

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

#### ЛИТЕРАТУРА

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

Получено 9 VI 1989 г.

Биол. журн. Армении, №2(43) 1990

УДК 577.150.3+577.150.36 | 577.150.4

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

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

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

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

Հայտնաբերվել է (մանրէի նկատմամբ զգալիության բարձրացում *Candida maltosa* խմորաբանական մեղրիչ տեսակի մոտ ջերմակայուն տեսակի նամեմատու- թյամբ թե՛ ջերմության բարձրացման և թե՛ էթանոլի բարձր կոնցենտրակցիայի

Сокращения: БТШ—белки термошока.

բամ: Այդ պարմաներով նրանք էլ սրտեղծորէ համազարդ խիւստով  
մքայն զերմակայան խնարաններէ մտ, իսկ վայրի նորաստեղծներէ մտ, բնդ-  
նախապէր, սրտեղծորէ սխտիւթնան ածիւմ:

Increased sensitivity of the thermosensitive strains of *Candida maltosa* yeasts to ethanol in comparison with the thermotolerant type not only in case of increase of temperature but also in case of addition of ethanol was shown. Under these conditions the stimulation of proteolytic activity in thermotolerant mutant of yeasts and decrease of this activity in wild type was observed.

Дрожжи *Candida maltosa* — протам — температурной и этанолюму стресса.

Повышенная устойчивость организмов к воздействию высоких температур, выработанная предварительной обработкой в условиях умеренных температур, получила название термотолерантности [1]. Установлено, что под воздействием разнообразных стрессорных факторов, в том числе температурного, этанола и ряда других, происходит синтез специфических белков, получивших название «стрессовых», или БШ [2]. Изучение чувствительности дрожжей к этанолу выявило задержку роста под воздействием температуры [3]. Показано, что этанол оказывает влияние на организацию мембран, вызывая повышение проницаемости для ионов и малых клеточных метаболитов [4]. Повышенной резистентностью к этанолу наделена плазматическая мембрана *Sacharomyces cerevisiae* [5]. По всей видимости, плазматическая мембрана представляет собой ту самую «мишень» воздействия, которая, ингибируя внутренний транспорт, спасает клетку от токсикоза. Воздействие стрессоров приводит к драматическим изменениям в клеточном метаболизме, затрагивая функционирование многих ферментативных систем. Установлено, что в эукариотических клетках существует центральная, универсальная система протеолиза для снижения уровня полипептидов, основным компонентом которой является белок убиквитин. Эта система обеспечивает избирательный протеолиз белков [6]. Можно заключить, что изменение протеолитической активности может представлять собой один из компонентов системы для «ощущения» стресса и передачи соответствующего сигнала в ядро, приводящего к синтезу БШ. В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения влияния различных концентраций этанола на рост и развитие штамма *C. maltosa* и его термотолерантного мутанта, а также особенностей активации протеолитической системы указанными дрожжевыми штаммами при пролонгации этанолюму стресса.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили аспорогенные мезофильные дрожжи *C. maltosa* и его термотолерантный мутант. Дрожжи поддерживали на агаризованной среде при комнатной температуре. Выращивали на жидкой минеральной среде при 32° и 10° соответственно для дикого штамма и его термотолерантного мутанта. Источником углерода служила глюкоза в концентрации 2%. Прирост биомассы определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм (ЛКВ, Швейцария). В момент резкого прироста биомассы отбирали пробы в объеме по 1,5 мл, которые инкубировали при указанных температурах. В каждую пробу вносили этанол в различных концентрациях — от 1 до 10% в расчете на указанный объем. Пробу отбирали через

