчивые lon^- штаммы. Рифампицин, как известно, связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы и подавляет инициацию биосинтеза РНК при низких концентрациях, а при высоких подавляет также процесс элонгации [22]. β -Субъединица играет также решающую роль в аутогенной регуляции биосинтеза РНК-полимеразы [22]. Предполагается, что действию рифампицина подвергается участок β -субъединицы, отвечающий как за репрессию, так и за катализ РНК-полимеразы [22]. Поэтому среди рифампицинустойчивых мутантов могут оказаться дерепрессированные и суперрепрессированные варианты. Такие пертурбации биосинтеза РНК-полимеразы не могут сильно не отразиться на биосинтезе белка в клетке, играющего, по мнению ряда авторов [21], важную роль в инициации сенсации у lon^- мутантов. В экспериментах *in vitro* было показано, что в ряде случаев мутационно измененная β -субъединица может приводить к ошибкам считывания информации транскрибируемой цепи ДНК [18]. Ошибки, допускаемые мутантной РНК-полимеразой при транскрипции генетической информации, не могут сильно не отразиться на всей физиологии клетки, в том числе на скорости ее роста и делении.

Не исключена возможность, что groV^- мутации оказывают селективное влияние на проявление lon^- мутаций. Избирательная супрессия groV^- мутациями была показана по отношению к grsI^- [7], dna^- [6] и ряду других мутаций. Специфическое действие на регуляцию некоторых генов было показано также при действии низких концентраций рифампицина [22]. Однако, как следует из наших данных, основной причиной, вызывающей сдвиги в проявлении lon^- мутаций, является изменение скорости роста культуры. В то же время lon^- мутации сами не приводят к повышению скорости роста (рис. 2), чем можно было бы объяснить их необычную чувствительность к УФ-лучам. Более того, мутации в suI^- (suIA) гене, приводящие к полной супрессии УФ-чувствительности lon^- мутантов, совершенно не влияют на скорость их роста [16]. Исходя из сказанного, можно сделать предположение, что эффект groV^- мутации сводится к устранению причин, вызывающих необратимое ингибирование сентообразования у облученных lon^- культур посредством ре-

туляции белкового синтеза на уровне транскрипции, а не восстановление контролируемой *lon* геном функции.

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот (НИИТА)

ԻՌԶԱՐԳՈՒՑԻՆԻ ՀԱՆԴԻՊ ԿԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՑՄԱՆԻՐԻ ԱՉԻՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
LON-ՄՈՒՏԱՑՄԱՆԻՐԻ ԱՐՏԱՀԱՅՏՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ *ESCHERICHIA*
COLI K-12-Ի ՄՈՏ

Հ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՅԱՆ, Ա. Ն. ԲԱՐՍԵԳԻԱՆ, Մ. Գ. ՕԳԱՆԵՍԻԱՆ

Իզոգեն, ռիֆամպիցինի հանդեպ կայուն *lon*՝ շտամների մոտ (որոնք միայնացից տարբերվում են *rpoB* գենի ալելային վիճակով) հայտնաբերված են տարբերություններ ՈւՄ—ճառագայթների հանդեպ ունեցած զգայնության, աճի արագության և բջջի բաժանման պրոցեսում: Ցույց է տրված պարզորոշ արտահայտված կոռելյացիա բջջի բաժանման արագության և ՈւՄ-ճառագայթների նկատմամբ ունեցած զգայնության միջև: Գոյություն ունեցող կոռելյացիան, որը կապված է բջջի միայն մի կոմպոնենտի՝ սովյալ զնալքում ՌՆԹ-պոլիմերազայի փոփոխության հետ, ցույց է տալիս ՈւՄ-ճառագայթների հանդեպ ունեցած *lon*՝ շտամների զգայնության կախվածությունը աճի արագությունից: Ռիֆամպիցինի ալելայցումը հետճառագայթային աճի միջավայրին առաջացնում է ՈւՄ-զգայնության փոփոխություն՝ կապված աճի արագության հետ նկատի ունենալով այն հանգամանքը, որ *lon*՝ մուտացիաները ինքնըստինքյան չեն առաջացնում աճի արագության փոփոխություն, հաժանաբար, *rpoB* մուտացիաների էֆեկտը հանդում է բջջի բաժանման ինդիբիցիայի պատճառների վերացմանը և ոչ թե *lon*-ֆունկցիայի վերակահանգամանը:

THE EFFECT OF RIFAMPICIN-RESISTANT MUTATIONS
ON THE EXPRESSION OF LON-MUTATIONS IN *ESCHERICHIA*
COLI K-12

H. G. OGANESSIAN, A. N. BARSEGHIAN, M. G. OGANESSIAN

Changes have been obtained in UV-sensitivity, growth rate and cell division processes in isogenic *lon*⁻ strains differing from each other by allelic state of *rpoB* gene. A strict correlation has been obtained between the growth rate and UV-sensitivity of cultures. The correlation which is connected with one and the same component, that is to say RNA-polymerase, indicates the direct dependence of UV-sensitivity from the growth rate of *lon*⁻ cultures. The same correlation has been found in the presence of rifampicin in postirradiation growth medium. The effect of *rpoB*⁻ mutations brings to the lack of factors, causing irreversible inhibition of cell division, but not correction of *lon*-function because the *lon* mutations do not bring to the changes of growth rate.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамо М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Барсегян А. А., Оганесян Г. Г., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 36. 6, 479—181, 1983.

3. Оганесян М. Г., Арутюнян А. В. Биол. ж. Армении, 31, 6, 624—632, 1978.
4. Adler H. I., Hardigree A. A. J. Bacteriol., 87, 720—726, 1964.
5. Adler H. I., Hardigree A. A. Radiat. Res., 25, 92—102, 1965.
6. Bagdasarian M. M., Izakowska M., Bagdasarian M. J. Bacteriol., 130, 577—582, 1977.
7. Chakrabarti S. L., Corini L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 2084—2087, 1975.
8. Howard-Flanders P., Simson E., Theriot L. Genetics, 49, 237—246, 1964.
9. Grula E. A., Crula M. M. J. Bacteriol., 83, 981—988, 1962.
10. Kantor G. J., Deering R. A. J. Bacteriol., 95, 250—253, 1968.
11. Kato Y., Nakayama H. Bloch, et Biophys. Acta, 477, 371—378, 1977.
12. Leighton P. M., Donachie W. D. J. Bacteriol., 102, 810—814, 1970.
13. Lennox E. Virology, 1, 190—206, 1955.
14. Markovitz A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 51, 239—246, 1964.
15. Marshall N. G., Gillies N. E., Panchapagesan G. Mutat. Res., 9, 145—152, 1973.
16. Oganessian M. G., Oganessian H. G. Genetics, 74, 200s, 1973.
17. Oganessian H. G., Oganessian M. G. Studia biophysica, 53, 151—152, 1975.
18. Ozoline O. N., Kamzolova S. G., Oganessian M. G. Febs Letters, 110, 123—126, 1980.
19. Roberts R. B., Aldous E. J. Bacteriol., 57, 363—375, 1949.
20. Skavronskaya A. G., Smirnov G. B. Mutation Res., 8, 647—650, 1969.
21. Witkin E. M. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 57, 1275—1279, 1967.
22. Yura T., Ishihama A. Ann. Rev. Genet., 13, 53—97, 1979.

«Биол. ж. Армении», т. XXXVII, № 5, 1984

УДК 581.15.633.15

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕРБИЦИДОВ 2,4-Д, ДАЛАПОНА И СЕМЕРОНА НА ХРОМОСОМЫ ALLIUM CEA L.

Р. Б. АЙРАПЕТЯН, В. А. АВАКЯН, Р. А. АЗАТЯН

Выявлено цитогенетическое действие гербицидов 2,4-Д, далапона и семерона на хромосомы лука *Allium cepa* L. Показано, что все эти гербициды обладают мутагенной активностью во всех фазах клеточного цикла.

Ключевые слова: гербициды, хромосомы, абберация, мутаген, далапон, семерон.

Пестициды занимают значительное место среди мутагенов

Изучение мутагенного действия пестицидов имеет важное значение как для решения вопросов использования имеющихся в настоящее время препаратов, так и для направленного поиска веществ, обладающих высокими пестицидными свойствами, и безопасных в генетическом отношении. Имеется достаточно фактов, подтверждающих реальность такой опасности при накоплении пестицидов в почве, воде, воздухе, в тканях и органах растений и животных [1—6].

2,4-Д (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота) относится к группе производных хлорфеноксиуксусной кислоты. Этот гербицид используется для борьбы с двудольными сорняками в посевах зерновых культур. Как правило, он средне малотоксичен и оказывает сходное биологическое действие на организм теплокровных, что в свою очередь свидетельству-