

Показано, что 6-БАП, кинетин, этрел и ретардант ССС способствуют устранению таких биологических недостатков, как клейстогамия, осыпание цветков и завязей, ломкость гроздевой лозы и гребней у сортов винограда с обоеполым типом цветка

ЛИТЕРАТУРА

1. Агамян Л. Б. Канд. дисс., Тбилиси, 1981.
2. Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функция. М., 1973.
3. Лазаревский М. А. Изучение сортов винограда. Ростов, 1963.
4. Миллева Э. Л., Смирнова И. К., Чайлахян М. Х. ДАН СССР, 1, 1983.
5. Саркисова М. М., Чайлахян М. Х. ДАН АрмССР, 80, 2, 92—95, 1985.
6. Чайлахян М. Х., Саркисова М. М. Регуляторы роста у виноградной лозы и плодовых культур, Ереван, 1980.
7. Bangerth F., Götze G. Wein—Wiss. 30, 3, 121—128, 1975.
8. Das N., Patil K., Skoog F. Physiol. plantarum, 9, 1956.
9. Jackson M. B., Osborne D. Z. Nature, 225, 1019, 1967.
10. Martinez H. D., Diaz M. D., Ruggert G. Agrociencia, 21, 13—23, 1975.
11. Nelson J. M., Sharples G. C. Hort. Science. Sec., 1, 9, 6, 598—600, 1974.
12. Mitsch I. In Biochemistry and physiology of plant growth substances. Ottawa, 1968.
13. Osborne D. In Biochemistry and physiology of plant growth substances. Ottawa, 1968.
14. Richmond A. A., Lang A. Science, 125, 3219, 1958.
15. Weaver R. J., Van Overbeek J., Pool R. M., Nature 206, 952—953, 1965.
16. Weaver R. J., Stindly N. W., Klizner N. M. Plant Physiol., 44, 183—188, 1969.

Поступило 13.X 1987 г.

Биолог. ж. Армении. т. 41, № 2, 1988

УДК 577.1

К МЕХАНИЗМУ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССА ТРАНСФОРМАЦИИ *Escherichia coli* ds-RНК

Р. А. ЗАХАРЯН, Ю. В. ТАДЕВОСЯН, Н. Г. АЗАРЯН, К. Г. КАРАГЕЗЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что ds-RНК существенно повышает степень трансформации у *E. coli*. Появление свободных ненасыщенных жирных кислот и промежуточных в ходе высвобождения последних лизоформ фосфолипидов являются факторами, в условиях воздействия ds-RНК повышающими проницаемость клеточной мембраны бактерий, способствующими переносу ДНК в клетку и трансформации.

Ցույց է տրվել, որ ds-RНК-ն զգալիորեն բարձրացնում է սրանաֆորմացիայի առաժնային *E. coli*-ի մոտ: Ազատ ցնդանյալ ճարպաթթուների և լիզոլիզների առաջանումը ընթացքում միջանկյալ ֆոսֆոլիպիդների լիզոֆորմների է հայտ գալը այնպիսի գործոններ են, որոնք ds-RНК-ի ազդեցության պայմաններում բարձրացնում են բակտերիայի թղջային թաղանթի թափանցելիությունը և նպաստում են ԴՆԹ-ի փոխադրմանը բջիջ ներս և սրանաֆորմացիային:

The obtained data demonstrate that ds-RNA essentially elevates the level of *E. coli* transformation. The appearance of free nonsaturated fatty acids and mediatory lysoforms of phospholipids under the action of ds-RNA appears to be the factor which provides the increasing of bacterial cells membrane permeability and promotes the DNA transport into the cells.

Мембрана—трансформация—ds-RНК—фосфолипиды.

Перенос ДНК через плазматическую мембрану клеток прокариот обеспечивается в конечном итоге процессе их генетической трансформации. Обычно частота трансформации — величина достаточно низкая, свидетельствующая о том, что в популяции клеток только незначительная часть «компетентна» к трансформации. Состояние «компетентности» клеток определяется стадией жизненного цикла и, как предполагают, может наступать также в результате подавления катаболитной репрессии [8]. и-АМФ способна подавлять катаболитную репрессию, в значительной степени она способствует развитию компетентности, в частности, у *Haemophilus influenzae* [13]. Установлено, что состояние «компетентности» в клетках прокариот индуцируется специфическими активаторами белковой природы, взаимодействующими со структурами плазматической мембраны и формирующими на поверхности плазматической мембраны периплазматические везикулы, с которыми трансформирующая ДНК образует резистентный к ДНКазе комплекс. Формирование комплекса достаточно специфично, обеспечивается взаимодействием реенторных ДНК-связывающих белков с определенной первичной структурой [7].

Состояние относительно высокой компетентности, в частности, для грамотрицательной бактерии *E. coli* достигается предварительной обработкой ионами Ca^{2+} [5]. Предполагается, что Ca^{2+} повышает проницаемость либо уже существующих пор в мембране, либо индуцирует образование новых; при этом рассматриваются такие биофизические изменения в мембране, как снижение устойчивости гидрофобных связей (10° , Ca^{2+}) со структурными перестройками в мембране или индукция фазового перехода алифатных радикалов жирных кислот фосфолипидных молекул из жидкого состояния в кристаллическое, сопровождающееся дестабилизацией и локальными нарушениями бислоя [11]. Ранее нами [1] было показано, что в присутствии двуспиральной РНК низкой молекулярной массы из дрожжей у микроорганизмов достигается достаточная степень «компетентности» к трансформации, конъюгации и трансфекции. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти биофизические представления о механизмах переноса ДНК через плазматическую мембрану являются не единственными и что, скорее, на мембране разыгрывается комплекс событий, сопряженных также с изменением биохимизма плазматической мембраны. Подобное представление подтверждается наличием у компетентных микроорганизмов повышенной способности к частичному автолизу клеточной мембраны [9, 10].

В связи с вышеизложенным нами было изучено включение [^{14}C] олеиновой кислоты в фосфолипиды *E. coli* в условиях индукции состояния компетентности клеток дс-РНК, а также влияние последней на обменяемость фосфолипидов *E. coli*, предварительно преникубированных с [^{14}C] олеиновой кислотой.

Материал и методика. Введение [^{14}C] олеиновой кислоты в фосфолипиды *E. coli* осуществляли по методу Вейса и соотр. [12].

E. coli в количестве 10^7 клеток инкубировали в среде с 0,05 М трис-НСI буфера (рН 7,0), содержащей 1 мМ Ca^{2+} и 10 мкг дс-РНК (конечный объем 0,5 мл). Парал-

лельно инкубировали контрольные пробы в той же буферной системе в присутствии либо 1 мМ Ca^{2+} , либо 5 мМ ЭГТА. По завершении инкубации, проведенной при 24° в течение 5 и 10 мин липиды экстрагировали по методу Блай и Дайер [4] с последующим фракционированием их методом одномерной ТСХ в системах растворителей хлороформ—метанол—уксусная кислота— H_2O (25:15:4:2) и петролейный эфир—диэтиловый эфир—муравьиная кислота (60:40:2). Степень радиоактивности идентифицированных фракций фосфо- и нейтральных липидов определяли в жидкости Брея на сцинтилляционном спектрометре (Roche-Bioelectronique SL-4221, Франция) и сканированием пластинок на радиосканируемом приборе (Berthold, ФРГ).

Результаты и обсуждение. В табл. 1 обобщены результаты экспериментов по трансформации *E. coli* плазмидой pBR 322, трансфекции РрС1 ДНК фага ϕ 1-16 и конъюгации в скрещиваниях Да 9 (РрС 7 *met* *Naph*) \times РрС 1.

Таблица 1. Влияние дс-РНК на перенос ДНК в клетки *E. coli*

Раствор	Частота		
	конъюгации	трансфекции	трансформации
Ca^{2+} (0,1 М)	—	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
дс-РНК без Ca^{2+}	$1 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
дс-РНК+ Ca^{2+} (0,01 М)	$7 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$
Ca^{2+} (0,01 М)	$5 \cdot 10^{-4}$	—	$1 \cdot 10^8$
α -бульон	$5 \cdot 10^{-5}$	—	—

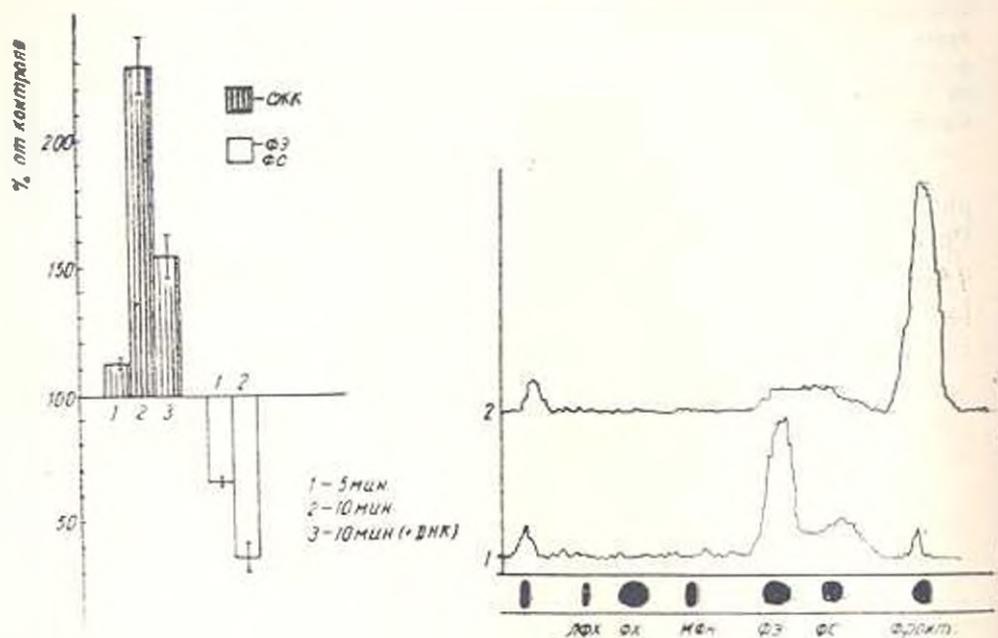
Полученные результаты свидетельствуют, что дс-РНК в отсутствие ионов Ca^{2+} значительно повышает в популяции число «компетентных» к трансформации, трансфекции и конъюгации клеток. Одновременно обнаружен факт стимуляции процесса трансформации дс-РНК (на два порядка) в присутствии 0,01 М Ca^{2+} в концентрации, которая сама по себе недостаточно активна для переноса ДНК в клетку. Особенно же четко выявлена индукция дс-РНК состояния компетентности клеток *E. coli* в присутствии 0,01 М Ca^{2+} — $5 \cdot 10^7$ против 1×10^3 при наличии в среде только Ca^{2+} 0,01 М.

Фракционирование методом одномерной ТСХ фосфолипидов *E. coli*, обработанных дс-РНК, после предварительного включения [^{14}C]олеиновой кислоты в ФЭ и ФС клеток, показало, что дс-РНК существенно, на 230%, стимулирует высвобождение [^{14}C] олеиновой кислоты из ФЭ и ФС (рис., слева).

ДНК обладает относительно низкой, хотя и достаточно выраженной активностью.

Изучение включения [^{14}C] олеиновой кислоты в фосфолипиды *E. coli* показало (рис., справа, табл. 2), что в контрольных образцах экзогенная олеиновая кислота включается преимущественно по фракцию фосфатидилэтанолamina и в меньшей степени фосфатидилсерина. В присутствии же дс-РНК имеет место практически полное подавление процесса ацилирования или реакцирования лизоформ фосфолипидов, а также ингибирование других возможных путей утилизации олеиновой кислоты.

Специфичность фосфолипазной активности у микроорганизмов остается недостаточно исследованной и прежде всего из-за присутствия в микроорганизмах высокоактивных лизофосфолипаз, разлагающих



Слева высвобождение под влиянием дс-РНК [^{14}C] олеиновой кислоты из фосфолипидов (ФЭ и ФС) *E. coli*, предварительно инкубированных с [^{14}C] олеиновой кислотой. 1—инкубация *E. coli* с дс-РНК в течение 5 и 10 мин соответственно; 3—инкубация *E. coli* с ДНК в течение 10 мин. Справа сканиграмма включения [^{14}C] олеиновой кислоты в фосфолипиды. 1—отсутствие дс-РНК. 2—в присутствии дс-РНК. ЛФХ—лизосфатидилхоллин, ФХ—фосфатидилхоллин, МФП—монофосфатидилинозит, ФЭ—фосфатидилацетилламин, ФС—фосфатидилсерин, СЖК—свободные жирные кислоты.

продукты реакции [6]. Считается, что основным липолитическим ферментом у бактерий, в том числе и у *E. coli*, является фосфолипаза A_1 , хотя наличие фосфолипазы A_2 у *E. coli*, и прежде всего в клеточной мембране, было показано в ряде работ [2, 3]. Оба фермента для выражения своей активности требуют наличия Ca^{2+} .

Таблица 2. Включение [^{14}C] олеиновой кислоты в ФЭ *E. coli* под влиянием дс-РНК

Условия опыта	ФЭ		СЖК	
	имп/мин	%	имп/мин	%
—дс РНК	6197.0±86.7	100	7654.9±131.1	100
+дс РНК	4147.9±356.2	66.9	13598.5±1446.0	177.6

Учитывая вышесказанное, а также то, что в качестве эндогенного субстрата в мембранах *E. coli* образуются 1-ацил-2- ^{14}C -олеил Ф.Л., усиление ферментативного выхода олеиновой кислоты можно считать

следствием двух возможных путей гидролиза ФЛ: активации фосфолипазы A_2 , с прямым отщеплением ненасыщенной жирной кислоты или активации системы фосфолипазы A_1 —лизофосфолипазы.

Как бы то ни было, появление даже на короткое время промежуточных лизоформ фосфолипидов и ненасыщенных свободных жирных кислот, обладающих мембранолитическими свойствами, по-видимому, является фактором, обеспечивающим дестабилизацию и локальные нарушения в бислое, способствующие повышению проницаемости клеточной мембраны бактерий и переносу ДНК в клетку. В пользу вышесказанного свидетельствуют данные относительно практически полного ингибирования в присутствии 5 мМ ЭГТА как активности фосфолипазы- A_2 , так и стимулирующей активности де-РНК. При отсутствии ЭГТА и Ca^{2+} де-РНК сама существенно стимулирует процесс трансформации *E. coli*. Мы предполагаем, что де-РНК, вступив в контакт с поверхностью плазматической мембраны клетки, вызывает локальную мобилизацию ионов Ca^{2+} , связывающих липополисахариды внешней мембраны, обеспечивая тем самым доступность фосфолипидов и активацию фосфолипаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарян Р. А., Азарян Н. Г., Арутюнян Дж. Г. ДАН СССР, 285, 5, 1251—1253, 1986.
2. Bernard M. C., Brison J., Denis F., Rosenberg A. J. Biochemie, 54, 297, 1972.
3. Bernard M. C., Brison J., Denis F., Rosenberg A. J. Biochemie, 54, 261, 1972.
4. Bligh E., Dyer W. J. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911—917, 1959.
5. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 69, 2110—2111, 1973.
6. Ferber E., Mundler P. G., Fischer H., Gerisch G. Eur. J. Biochem., 14, 253, 1970.
7. Mark K. E., Hamilton S. O. J. Membrane Biol., 81, 2, 89—103, 1981.
8. Miller D. H., Huang P. C. J. Bacteriol., 109, 560—564, 1978.
9. Mosser J. L., Tomasz A. J. Biol. Chem., 245, 287—298, 1970.
10. Notani N. K., Setlow J. K. Progr. Nucl. Acids Res., 14, 39—100, 1974.
11. Papahadjopoulos D., Vail W. J., Newton C. Biochem. Biophys. Acta, 455, 379—398, 1977.
12. Weiss J., Beckerdite—Quagliata S., Eistach P. J. Biol. Chem., 254, 11010—11014, 1979.
13. Wist E. M., Alexander S. P., Powers M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 471—474, 1973.

Поступило 13.X 1987 г.