каждые 10 мин в течение одного часа. Непосредственно сразу после отбора и пробу вносили  $^{35}\text{S}$ -метионин (в концентрации 30 мкд) и инкубировали в течение 2 минут. По окончании инкубации к суспензии добавляли раствор меченого метионина, количество которого в 100 раз превышало таковое в среде, и 50%-ный раствор ТХУ до конечной концентрации ее 7—8%. Суспензию прогревали на кипящей бане в течение 10 мин, замораживали при  $-40^\circ$ , осадки переносили на фильтр из стекловолокна типа GF/C (фирма «Ватман», Великобритания), предварительно смоченный 5%-ным раствором метионина в ТХУ. Осадки на фильтрах промывали тем же раствором и переносили во флаконы с диоксидным синтиллятором. Уровень радиоактивности образцов определяли на синтилляционном счетчике Марк-2 (фирма «Серл», Голландия) с последующим расчетом абсолютной радиоактивности. О протеолитической активности в дрожжевом экстракте судили по степени деградации азоказеина. Биомассу отбирали в экспоненциальной фазе роста. Одну часть подвергали термошоку при  $37^\circ$  и  $44^\circ$  в течение 2 ч соответственно для дикого штамма дрожжей и его термотолерантного мутанта; а другую — этанольному стрессу также в течение указанного времени, причем конечная концентрация этанола в среде составляла 6%. Разрушение клеток для экстракции из них водорастворимых белков проводили в дезинтеграторе («Браун Мензунген», ФРГ) в Трис-буфере (рН 7.4) с бусами баллотон размер 0.4 мм. Гомогенат, полученный после разрушения клеток, центрифугировали при 18 000 g в течение 15 мин при температуре  $4^\circ\text{C}$ . Полученный супернатант повторно осаждали при 50 000 g в течение 2 часов. Надосадочную жидкость сконцентрировали ПЭГОм 6000 в целлюлозных мешочках с размером пор 3000—5000 дальтон. Полученный гомогенат анализировали против буфера, содержащего 30 mM Tris-HCl (рН 7.5) в течение суток. Содержание белка в пробегах определяли по Лоури; протеолитическую активность — в 3,3 мл смеси, содержащей 100 mM Tris-HCl (рН 8), 50 mM KCl, 6 mM 2-меркаптоэтанол, в расчете 10 мкг/мл азоказеина на 0,5 мкг/мл белка в пробе. С целью проведения спонтанной деградации азоказеина пробы прединкубировали в течение часа с добавлением 0,5 мл ТХУ к 0,6 мл инкубируемой смеси. Пробы осаждали при 50 000 g в течение 10 мин и измеряли спектрофотометрически (ЛКВ, Швеция) против контроля, содержащего в том же составе указанные компоненты, за исключением белка, при длине волны 335 нм. За единицу протеолитической активности была принята величина 1 единица =  $A_{335}$  нм/час/мл.

**Результаты и обсуждение.** При сравнительном исследовании дикого штамма дрожжей *S. maltosa* и его термотолерантного мутанта были выявлены существенные различия в скорости включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в полимеры биомассы при этанольном стрессе. Мезофильный штамм оказался гораздо более чувствительным к присутствию в среде этанола, что выражалось в явном подавлении синтеза ряда высокомолекулярных соединений даже при незначительных концентрациях его в среде — от 10 до 50 и почти полное подавление при 10%, термотолерантный же мутант его проявлял повышенную резистентность по сравнению со своим диким предшественником. При низких концентрациях этанола для термотолерантного мутанта обнаружено даже некоторое повышение интенсивности включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в высокомолекулярные соединения. Когда концентрация этанола в среде составляла 2%, отмечалось максимальное включение  $^{35}\text{S}$ -метионина в высокомолекулярные фракции и интенсивность включения была близка к значению, полученному при пролонгации термошока у термотолерантного мутанта при  $44^\circ$ .

Представляют интерес результаты изучения в экстремальных условиях изменения системы протеолиза у изучаемых дрожжевых штаммов. Обнаружены существенные различия в протеолитической активности обоих дрожжевых штаммов при пролонгации термошока соответственно при  $37^\circ$  и  $44^\circ$  для мезофильного штамма дрожжей и его термотоле-

рантного мутанта, а также при добавлении в культивируемую среду этанола. Измерение протеолитической активности проводили в течение 3ч с момента воздействия на дрожжевые культуры экстремальных условий окружающей среды.

Как видно из приведенных рисунков, получены диаметрально противоположные результаты. Для термотолерантного мутанта обнаружено резкое повышение протеолитической активности по сравнению с кон-

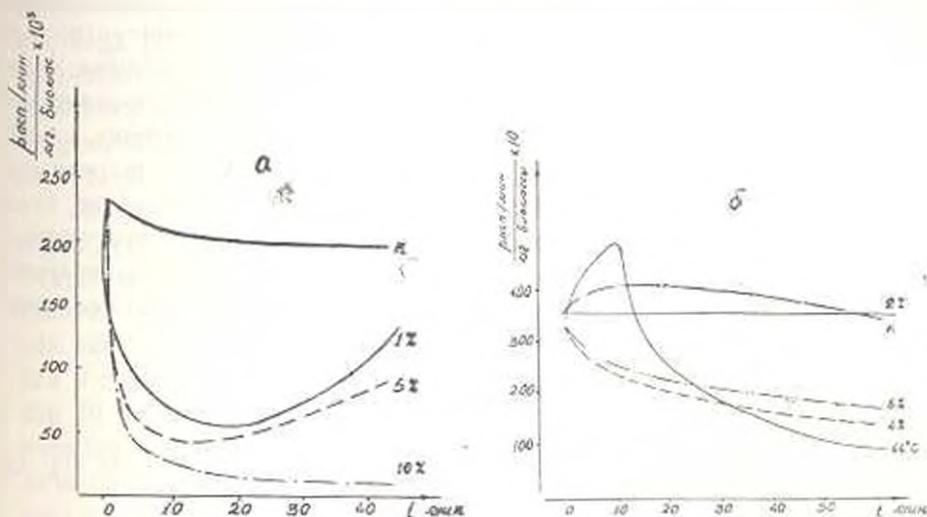


Рис. 1. Влияние концентрации этанола в среде на скорость включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в высокомолекулярные ТХУ-нерастворимые фракции белков: а) у мезофильного штамма дрожжей; б) у термотолерантного мутанта.

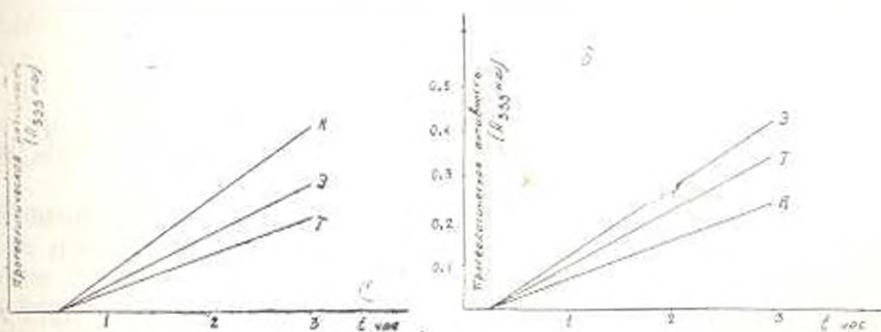


Рис. 2. Влияние температуры инкубации и присутствия этанола в среде на изменение протеолитической активности: а) у мезофильного штамма дрожжей; б) у термотолерантного мутанта.

тролем (оптимальная температура для роста и среда без добавления этанола) как под воздействием супраоптимальных температур, так и при наличии этанола в среде. Для дикого исходного штамма выявлена инактивация протеаз в указанных условиях. Причем у мезофильного штамма *S. maltosa* происходит существенное снижение протеолитической активности при термошоке по сравнению с контролем, тогда как при наличии этанола в среде оно не так выражено.

На наш взгляд, подобные расхождения, обнаруженные при сравни-

тельном изучении указанных дрожжевых штаммов при воздействии стрессорирующих агентов, могут определяться несколькими причинами.

Понижение скорости включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в высокомолекулярные фракции при добавлении в среду этанола и почти полная остановка роста при высоких концентрациях его у мезофильного штамма этих дрожжей обусловлена повышенной чувствительностью плазматической мембраны к неблагоприятным факторам среды, выражающейся в повышенной проницаемости мембраны. У термотолерантного мутанта, очевидно, плазматическая мембрана наделена повышенной резистентностью.

Активация системы протеолиза у термотолерантного штамма дрожжей, по всей вероятности, связана с индукцией убиквитин-зависимой системы, обеспечивающей избирательный протеолиз в условиях воздействия супраоптимальных температур, а также при наличии в среде этанола. Таким образом, можно сделать заключение, что исходная культура термотолерантного мутанта, наделенная повышенной чувствительностью как к воздействию термошока, так и к этанолу, характеризуется низкой протеолитической активностью, что связано с дефектами ферментативной, убиквитин-активирующей систем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McAlister L. and Flatteisen D. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 819—824, 1980.
2. Susan Lindquist. Ann. Rev. Biochem., 55, 1151—1191, 1986.
3. Jones R. P., Pamment, N. and Greenfield P. F. Proc. Biochem., 16, 42—49, 1981.
4. Gutknecht J. and Totoson P. C. J. Gen. Physiol., 53, 359—374, 1970.
5. Leao C. and A. van Vden. Biochem. Biophys. Acta, 774, 43—48, 1984.
6. Salvosen G., Lloyd C., Farley D. Nucl. Acids Res., 1, 15, 5485, 1987.

Получено 15.XI.1989 г.

Биол. журн. Армении, № 2, (43) 1990

УДК 568.575.24:616.348—098

### БИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ ПОРАЖЕНИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Л. В. НАЗАРОВ, Э. Г. МУГНЦЯН, Б. Г. САРКИСЯН, А. М. АГАВЕЛЯН,  
А. А. ПЕРСЕСЯН, А. С. АГАБАЛЯН

НИИ проктологии МЗ АрмССР, Ереванский государственный университет,  
НИИГА Минздрава СССР, Ереван

Показано, что в кишечной микрофлоре больных раком толстой кишки доминируют энтерикки, у которых выявлены количественные и качественные изменения в ряде генетически детерминированных — маркированных признаков.

Ցույց է տրվել, որ հստակ աղու շարժողակ և տեսքով շրվանդների աղիբային միկրոֆլորայում էնտերիկաները շարունակում են մեծ քանակությամբ և որակական փոփոխություններ, որոնց մաս մի շարք գենետիկորեն դետերմինացված հատկություններ կրում են արակական և բանական փոփոխություններ: