

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI

# TOIMETISED

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ

ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

583

GENEETILISE INFORMATSIOONI  
AVALDUMINE JA RAKKUDE  
DIFERENTSEERUMINE

ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ИНФОРМАЦИИ  
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК

Tsütoloogia- ja geneetika-alased tööd

Труды по цитологии и генетике

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ  
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS  
ALUSTATUD 1893.a. ВІСНІК 583 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893.г.

GENEETILISE INFORMATSIOONI  
AVALDUMINE JA RAKKUDE  
DIFERENTSEERUMINE

ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ИНФОРМАЦИИ  
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК

Tsütoloogia- ja geneetika-alased tööd  
Труды по цитологии и генетике

TARTU 1983

Редколлегия:

председатель Каллак Х.И.  
члены Хейнару А.Л.  
Вийкмаа М.Х.

Учебные записки  
Тартуского государственного университета.  
Выпуск 583.  
ПРОВЛЕДИД ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ И  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК.  
Труды по цитологии и генетике.  
На русском языке.  
Резюме на английском языке.  
Тартуский государственный университет,  
ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Пилосола, 18.  
Ответственный редактор М.Вийкмаа.  
Корректоры В.Логикова, И.Пяуска, Х.Эйла.  
Сдано в печать 07.01.1983.  
MS 01206.  
Бумага печатная № 1.  
Формат 60x90/16.  
Машинопись. Ротапринт.  
Учетно-издательских листов 8,64.  
Печатных листов 8,5 + 1,5 п. л. вклеек.  
Тираж 400.  
Цена № 20.  
Цена I руб. 30 коп.  
Типография ТГУ, 202400, ЭССР, г.Тарту, ул.Пилосола, 14.  
2 - 8

## Содержание

А л а м я з Т., С и м и с к е р Я. Регуляция образования ферментов катаболизма метанола у метанолусваивающих дрожжей <i>Pichia pinus</i> .....	5
А л а ш ä е, Т., S i m i s k e r, J. Formation of methanoloxidizing enzymes in methanol-utilizing yeast <i>Pichia pinus</i> .....	14
В е й д е б а у м Т., К я р н е р Ю. Селективность аутофагоцитоза под влиянием разных антиметаболитов .....	15
V e i d e b a u m, T., K ä r n e r, J. Selectivity of autophagocytosis under the influence of different antimetabolites .....	24
К а л л а к Х. О кариотипической дифференцировке каллусных клеток в длительной культуре .....	25
K a l l a k, H. On karyotypic differentiation of callus cells in long-term culture .....	36
К а л л а к Х., В а п п е р М. Сравнение цитогенетической активности 2,4-Д <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> на примере тканей <i>Crepis capillaris</i> .....	37
K a l l a k, H., V a p p e r, M. On comparison of cytogenetic activity of 2.4-D and NMU <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> on model of the tissues of <i>Crepis capillaris</i> .....	48
К и л ь к А., К а с а к Л., Х е и н а р у А. Изучение индукции синтеза катехол-2,3-оксигеназы на уровне интактных клеток .....	50
K i l k, A., K a s a k, L., H e i n a r u, A. Induction of catechol-2.3-oxxygenase synthesis using cell suspensions .....	62
К у х л б е р г Л., В я э р а н д Р. Влияние экзогенного циклического аденозинмонофосфата на образование ферментов цикла трикарбоновых кислот у денитрификатора <i>Bacterium agile</i> var. <i>hartlebii</i> .....	63

K u h l b e r g, L., V ä ä r a n d, R. The influence of the cyclic adenosine monophosphate on the formation of the tricarboxylic acid cycle enzymes in a denitrifying bacteria <i>Bacterium agile</i> var. <i>hartlebii</i> .....	69
К я р н е р К. Изменение аутофагоцитоза при переводе клеток в тканевую культуру .....	70
K ä r n e r, J. Observation on autophagocytosis produced by tissue culturing technique .....	78
П и и р с о о А. Изучение стромальных клеток кроветворной ткани в тканевой культуре .....	79
P i i r s o o, A. Morphological identification and characterization of the stromal cells of haemopoietic tissue in culture conditions .....	87
П и и р с о о А. Кроветворение в культуре эмбриональной селезенки .....	88
P i i r s o o, A. Haemopoiesis in cultures of the embryonic spleen .....	95
С и м и с к е р Я., Т а л п с е п Э., К њ њ - в е э р Р. Колебание активностей пероксисомных ферментов в клеточном цикле метанолусваивающих дрожжей .....	96
S i m i s k e r, J., T a l p s e r, E., K њ i - v e e r, R. Changes in peroxisomal enzyme activities during the cell cycle of methanol utilizing yeasts .....	106
Х а б и х т Я., В и л л е м с Р., Х е и н а - р у А. Об определении сайтов связывания РНК-полимеразы <i>E.coli</i> на ДНК TOL-плазмид .....	107
H a b i c h t, J., V i l l e m s, R., H e i n - a r u, A. On the <i>E. coli</i> RNA-polymerase binding sites on TOL plasmid DNA .....	114
Х е и н а р у Э., К а н г у р Р. Изоформы алкоголь дегидрогеназы у метанолусваивающих дрожжей <i>Candida boidinii</i> и <i>Pichia pinus</i> .....	115
H e i n a r u, E., K a n g u r, R. Isoforms of alcohol dehydrogenase in methanol-assimilating yeasts <i>Candida boidinii</i> and <i>Pichia pinus</i> .....	119

РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА  
МЕТАНОЛА У МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ  
*PICHA PINUS*

Т.О. Аламяз, Я.А. Симискер

Изучение метаболизма одноуглеродных соединений у микроорганизмов привлекало в течение последних десяти лет внимание многих исследователей. Одной из причин такого интереса является то обстоятельство, что метилотрофные микроорганизмы, особенно дрожжи, являются перспективными агентами для промышленного производства белка из метанола.

Обязательной предпосылкой для разработки оптимальных режимов культивирования микроорганизмов и селекций продуктивных штаммов является выяснение общих закономерностей формирования ферментативного аппарата использования энергетического субстрата.

Метаболитические пути использования метанола как источника энергии и углерода у дрожжей охарактеризованы весьма хорошо (Fujii, Tomomura, 1972; Tani et al., 1972; Sahn, 1977), но о биохимической и генетической регуляции образования ферментов метаболизма метанола имеются только единичные сведения. Установлено, что переход дрожжей на использование метанола сопровождается синтезом специфического набора ферментов, которые отсутствуют в клетках, растущих на средах с глюкозой и этанолом, или содержание их в этих условиях низкое. Такими специфическими ферментами являются ферменты, участвующие в окислении метанола - каталаза, алкогольоксидаза, формальдегиддегидрогеназа и формиатдегидрогеназа, а также ферменты, отвечающие за фиксацию формальдегида (Fujii, Tomomura, 1972; Tani et al., 1972; Sahn et al., 1976; Yasuhara et al., 1976).

Образование алкогольоксидазы, каталазы, формальдегиддегидрогеназы и формиатдегидрогеназы происходит как в присутствии метанола, так и в присутствии продуктов его катаболизма - формальдегида и формиата (Sahn, 1977). Вызван ли такой характер синтеза этих ферментов общим регуляторным геном или нет, не известно. Наоборот, образование фермента (или ферментов), отвечающих за усвоение формальдегида, наблюдается только в присутствии метанола (van Dijken et al., 1978), что указывает на некоторые различия регуляции образования ферментов

катаболизма метанола при переходе дрожжей от использования глюкозы на использование метанола определяется, по-видимому, в основном дерепрессией их синтеза. У *Hansenula polymorpha* показано, что алкогольоксидаза, формальдегиддегидрогеназа и формиатдегидрогеназа образуются в стационарной фазе роста после расходования глюкозы без добавления в среду метанола (Eggeling, Sahm, 1978). Частичная активация этих ферментов происходит и на средах с сорбитолом, глицеролом, ксилозой и рибозой (Eggeling, Sahm, 1978), но синтез киназы дигидроксиацетона, фермента, связанного с усвоением формальдегида, происходит только на среде с метанолом и не активируется на среде с глицеролом (van Dijken et al., 1978). Следовательно, в регуляции синтеза ферментов метаболизма метанола могут участвовать механизмы как дерепрессии, так и индукции.

Вышеприведенные данные показывают, что синтез всех ферментов катаболизма метанола активируется одними и теми же факторами. Но имеется ли для контроля образования этих ферментов общий регуляторный ген или регуляция их образования осуществляется автономными механизмами, реагирующими одинаково на общий фактор, не ясно.

Для решения этого вопроса мы исследовали образования ферментов катаболизма метанола у девяти мутантов *Pichia pinus*, потерявших способность расти на метаноле из-за дефектности одного или нескольких генов, отвечающих за синтез ферментов метаболизма метанола (мет-). Для сравнения мы изучали способность к образованию ферментов катаболизма метанола у четырех видов дрожжей, таксономически близких к метилотрофным, но не растущих на метаноле.

#### Материал и методика

Объектами исследования в настоящей работе явились дикий штамм *Pichia pinus* и девять его мутантов, полученных под действием ультрафиолетовых лучей. Мутанты были выделены и генетически охарактеризованы в ВНИИ Гидролиза растительного материала (Соом и др., 1977). Кроме вышеназванных штаммов, дополнительно изучали дрожжи *Hansenula anomala*, *Candida utilis*, *Pichia alcoholophila* 292, *Pichia alcoholophila* 298, которые таксономически близкие к метанолусваивающим дрожжам, но не растут на метаноле.

Дрожжи выращивали на среде следующего состава: вода дис-

тиллированная - 1 л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 5 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1 г,  $\text{MgSO}_4$  - 0,5 г,  $\text{NaCl}$  - 0,1 г, глюкоза - 5 г с добавлением витаминов и микроэлементов при постоянной аэрации путем продувания культур воздухом. Для аденинзависимых мутантов (тип 6С) добавляли аденин. В среде адаптации мутантов глюкоза была заменена метанолом (1%). В среду адаптации в некоторых опытах добавляли 2 мл дрожжевого аутолизата на один литр среды. В среде адаптации *Hansenula anomala*, *Candida utilis*, *Pichia alcoholophila* 292 и 298 концентрации метанола и формальдегида были 100 мМ и 3 мМ соответственно. Адаптация проводилась в течение 20 часов.

Клетки, выделенные из культуральной жидкости центрифугированием при  $+2^\circ\text{C}$ , промывали дважды в фосфатном буфере (рН 7,2, 100 мМ). Промытые клетки разрушали прессом типа Hughes при  $-35^\circ\text{C}$ . Неразрушенные клетки и клеточные осколки удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 12000g  $+2^\circ\text{C}$ . Для удаления возможных эндогенных субстратов ферментов бесклеточные экстракты пропускали через колонку сефадексом Г-15. Содержание белка в экстрактах определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

В бесклеточных экстрактах определяли активности алкогольоксидазы (Fujii, Tomomura, 1975), каталазы (Bergmeyer, 1970), формальдегиддегидрогеназы (Fujii, Tomomura, 1972) и формиатдегидрогеназы (Kato et al., 1974). Удельную активность ферментов выражали в микромолях прореагированного субстрата в минуту на миллиграмм белка.

### Результаты и обсуждение

Полученные данные (табл. I и 2) показывают, что у Мет<sup>-</sup> мутантов, по сравнению с дикими штаммами, одновременно подавлен синтез нескольких ферментов катаболизма метанола. Но, как правило, у мутантов не обнаруживается полного прекращения образования этих ферментов.

Исключением в этом отношении является полное отсутствие активности формиатдегидрогеназы у мутантов 6С-20 и МН<sub>4</sub>-III (табл. I). По генетическим данным (Пуговкина, 1978), три изучаемых мутанта (6С-20, 6С-43, 6С-5I) потеряли способность расти на метаноле из-за дефектности только одного из генов, определяющего способность расти на метаноле. Причины одновременного подавления образования ферментов катаболизма ме-

таноло у различных мутантов могут быть следующие.

Во-первых, для регуляции синтеза всех ферментов катаболизма метанола имеется один или несколько общих регуляторных генов.

Во-вторых, синтез ферментов у мутантов подавлен из-за недостатка энергетического и строительного субстрата, а также из-за возможного накопления токсических продуктов окисления метанола.

Добавление в инкубационную среду дрожжевого аутолизата несколько ускоряло образование ферментов у мутантов, что говорит в пользу второго предположения, но исключать полностью возможность общих регуляторных генов наши данные не позволяют. Частичное подавление синтеза нескольких ферментов у мет<sup>-</sup> мутантов затрудняет точное установление дефектного гена, определяющего биохимическую основу неспособности использовать метанол в качестве единственного источника энергии и углерода.

Наиболее определенные результаты получены в отношении мутантов 6С-20 и МН<sub>4</sub>-III (табл. I), являющихся по данным генетического анализа (Пуговкина, 1978) аллельными. У обоих этих мутантов мы не обнаружили активности формиатдегидрогеназы, что указывает на дефектность гена, отвечающего за синтез этого фермента.

У мутантов 6С-50 и МН<sub>4</sub>-IIО (табл. I) не обнаружено дополнительного синтеза каталазы при адаптации клеток на среде с метанолом. Характер мутации, связанных с отсутствием синтеза дополнительного количества каталазы, неизвестен. Возможно, что за образование дополнительного количества каталазы при переходе клеток на использование метанола отвечают специфичный ген или система генов, не связанных с контролем синтеза каталазы при росте клеток на глюкозе. По данным литературы (Pacheca et al., 1974; Rytka et al., 1976) синтез каталазы контролируется несколькими генами.

Интересно, что у мутантов с подавленным синтезом каталазы наблюдается почти нормальное образование алкогольоксидазы (мутанты 6С-50 и МН<sub>4</sub>-IIО), что указывает на автономность регуляторных механизмов их синтеза. На автономность регуляторных механизмов синтеза этих двух ферментов указывают и некоторые литературные данные. Роггенкамп с сотр. (Roggenkamp et al., 1974) наблюдал синтез каталазы у алкогольоксидаз-дефект-

Т а б л и ц а I

Удельные активности алкогольоксидазы, формальдегиддегидрогеназы, форматдегидрогеназы ( $\text{нм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ) и каталазы ( $\text{мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). Мет - метанол, глюк - глюкоза, ДА - дрожжевой аутолизат, - активность отсутствовала, н.о. - не определяли

Объект	Алкогольоксидаза			Формальдегид- дегидрогеназа		Форматде- гидрогеназа			Каталаза	
	мет	мет+ДА	глюк	мет	глюк	мет	мет+ДА	глюк	мет	глюк
	3213	н.о.	4,8	217	87	114	н.о.	6	1290	128
МН <sub>4</sub> -IIО	840	н.о.	8,6	103	78	19	н.о.	-	43,1	48,7
МН <sub>4</sub> -III	257	н.о.	15,9	133	100	-	н.о.	-	415	23,2
МН <sub>4</sub> -IO9	64	н.о.	-	122	25	72	н.о.	-	74,0	36,5
6С	304	н.о.	н.о.	76	5	60	н.о.	-	130	107
6С-20	0,737	28,9	6,2	18	21	-	-	-	176	102
6С-23	н.о.	462	-	99	26	28	38	-	153	40,1
6С-43	35,3	н.о.	43,1	192	56	44	н.о.	-	91,7	40,5
6С-50	190	н.о.	5,0	154	62	29	н.о.	-	77,7	148
6С-5I	8,6	244	-	16	4	-	44	-	258	49,6
6С-52	2,16	н.о.	-	68	7	15	н.о.	-	47,0	15,3

Т а б л и ц а 2

Удельные активности алкогольоксидазы, формальдегиддегидрогеназы, формиатдегидрогеназы ( $\text{нм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ) и каталазы ( $\text{мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). Мет - метанол, глук - глюкоза, НСНО - формальдегид, - активность отсутствовала

Объект	Алкогольоксидаза			Формальдегиддегидрогеназа			Формиатдегидрогеназа			Каталаза		
	мет	НСНО	глук	мет	НСНО	глук	мет	НСНО	глук	мет	НСНО	глук
	-	-	-	-	-	-	II	I6	-	129	78,6	53,2
	-	-	-	-	-	-	следы	8,5	следы	78,9	47,6	16,9
	-	6,2	12,8	-	-	-	-	1,8	-	27,2	38,8	28,3
	-	-	-	-	-	-	7I	-	-	44,9	26,5	31,2

ных мутантов. Ван Дикен с сотр. (van Dijken et al., 1976) показал, что при низких скоростях роста дрожжей на метаноле синтез алкогольоксидазы происходит намного быстрее, чем каталазы.

В пользу автономной регуляции ферментов катаболизма метанола говорят и результаты, полученные нами при исследовании образования этих ферментов у дрожжей, не усваивающих метанол (табл. 2). У *Hansenula anomala* и *Candida utilis* при адаптации клеток на средах с метанолом и формальдегидом наблюдается образование каталазы и формиатдегидрогеназы при полном отсутствии синтеза других ферментов катаболизма метанола.

Наличие мутантов дефектных только по формиатдегидрогеназе и не растущих на метаноле (мутанты 6С-20 и МН<sub>4</sub>-III) указывает на то, что для роста дрожжей на метаноле необходим прямой путь окисления метанола до СО<sub>2</sub>, поскольку дрожжи не могут использовать другие механизмы (цитратный цикл) для получения энергии.

### Заключение

Исследовано образование ферментов катаболизма метанола у девяти мутантов *Pichia pinus*, потерявших способности расти на метаноле, и у четырех видов дрожжей, неусваивающих метанол.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы.

Во-первых, образование пероксисомных ферментов — алкогольоксидазы и каталазы — контролируется автономными генетическими механизмами.

Во-вторых, для нормального роста дрожжей на среде с метанолом необходим прямой путь окисления метанола до СО<sub>2</sub>, и последняя не может быть заменена альтернативными путями использования метанола.

### Л и т е р а т у р а

Пуговкина Н.И. Генетический анализ мутантов неусваивающих метанол у дрожжей *Pichia pinus*. Диплом кафедры генетики ЛГУ, 1978.

Соом Я.А., Попова И.А., Кухлберг Л.А., Симискер Я.А. Ге-

- нетический контроль усвоения метанола у дрожжей *Pichia pinus*. - В сб.: Рост микроорганизмов на  $C_1$ -соединениях. Пушино, 1977, 161-162.
- Bergmeyer, H.U. Methoden der Enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Band I, s. 636-647. Academic-Verlag. Berlin. 1970.
- Dijken, J.P., van, Otto, R., Harder, W. Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Arch. Microbiol., 1976, 111, 137-144.
- Dijken, J.P., van, Harder, W., Beardsmore, A.I., Quayle, J.R. Dihydroxyacetone: an intermediate in the assimilation of methanol by yeasts. FEMS Microbiol. Lett., 1978, 4, 97-102.
- Eggeling, L., Sahn, H. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1978, 5, 197-202.
- Fujii, T., Tonomura, K. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by *Candida* species. Agr. Biol. Chem., 1972, 36, 2297-2306.
- Fujii, T., Tonomura, K. Oxidation of methanol and formaldehyde by a system containing alcohol oxidase and catalase purified from *Candida* sp. N-16. Agr. Biol. Chem., 1975, 39, 2325-2330.
- Kato, N., Kano, M., Tani, Y., Ogata, K. Purification and characterization of formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 1974, 38, 111-116.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, K. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.
- Pachecka, J., Litwinska, J., Bilinsky, T. Hemoproteid formation in yeast. I. Isolation of catalase and cytochrome deficient mutants. Molec. Gen. Genet., 1974, 134, 299-306.
- Roggenkamp, R., Sahn, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. Induction and function of catalase in *Candida boidinii*. FEBS Lett., 1974, 41, 283-286.
- Rytka, J., Sledziewsky, A., Litwinska, J., Bilinsky, T. II. Isolation of catalase regulatory mutants. Molec.

- Gen. Genet., 1976, 145, 37-42.
- Sahm, H., Eggeling, L., Roggenkamp, R. Regulation of enzymes of methanol metabolism in *Candida boidinii*: In: 5th Int. Ferment. Symp. 4th Int. Spec. Symp. Yeasts. Abstr. Pap. Berlin, 1976, 389 p.
- Sahm, H. Metabolism of methanol by yeasts. In: Advances in Biochemical Engineering 6., Springer-Verlag, 1977.
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 1972, 36, 68-75.
- Yasuhara, S., Kawamoto, S., Tanaka, A., Osumi, M., Fukui, S. Induction of catalase activity in a methanol-utilizing yeast *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 1976, 40, 1771-1780.

FORMATION OF METHANOL-OXIDIZING ENZYMES  
IN METHANOL-UTILIZING YEAST PICHIA PINUS

T.O. Alamäe, J.A. Simisker

S u m m a r y

Nine mutants of *Pichia pinus* lacking the ability of methanol utilization and four taxonomically close to them yeast strains were examined enzymologically. Yeasts were grown up on glucose and adapted for 20 hours on methanol or formaldehyde. Before and after adaptation activities of alcohol oxidase, catalase, formaldehyde and formate dehydrogenases were detected in cell-free extracts. On the basis of enzymological data and genetical analyses some aspects of genetic control of methanol oxidation are discussed.

Two mutants (6C-20, MH<sub>4</sub>-111) had no activities of formate dehydrogenase. Since these mutants could not grow on methanol, it seems likely that the direct way of methanol oxidation into CO<sub>2</sub> is necessary for growth on methanol. Inducible formation of catalase, according to our data, (mutants 6C-43 and 6C-50) seems not to be dependant on alcohol oxidase formation.

## СЕЛЕКТИВНОСТЬ АУТОФАГОЦИТОЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗНЫХ АНТИМЕТАБОЛИТОВ

Т.И. Вейдебаум, Ю.К. Кярнер

Аутофагоцитоз наблюдается как в нормальных, так и патологически измененных клетках (de Duve, Wattiaux, 1966). До сих пор остается неясным, какими факторами регулируется поглощение отдельных клеточных компонентов. По мнению одних авторов (Pfeifer, 1972 a, b; 1973), процесс сегрегации является специфичным и в зависимости от условий разное соотношение органелл подвергается разложению. Другие же предполагают (de Duve, Wattiaux, 1966; Arstila et al., 1972), что весь процесс основывается на статистической случайности и не зависит от структурного и функционального состояния органелл. Для проверки справедливости представленных предположений, мы ниже сравниваем особенности аутофагоцитоза под влиянием нейтрального красного, актиномицина Д и колхицина, которые нарушают разные цепи клеточного метаболизма.

### Материал и методика

Были изучены фибробластоподобные клетки первичных тканевых культур эмбриональной "кожно-мышечной ткани" курицы (методика культивации см. Кярнер, 1963). Колхицин (5 мкг/мл), актиномицин Д (0,5 мкг/мл) или нейтральный красный (5 мкг/мл) добавляется в питательную среду в латентной фазе развития культуры. Клетки наблюдались в течение 3 ч., через каждые 0,5 ч. и 0,5 ч. после удаления антимиетаболита.

Для электронномикроскопического изучения культуры фиксировались или по методике Гирша и Федорко (Hirsch, Fedorko, 1968), или последовательно в глутаральдегиде и четырехокиси осмия забуференными какодилатом. Культуры заливались или в эпон или в смесь эпона и аральдита (Mollenhauer, 1964). Ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме ЛКВ-8800. Срезы окрашивались ацетатом уранила и цитратом свинца (Reynolds, 1963) и просматривались в микроскопе УЭМВ-100В.

Электроннограммы изучались морфометрически по Вейбелю (Weibel) 1969). Для количественной оценки применяли тестовую сетку из 36 линий. Вычисляли относительный объем лизосом и подсчитали их количество в  $1 \text{ мкм}^3$  цитоплазмы.

## Результаты исследований

Ультраструктурные особенности изученных тканевых культур освещены в рамках ряда предыдущих работ (Кярнер, 1971; 1976; Вейдебаум, Кярнер, 1973). Из этих работ вытекает, что клетки в латентной фазе развития обладают большим количеством лизосомальных структур, часть которых, несомненно, принадлежит к аутофагическому ряду. Аутофагосомы (мы используем терминологию de Duve, Wattiaux, 1966) окружены двумя мембранами и содержат цистерны шероховатой эндоплазматической сети и немногочисленные мелкие пузырьки. Сегрегация митохондрий является редкостью. Имеются все переходные формы от аутофагосом с более менее интактными компонентами цитоплазмы до аутолизосом. Последние представлены в виде светлых вакуолей с одной окружающей мембраной, которые содержат разложенные остатки цитоплазмы. Морфологические переходы показывают, что телолизосомы с плотным матриксом берут свое начало с аутолизосом.

Под влиянием нейтрального красного цистерны шероховатой эндоплазматической сети распадаются местами на мелкие пузырьки, лишенные рибосом. Более крупные вакуоли с умеренной плотностью имеют, по-видимому, с пузырьками общее происхождение. Свободные рибосомы распределяются неравномерно и образуют локально скопления. Вокруг мелких пузырьков видны облака аморфного вещества (рис. 1). Именно очаги с мелкими пузырьками, соединенные с ними облака электронноплотного вещества и рибосомы в виде моносом оказываются в данном опыте главным объектом сегрегации. Аутофагосомы с более интактными компонентами цитоплазмы встречаются редко.

Количество лизосом увеличивается почти в 2 раза уже после 15-минутного окрашивания и в дальнейшем мало изменяется. Но относительный объем лизосом в начале опыта падает на 33%, что указывает на мелкие их размеры. После трехчасового опыта относительный объем лизосом превышает уже 40% контрольный уровень. Существенные сдвиги наблюдаются и в долях отдельных форм аутофагического ряда в общем количестве лизосом. Так, доля аутофагосом постепенно падает (44% в контроле и 10% к концу 3-го ч. опыта), а доля аутолизосом повышается (16% в контроле и 41% после трехчасового опыта). Доля телолизосом изменяется мало, но следует отметить, что они укрупнены при более длительном окрашивании с витальным красителем.

Перевод клеток в "чистую" питательную среду вызывает увеличение доли аутофагосом (47%) и уменьшение доли телолизосом (20%). Аутофагосомы содержат опять целые цистерны шероховатой эндоплазматической сети.

Актиномицин Д, как и нейтральный красный, вызывает увеличение общего количества лизосом. Главным материалом сегрегации являются целые цистерны шероховатой эндоплазматической сети вместе с окружающей их основной цитоплазмой (рис. 2). Аутофагосомы сливаются с телолизосомами, в результате чего образуются тельца с весьма гетерогенным строением (рис. 3).

Удаление из питательной среды актиномицина Д после трехчасового опыта влечет за собой дополнительный интенсивный аутофагоцитоз. Сегрегирование цистерны шероховатой эндоплазматической сети располагаются в аутофагосомах концентрическими кругами (рис. 4). Такие аутофагосомы тесно связаны с телолизосомами.

Общее количество лизосом под воздействием колхицина падает в течение 3 ч. на 31%, а их относительный объем - на 21%. В данной серии опытов нам не удалось проследить за типичными аутофагосомами с двумя окружающими мембранами и более менее интактным содержимым. Характерными структурами подопытных клеток следует считать крупные очаги в цитоплазме. Часть из них содержит главным образом мелкие пузырьки с плотной сердцевинкой и частично окружена мембраной (рис. 5). Другие же представлены в виде скоплений липидных включений с рыхло расположенными миелоидными фигурами (рис. 5, 6). Цистерны шероховатой эндоплазматической сети и телолизосомы находятся с такими очагами в тесном контакте.

При замене в тканевой культуре среды с колхицином чистой средой наблюдаются многочисленные мелкие телолизосомы с миелоидными фигурами. Доля таких структур достигает теперь 83% от общего количества лизосом. Наряду с этими образованиями видны и единичные аутофагосомы с цистернами шероховатой эндоплазматической сети и мелкими светлыми пузырьками.

#### Обсуждение

Как известно, актиномицин Д специфично блокирует в клетках транскрипцию, а нейтральный красный, как и пуромин, подавляет трансляцию (Зеленин, 1971). Эти антиметаболиты являются стимуляторами аутофагоцитоза (Rodriguez, 1967; Ко-

vács, 1968; 1972). В этом отношении разные яды трансляции обладают разным эффектом. Аутофагоцитоз вызывают лишь те ингибиторы (например пурамицин, этионин), которые освобождают рибосомы от мембран эндоплазматической сети и разлагают полирибосомы (Rez, Kovács, 1973; Kovács, Rez, 1974). Другие же (например циклогексимид, зметин), хотя блокируют синтез белка, но не освобождают рибосомы от мембран и видимого аутофагоцитоза не обнаружено.

Дегградация шероховатой эндоплазматической сети осуществляется двумя путями (Kovács, 1972): цистерны или распадаются на мелкие гладкие пузырьки или подвергаются поглощению в интактном виде.

Отложение нейтрального красного связано с первым типом разложения эндоплазматической сети. Вокруг пузырьков появляются облака аморфного электронноплотного материала, что характеризует переваривание микросом в лизосомах (Glaumann et al., 1975). Возможно, что такое поражение цитоплазмы связано с собственными гидролазами, которые высвобождаются из лизосом из-за лабильности их мембран под влиянием нейтрального красного (Bastos, Moura Nunes, 1967). Итак, в данном случае сегрегируют предварительно уже переваренные материалы. Их поглощают путем экзотропии (термин Arstila et al., 1971) и образуются аутофагические вакуоли типа 2 (Novikoff, 1973; 1976). Это и является новообразованием очагов отложения основных прижизненных красителей, которое неоднократно описано и на уровне ультраструктур (Burne, 1964; Gregory, 1968).

В отличие от нейтрального красного аутофагосомы в опытах с актиномицином Д относятся к аутофагическим вакуолям типа I (Novikoff, 1973; 1976), которые содержат интактные цистерны шероховатой эндоплазматической сети.

По литературным данным, антитубулины тоже являются стимуляторами аутофагоцитоза (Singh et al., 1974; Hirsimäki et al., 1975; Kovács et al., 1975; Nevalainen, 1975). В наших опытах с колхицином это не совсем так (см. тоже Вейдебаум, Кярнер, 1978): количество лизосом падает и типичные аутофагосомы не удается идентифицировать. Следует учитывать и то, что наши данные не совсем совпадают с литературными. Большинство опытов проведено на целостном организме, а в работе по тканевой культуре (Hirsimäki et al., 1975) использованы винбластин и демекольцин. В целостном организме воз-

действие фактора может осуществляться через гуморальные звенья, а влияние отдельных антитубулинов не совсем совпадает (Dustin, 1978).

В опытах с колхицином бросаются в глаза липидные образования. Мелкие пузырьки с плотной сердцевиной связывают с транспортом липидов и их количество увеличивается при нарушении транспорта от эндоплазматической сети к комплексу Гольджи (Arstila, Trump, 1972). Это хорошо согласуется с наблюдением, что под воздействием колхицина нарушается целостность комплекса Гольджи (Вейдебаум, Кярнер, 1973; Lohmander et al., 1976). Относительно других очагов следует указать на предположение, что колхицин осаждает из мембран липидный компонент (Hirsimäki et al., 1975).

Причиной отсутствия поглощения поврежденных участков цитоплазмы может быть недостаток окружающей мембраны. Ее главным источником считают эндомембранную систему (Arstila, Trump, 1968; Ericsson, 1969 a,b), но по нашим морфометрическим данным (Вейдебаум, Кярнер, 1978) относительный объем эндомембранной системы в трехчасовом опыте с колхицином уменьшается на 21%. Хотя в цитоплазме некоторые цистерны эндоплазматической сети наблюдаются, но не все они способны к образованию аутофагосом (Arstila et al., 1972).

Другим важным источником окружающей мембраны новых лизосом считают предсуществующие телолизосомы (Deter et al., 1967; Goldfischer et al., 1970; Nunez, Becker, 1970; Saito, Ogawa, 1974). Их доля при резком увеличении количества аутофагосом при замене питательной среды падает. Это, конечно, может быть связано с более интенсивным выбрасыванием телолизосом из клетки (Kerr, 1970; 1973), но не исключено и их повторное включение в пищеварительные процессы.

Итак, нашими наблюдениями подтверждается предположение Пфайфера (Pfeifer, 1972 a,b; 1973) о качественной регуляции аутофагоцитоза. Именно поврежденные компоненты цитоплазмы подвергаются поглощению, но это лишь в том случае, если сохранены соответствующие механизмы. Аутофагоцитозу может предшествовать очаговая деградация цитоплазмы (Hurban et al., 1963). Прямое разложение органелл в цитоплазме является одним из доказательств того, что аутофагоцитоз является не единственным способом их круговорота в клетке (Arstila et al., 1971; Pfeifer, Guder, 1975).

## Заклччение

Добавление нейтрального красного (5 мкг/мл) или актиномицина Д (0,5 мкг/мл) в питательную среду вызывало увеличение общего количества лизосом, а добавление колхицина (5 мкг/мл) - уменьшение. В опытах с нейтральным красным шероховатая эндоплазматическая сеть распадается очагами на мелкие пузырьки и облака аморфного электронноплотного вещества, а при колхицине вместо цистерн скопляются липидные включения с миелоидными фигурами. В первом случае очаги подвергаются сегрегации, а во втором аутофагоцитоз подавлен. В опытах с актиномицином Д поглощаются целые цистерны эндоплазматической сети. Итак, подтверждается гипотеза Шфейфера о качественной регуляции аутофагоцитоза. Очевидно и то, что аутофагоцитоз не является единственным механизмом круговорота органелл, а часть из них разлагается в цитоплазме без сегрегации.

## Л и т е р а т у р а

- Зеленин А.В. Взаимодействие аминокпроизводных акридина с клеткой. М., 1971.
- Кярнер Ю.К. О светомикроскопической организации цитоплазмы фибробластов, растущих в однослойных тканевых культурах. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1963, вып. 143. Труды по медицине УШ, с. 320-325.
- Кярнер Ю.К. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трипсинированной тканевой культуре. - Цитология, 1971, 13, 1204-1210.
- Кярнер Ю. Морфология лизосом в культивированных фибробластах эмбрионов курицы. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та 1976, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, с. 64-73.
- Вейдебаум Т., Кярнер Ю.К. Влияние колхицина на ультраструктуру фибробластов куриных эмбрионов в тканевой культуре. Изв. АН Эст. ССР, 1973, 22, В3, 269-273.
- Вейдебаум Т.И., Кярнер Ю.К. Изменение эндомембранной системы и митохондрий в культивируемых куриных фибробластах при действии колхицина и после его удаления. Морфометрический анализ. - Цитология, 1978, 20, 1216-1220.

- Arstila, A.U., Trump, B.F. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am. J. Path.*, 1968, 53, 687-733.
- Arstila, A.U., Trump, B.F. Ethionine induced alterations in the Golgi apparatus and in the endoplasmic reticulum. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 1972, 10, 344-353.
- Arstila, A.U., Jauregui, H.O., Chang, J., Trump, B.F. Studies on cellular autophagocytosis. Relationship between heterophagy and autophagy in HeLa cells. *Lab. Invest.*, 1971, 24, 162-174.
- Arstila, A.U., Shelburne, J.D., Trump, B.F. Studies on cellular autophagocytosis. A histochemical study on sequential alterations of mitochondria in the glucagon-induced autophagic vacuoles of rat liver. *Lab. Invest.*, 1972, 27, 317-323.
- Bastos, A.L., Moura Nunes, J.F.B. The effect of lysosome permeability changes on DNA synthesis and mitosis of cells growing in vitro. *Z. Krebsforsch.*, 1967, 69, 1-9.
- Byrne, J.M. An electron-microscopical study of neutral red granules of mouse exocrine pancreas. *Quart. J. Micr. Sci.*, 1964, 105, 219-225.
- Deter, R.L., Baudhuin, P., de Duve Ch. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.*, 1967, 35, C11-C16.
- Dustin, P. *Microtubules*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg - New York, 1978.
- de Duve, C., Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 1966, 28, 435-492.
- Ericsson, J.L.E. Mechanism of cellular autophagy. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, ed. by Dingle, J.T., Fell, H.B., Amsterdam - London, 1969a, II, 345-394.
- Ericsson, J.L.E. Studies on cellular autophagy. Z. Characterization of the membranes bordering autophagosomes in parenchymal liver cells. *Exp. Cell Res.*, 1969b, 56, 393-405.
- Glaumann, H., Berezsky, I.K., Ericsson, J.L.E., Trump, B.F. Lysosomal degradation of cell organelles. II. Ultrastructural analysis of uptake and digestion of

- intravenously injected microsomes and ribosomes by Kupffer cells. *Lab. Invest.*, 1975, 33, 252-261.
- Goldfischer, S., Novikoff, A.B., Albala, A., Biempica, L. Hemoglobin uptake by rat hepatocytes and its breakdown within lysosomes. *J. Cell Biol.*, 1970, 44, 513-530.
- Gregory, J.M. Cellular response to vital staining. In: *Cell Structure and its Interpretation*, ed. by McGee-Russell, S.M., Ross, K.F.A., London, 1968, 87-93.
- Hirsch, J.G., Fedorko, M.E. Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. *J. Cell Biol.*, 1968, 38, 615-627.
- Hirsimäki, A., Arstila, A.U., Trump, B.F. Autophagocytosis: in vitro induction by microtubule poisons. *Exp. Cell Res.*, 1975, 92, 11-15.
- Hruban, Z., Spargo, B., Swift, H., Wissler, R.W., Kleinfeld, R.G. Focal cytoplasmic degradation. *Am. J. Pathol.*, 1963, 42, 657-683.
- Kerr, J.F.R. Liver cell defaecation: an electron microscopic study of the discharge of lysosomal residual bodies into the intercellular space. *Am. J. Pathol.*, 1970, 100, 99-103.
- Kerr, J.F.R. Some lysosome functions in liver cells reacting to sublethal injury. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, ed. J.T. Dingle, Amsterdam, North-Holland Publ., 1973, 3, 365-394.
- Kovács, J. Focal cytoplasmic degradation and lysosome formation in the epithelial cells of the seminal vesicle of the mouse. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, 1968, 19, 23-33.
- Kovács, J. Induced cellular autophagy in the epithelial cells of seminal vesicle of mice treated with actinomycin D. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, 1972, 23, 181-193.
- Kovács, J., Rez, G. Prevention of induced autophagy by emetine in exocrine cells of mouse pancreas and seminal vesicle. *Virchows Arch., Abt. B., Zellpathol.*, 1974, 15, 209-216.
- Kovács, J., Rez, G., Kiss, A. Vinblastine induced autophagocytosis and its prevention by cycloheximide and

- emetine in mouse pancreatic acinar cells in vivo. *Cytobiologie*, 1975, 11, 309-313.
- Lohmander, S., Moskalewsky, S., Madsen, K., Thyberg, J., Frieberg, U. Influence of colchicine on the synthesis and secretion of proteoglycans and collagen by fetal guinea pig chondrocytes. *Exp. Cell Res.*, 1976, 99, 333-345.
- Mollenhauer, H.H. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technol.*, 1964, 39, 111-114.
- Nevalainen, T.J. Cytotoxicity of vinblastine and vincristine to pancreatic cells. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpathol.*, 1975, 18, 111-127.
- Novikoff, A.B. Lysosomes: A personal account. In: *Lysosomes and Storage Diseases*, ed. by Hers, H.G., van Hoof, F., AP, New York - London, 1973, 1-41.
- Novikoff, A.B. The endoplasmic reticulum: A cytochemist's view (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 2780-2787.
- Nunez, E., Becker, D.V. Secretory processes in follicular cells of the rat thyroid. 1. Ultrastructural changes during the pre-, early and mid-hibernation periods with some comments of the origin of autophagic vacuoles. *Am. J. Anat.*, 1970, 129, 369-398.
- Pfeifer, U. Inverted diurnal rhythm of cellular autophagy in liver cells of rats fed a single daily meal. *Virchows Arch. Abt. B.*, 1972a, 10, 1-3.
- Pfeifer, U. Morphologische und funktionelle Aspekte der cellulären Autophagie. *Acta Morph., Acad. Sci. Hung.*, 1972b, 20, 247-267.
- Pfeifer, U. Cellular autophagy and cell atrophy in the rat liver during long-term starvation. A quantitative morphological study. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 1973, 12, 195-211.
- Pfeifer, U., Guder, W.G. Stimulation of cellular autophagy by parathyroid hormone and cyclic adenosine 3', 5': monophosphate in isolated tubular fragments from the rat's kidney cortex. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 1975, 19, 51-67.
- Rez, G., Kovács, J. Prevention by cycloneximide of neutral red-induced formation of autophagic vacuoles

- and krinom granules in mouse pancreatic acinar cells. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath., 1973, 12, 123-132.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 1963, 17, 208-212.
- Rodriguez, T.G. Ultrastructural changes in the mouse exocrine pancreas induced by prolonged treatment with actinomycin D. J. Ultrastruct. Res., 1967, 19, 116-129.
- Saito, T., Ogawa, K. Lysosomal changes in rat hepatic parenchymal cells after glucagon administration. Acta histochem. cytochem., 1974, 7, 1-18.
- Singh, A., Le Marchand, Y., Jeakrenaud, B., Orci, L. Colchicine-induced autophagocytosis in liver. Experientia, 1974, 30, 709.
- Weibel, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int. Rev. Cytol., 1969, 26, 235-302.

SELECTIVITY OF AUTOPHAGOCYTOSIS UNDER THE  
INFLUENCE OF DIFFERENT ANTIMETABOLITES

T.J. Veidebaum, J. Kärner

S u m m a r y

After the administration of neutral red (5 µg/ml) or actinomycin D (0.5 µg/ml) into nutritive medium of primary tissue culture there is a remarkable increase of fibroblast'-lysosomes during the first 3 hours. Under the influence of neutral red cisternae of granular endoplasmic reticulum locally fall into small vesicles and clusters of electron-dense amorphous material, which can be seen in autolysosomes. Actinomycin D causes a segregation of intact cisternae of endoplasmic reticulum. Colchicine-treated (5 µg/ml) fibroblast' cytoplasm contains large amounts of lipids with myeloid figures. Autophagocytosis is now seemingly inhibited, and the number of lysosomes decreases. Some probable reasons and mechanisms of antimetabolites'-induced alterations are discussed.

## О КАРИОТИПИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК В ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Х.И. Каллак

Дифференцировка растительных клеток в онтогенезе проявляется не только в определенных структурно-функциональных изменениях цитоплазмы, но и в соответствующих изменениях хромосомных наборов. Об этом свидетельствуют явления полиплоидии и политении, обнаруженные во многих дифференцированных клетках растений (Tschermak-Woess, 1956; D'Amato, 1964; Geitler, 1965; Partanen, 1965; Reese, 1973; Sen, 1973; Nagl, 1976). Каротиотипическая изменчивость характерна и растительным клеткам *in vitro*, причем обычно повышенная, по сравнению с той же у исходных тканей *in vivo*. Хотя некоторые исследователи считают каротиотипическую изменчивость растительных культур тканей хаотическим явлением, в последнее время все больше внимания уделяют проявлению определенных тенденций в изменениях хромосомных наборов у длительно пассируемых культур. Описывают формирование каллусных штаммов с более или менее постоянным модалным каротиотипом. Каротиотипическую дифференцировку каллусных штаммов связывают с условиями выращивания, прежде всего с селективирующим действием питательной среды (Малюк и др., 1975; Кунах, Алпатова, 1979; Torrey, 1961; Venkateswaran, Spiess, 1963; Shamina, Frolova, 1974; Singh et al., 1975; Seman, Hlásniková, 1977). Предполагается также, что поведение ядер растительных клеток *in vitro* отражает их потенции *in vivo* (Кунах, 1971; Partanen, 1963; D'Amato, 1964; Shimada, Tabata, 1967; Torrey, 1967; Salmia, 1974). Следовательно, различные тенденции, обнаруженные в каротиотипической изменчивости культур тканей, объясняются соответствующими различиями у исходных тканей.

Однако некоторые литературные данные и проведенные нами исследования свидетельствуют о возможности каротиотипической дифференцировки длительных каллусных культур независимо от каротиотипических особенностей эксплантатов и селективирующего действия питательной среды (Зосимович и др., 1972; Каллак, Ярвекюльг, 1966; Кунах и др., 1970; Кунах и др., 1979; Butcher et al., 1975; Kallak, Järvekülг, 1977). для изучения спонтанной каротиотипической дифференцировки культур расти-

тельных тканей, имеющих общее происхождение и постоянно выращиваемых в одинаковых условиях, проведено мало исследований. К тому же большинство из них страдает недостаточностью экспериментального материала и/или кратковременностью культивирования.

Целью этой работы является представление данных о кариотипической дифференцировке некоторых каллусных штаммов, выращенных в условиях культуры в течение 7-10 лет.

### Материал и методика

Объектом исследований служили каллусные культуры гаплогампыса (*Harporarpus gracilis* (Nutt.) Gray), гороха, (*Pisum sativum* L.) и креписа (*Crepis capillaris* (L.) Wallr. Каллус гаплогампыса был изолирован от стеблевых сегментов проростков и культивирован в течение 9,5 лет на агаровой питательной среде по Мурасиге и Скугу (Murashige, Skoog, 1962) со следующими добавками (мг/л): аденин (1,0), 2,4-Д (1,0), гидролизат казеина (1000), витамин В<sub>1</sub> (0,4). Каллус гороха был изолирован от семян и культивирован до 8 лет на агаровой питательной среде по Торри со следующими добавками (мг/л): аденин (0,25), 2,4-Д (1,0), гидролизат казеина (500), витамины по Уайту. Каллус креписа изолировали от стеблевых тканей проростков и выращивали в течение 7 лет на агаровой среде по Мурасиге и Скугу с добавками (мг-л): аденин (1,0), 2,4-д (1,0), гидролизат казеина (500), М-инозит (100) и витамины по Уайту. Все культуры выращивались в темноте при температуре 26-27°.

Для цитогенетических исследований каллусную ткань фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1) и готовили давленные препараты в ацеторсеине.

данные обработаны статистически. 95%-ные доверительные границы найдены при помощи арксин-преобразования Фишера.

### Результаты исследований

Для характеристики кариотипической дифференцировки культур гаплогампыса исследовали три штамма, имеющих общее происхождение, но различающихся друг от друга по интенсивности роста, компактности ткани и особенностям пигментации:

1) штамм А - интенсивно растущая (с митотическим индексом до 10%) гомогенная плотная ткань бледного (почти белого)

цвета, сохраняющая названные свойства в течение 5,5-летнего культивирования на среде по Мурасиге и Скугу;

2) штамм В - относительно хорошо растущая (с митотическим индексом 2-5%) мягкая ткань светложелтого цвета, отделившаяся от штамма А после 4-летнего культивирования;

3) штамм С - медленно растущая хрупкая желтая ткань, отделившаяся от штамма А после 4-летнего культивирования.

В делящихся клетках штамма А и отдифференцированных от него штаммов В и С определили количество хромосом и установили частоту аберративных ана- и телофаз. Результаты количественного анализа получены от просмотра 300-500 метафаз и столько же ана- и телофаз для каждой точки фиксации.

На рисунке I представлены данные о хромосомных наборах делящихся клеток у исходного штамма А в 52-ом пассаже. К этому времени в каллусном штамме А практически отсутствовали диплоидные клетки ( $2n = 4$ ) и в миксоплоидной ткани преобладали клетки с хромосомными наборами 12-15 (30%) и 16-20 (43%). Штамм А отличался большим варьирующим количеством аберративных ана- и телофаз, свидетельствующих о нарушениях в репродукции и распределении хромосом. В 50-ом пассаже процент аберративных ана- и телофаз составлял около 50, в 52-ом пассаже около 30.

Цитогенетический анализ штаммов В и С выявил также миксоплоидный состав делящихся клеток (рис. I). Однако соотношение разноплоидных метафаз у этих каллусных штаммов в 44/45-ых пассажах оказалось разным. В штамме В не было четко выраженного модального числа хромосом, но в штамме С в это время явно преобладали клетки с хромосомными наборами 8-II (38%) и 12-15 (48%). Высокоплоидные метафазы с более чем 20 хромосомами составляли около 20 процентов в штамме В, но их количество не превышало 2-3 процентов в штамме С.

Исследование хромосомных наборов делящихся клеток у штаммов В и С в некоторых следующих пассажах выявило сдвиги в соотношении их разноплоидных клеток, в результате которого оба штамма как бы приблизились друг к другу. В обоих штаммах модальное число хромосом равнялось 12-15, причем соотношение метафаз с остальными уровнями плоидности оказалось также сходным. Соотношение разноплоидных клеток, характерное штаммам В и С в 53-56 пассажах, значительно отличалось от того же в штамме А.

По частоте аберративных ана- и телофаз штаммы гаплопап-

пуса А, В и С достоверно отличались друг от друга в начале исследовательского периода (т.е. в 47/50-ых пассажах), но становились сходными по мере дальнейшего культивирования (рис. 2).

Исследование каллусных культур гороха, изолированных от семян и длительно культивируемых в одинаковых условиях, показало, что в каллусе гороха также происходит дифференцировка, ведущая к формированию определенных штаммов. По внешней морфологии и пигментации каллусные культуры гороха разделяются на два основных типа:

1) хрупкий каллус буровато-желтого или бурого цветов с бугорчатым типом роста;

2) плотный подушечно-видный каллус с бархатистой поверхностью беловатого или бежевого цветов (рис. 3).

Микротомные срезы показали, что бугорчатый каллус имеет относительно гомогенную гистологическую структуру. Основную массу каллусной ткани составляют слабо связанные друг с другом паренхиматические клетки, среди которых встречаются отдельные элементы древесины и очаги клеток меристематического типа. Внутренняя часть подушечного каллуса сильно одревесневшая, местами элементы древесины проникают до самой поверхности каллуса. Паренхиматических клеток относительно мало и митотическая активность свойственна только тонкому слою меристематических клеток на поверхности каллуса, придающему последней бархатистый вид.

Результаты кариологического изучения некоторых каллусных штаммов обоих типов представлены на рисунках 4 и 5. Средние данные для каждого пассажа получены учетом 400-1000 метафаз или ана-телофаз. Самый детальный анализ проведен на каллусном штамме бугорчатого типа, растущем в культуре уже 14 лет и обозначаемом нами буквой А. В данной работе представлены данные, полученные от цитогенетического анализа некоторых субкультур (пассажей) этого штамма до 8-летнего культивирования. Из-за трудностей четкого определения числа хромосом в полиплоидных клетках анеуплоидные клетки отнесены к клеткам с ближайшей степенью эуплоидии (2х, 3х, 4х и > 4х). На гистограмме (рис. 4) можно увидеть, что в течение культивирования в делящихся клетках штамма А произошло изменение числа хромосом в определенном направлении. В преобладающем большинстве диплоидный ( $2n = 14$ ) каллус гороха со временем превратился в триплоидную ткань. Более детальный анализ метафазных наборов показал, что модальное число хромосом не

является точно триплоидным, а гипертриплоидным. В каллусе преобладают метафазы с хромосомным набором 23 (рис. 6).

Анализ ана- и телофаз в последующих пассажах штамма А выявил определенную тенденцию и в динамике аберретивных ана- и телофаз с мостами, фрагментами или отстающими хромосомами (рис. 5). В течение культивирования до 4 лет произошло увеличение количества нарушенных ана- и телофаз от 9 до 49 процентов. Затем количество аберретивных ана- и телофаз стало уменьшаться, хотя не линейно. После 7-летнего культивирования частота аберративных ана- и телофаз в штамме А оказалась такой же, как в первых пассажах культуры, т.е.  $\sim 10\%$ .

На рисунке 4 представлены также некоторые данные о степени плоидности каллусных культур подушечного типа ( $M^2$ ,  $E^{17}$ ,  $E^{21}$ ). Можно заметить, что исследованные штаммы, а также пассажи одного штамма отличаются друг от друга по соотношению разноплоидных клеток. Полученные данные пока недостаточны для более общих выводов и позволяют утверждать только то, что этим культурам характерен миксоплоидный состав делящихся клеток.

В то же время нельзя связывать миксоплоидию с одним подушечным типом роста у каллусных культур гороха. Об этом свидетельствуют результаты, полученные от цитогенетического исследования штамма бугорчатого типа В (рис. 4). Семилетняя культура этого штамма оказалась настоящей миксоплоидной тканью без модального числа хромосом. Следовательно, кариотипические особенности делящихся клеток не обязательно связываются с внешними особенностями (типом роста и пигментации), являвшимися основой при разделении каллусных культур гороха на штаммы бугорчатого и подушечного типов.

Каллусные культуры креписа в данной работе представлены двумя штаммами, происходящими от стеблевых тканей проростков и выращенными в одинаковых условиях, но изолированными от соответствующих эксплантатов в разное время.

Каллус штамма А изолирован от проростков около года тому назад. Это плотная ткань серовато-бурого цвета, которая на вид напоминает подушечные штаммы каллуса гороха. Внутренняя часть каллуса у этого штамма сильно одревесневшая и элементы древесины обнаруживаются также в самых верхних слоях каллуса, рядом с делящимися клетками меристематического типа.

Каллус штамма Г изолирован от проростков креписа 7 лет назад. В первых пассажах культивирования этот штамм был также

сходен с плотным подушечным каллусом гороха, но со временем превратился в рыхлую светлую ткань без элементов древесины, напоминая каллус гаплопаппуса.

Результаты цитогенетического исследования штамма Г до 4,5-летнего культивирования (т.е. до 35-го пассажа) нами уже опубликованы (Каллак, Валпер, 1979). Дальнейшее исследование хромосомных наборов штамма Г в течение 2,5 лет не выявило заметных изменений в модальном кариотипе, характерном для этого штамма несколько лет (рис. 7). Среди делящихся клеток штамма Г по-прежнему преобладают анеуплоидные клетки с 7 хромосомами, из которых одна является aberrативной (рис. 8). В штамме почти отсутствуют диплоидные клетки ( $2x = 6$ ), а количество полиплоидных клеток колеблется в пределах 10-15 процентов.

Значимых отклонений по сравнению с предыдущими данными не отмечено и в частоте aberrативных ана- и телофаз (рис. 9). Ана- и телофазы с мостиками, фрагментами и отставшими хромосомами составляют всего 5-9%.

**Получение** кариотипически постоянного каллусного штамма Г подняло вопрос о возможности повторного образования такого штамма от тех же эксплантатов и при выращивании в тех самых условиях. Именно этой цели служило цитогенетическое исследование штамма А, на вид напоминающего первые пассажи штамма Г.

Пока проанализированы данные, полученные в результате анализа 8-го пассажа этой каллусной культуры, выращенной *in vitro* в течение одного года. Подсчет хромосом в делящихся клетках показал, что 80-90 процентов из них полиплоидные с хромосомным набором 12 и более чем 12 (рис. 10). Диплоидные клетки практически отсутствуют, их доля не превышает 2-3 процентов.

В полиплоидных наборах нередко встречаются aberrативные хромосомы с измененной структурой. Количество aberrативных ана- и телофаз в восьмом пассаже штамма А достигает до 30-40 процентов.

Итак, изолирование и выращивание изолированной каллусной культуры креписа *in vitro* ведет вначале к заметным изменениям в числе и структуре хромосом. В обоих исследованных нами штаммах в первых пассажах преобладали полиплоидные клетки ( $4x$  и  $> 4x$ ). Однако если у штамма Г полиплоидные клетки были характерны только для самых первых пассажей и в восьмом пассаже их количество падало до 15-18 процентов, то у штам-

ма А восьмой пассаж еще полностью полиплоидный. Дальнейшее исследование хромосомных наборов штамма А покажет, насколько его кариотипическая дифференцировка сравнима с той же у штамма Г.

### Обсуждение

Наши многолетние исследования показывают, что в кариотипической изменчивости длительных каллусных культур могут проявляться определенные тенденции и сформироваться штаммы с модальным хромосомным набором, отличающимся от такого же в клетках эксплантата. В кариотипической дифференцировке каллусных штаммов выявляются разные направления. Одним культурам характерно увеличение степени ploидности делящихся клеток, в других культурах модальным остается (или становится) диплоидный (или близкий ему анеуплоидный) набор хромосом. В некоторых случаях модальный кариотип проявляется уже в самых первых пассажах каллусной культуры и сохраняется при дальнейших пересадках, в других случаях модальный хромосомный набор образуется постепенно, в течение длительного выращивания *in vitro*. Возможно и изменение модального кариотипа, оказавшегося постоянным в течение многолетнего культивирования (штамм А каллуса гороха). В сформированном каллусном штамме могут преобладать клетки с определенным числом хромосом (штамм Г каллуса креписа), но кариотипическая стабилизация может проявиться и в виде более или менее постоянного соотношения разноploидных клеток (штаммы гаплопаллуса). Из цитогенетического анализа некоторых каллусных штаммов гороха (А) и креписа (Г) следует, что преобладающими могут стать клетки с анеуплоидным числом хромосом. К тому же в составе модального кариотипа могут встречаться хромосомы со структурными aberrациями.

При обсуждении возможных причин и факторов кариотипической дифференцировки исследованных каллусных культур необходимо различать два явления: происхождение (источник) кариотипической изменчивости каллусных клеток и формирование каллусных штаммов с определенным модальным кариотипом.

Хромосомной изменчивости растительных клеток в культуре посвящено немало исследований, однако конкретные механизмы и факторы действия этого явления далеко не ясны. В принципе у кариотипической изменчивости каллусных клеток два источника: проявление *in vitro* гетероплоидного состояния клеток,

не делящихся *in vivo*, или возникновение гетероплоидии в условиях культуры. В первом случае кариотипическая гетерогенность объясняется соответствующей гетерогенностью клеток эксплантата, не проявляющейся в интактном организме. Результаты наших исследований не позволяют выделить определяющую роль исходных тканей в кариотипической дифференцировке каллусных культур. Так, каллусный штамм А, изолированный от полисоматического вида гороха возник и остался диплоидным в течение нескольких лет, а оба каллусные штамма от непалисоматического вида креписа проявили именно в первых пассажах наибольший размах полиплоидии. Следовательно, приходится учитывать и возникновение кариотипической гетерогенности каллусных клеток в условиях культуры. На основе наших исследований нельзя сделать определенных выводов о механизмах возникновения хромосомной изменчивости в одних или других случаях, но можно предполагать, что таких механизмов несколько. Наряду с эндоредупликацией действуют, вероятно, и такие механизмы, как К-митоз и другие нарушения сегрегации, особенно в полиплоидных клетках. Нельзя упускать из виду возможность слияния хромосомных наборов в многоядерных клетках, на что указывают некоторые исследователи (Sunderland, 1973; D'Amato, 1977; Gupta, Molnar, 1979).

Какими бы ни были механизмы возникновения гетерогенных хромосомных наборов в каллусных клетках, ими еще не объясняются проявление определенных тенденций в кариотипических изменениях каллусных культур и формирование соответствующих штаммов. При образовании кариотипических штаммов должны действовать и какие-то факторы на уровне каллуса как системы клеток, способствующие делению клеток с определенным кариотипом. К числу таких факторов, несомненно, относятся компоненты среды и другие условия культивирования, как об этом уже упоминалось в введении данной работы. Однако селектирующую роль различных внешних в отношении самой культуры условий нельзя считать исчерпывающей при формировании кариотипических штаммов. Об этом свидетельствует возможность получения кариотипически разных штаммов при выращивании каллусных культур одного происхождения на одной и той же среде. Можно предполагать, что кроме условий культивирования (среда и др.) действуют еще какие-то внутриклеточные факторы, от которых зависит клеточный состав штамма. Такими внутренними факторами могут быть соотношения, слагающиеся между каллусными

клетками в длительных культурах и определяющие или ограничивающие возможности клеток к росту и развитию. Вернее, условия культивирования действуют через межклеточные соотношения, вследствие чего одни и те же внешние условия могут иметь разные эффекты. В данном случае под воздействием одних и тех же условий культивирования могут сформироваться разные кариотипические штаммы. Процесс формирования таких штаммов из каллусной культуры, выращиваемой в одинаковых условиях и имеющей общее происхождение, можно рассматривать как один способ дифференцировки растительных клеток *in vitro*, являющийся результатом совместного действия внешних и внутренних факторов.

### Выводы

1. В длительных каллусных культурах гаглопаллуса, гороха и креписа проявляются определенные тенденции кариотипической изменчивости и формируются штаммы с модальными хромосомными наборами или определенными соотношениями разноплоидных клеток, отличающимися от таких же у исходных тканей.

2. Кариотипическая гетерогенность каллусных клеток, являющаяся основной для формирования кариотипических штаммов, может быть результатом эндоредупликации, а также нарушений сегрегации и слияния ядер в каллусных клетках; в установлении и стабилизации каллусных штаммов с определенными кариотипами действуют какие-то факторы отбора.

3. Дифференцировка разных кариотипических штаммов в каллусной культуре, имеющей общее происхождение и выращиваемой в одинаковых постоянных условиях, свидетельствует об определяющей роли межклеточных соотношений как факторов отбора при формировании этих штаммов.

### Л и т е р а т у р а

- Зосимович В.П., Левенко Б.А., Юркова Г.Н., Легейда В.С. Выделение штаммов *Strepis capillaris* различной плоидности в культуре ткани. Докл. АН СССР, 1972, 203, 1188-1189.
- Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я. О морфологической и цитологической разнокачественности каллуса гороха. - Цитология и генетика, 1968, 2, 408-414.

- Кунах В.А. Цитогенетическая разнокачественность штаммов листового и стеблевого происхождений культур тканей *Nicotiana glauca* (Nutt.) Gray. - Цитология и генетика, 1971, 5, 241-249.
- Кунах В.А., Алпатова Л.К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Nicotiana glauca*. Докл. АН СССР, 1979, 245, 967-970.
- Кунах В.А., Левенко Б.А., Алпатова Л.К., Зосимович В.П. Изменчивость числа хромосом в клетках штаммов каллусной ткани в процессе формирования их из листьев гаплоидных растений табака. - Цитология, 1979, 21, 107-112.
- Кунах В.А., Левенко Б.А., Зосимович В.П. Культура *in vitro* пыльников *Nicotiana tabacum*. - Цитология, 1978, 20, 166-172.
- Малюк В.И., Павлова М.К., Мариновская Л.В., Тимохина Н.Г., Пивень Н.М. Эффект избирательной стимуляции размножения соматических клеток определенной пloidности в гетеропloidной культуре. Докл. АН СССР, 1975, 212-215.
- Butcher, D.N., Sogeki, A.K., Tommerup, I.C. Factors influencing changes in ploidy and DNA levels in cells from normal, crown-gall and habituated cultures of *Helianthus annuus* L. Protoplasma, 1975, 86, 295-308.
- D'Amato, F.D. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. Caryologia, 1964, 17, 41-52.
- D'Amato, F.D. Cytogenetics and differentiation in tissue and cell cultures. In: Appl. and Fundam. Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Berlin e. a., 1977, 343-357.
- Geitler, L. Riesenchromosomen bei Pflanzen. Forsch. Fortschr., 1965, 39, 295-298.
- Gupta, P.P., Molnar, G. Quantitative chromosomal changes in cultured cells of *Digitalis lanata* Ehrh. Curr. Sci., 1979, 48, 494-495.
- Kallak, H., Järvekülg, L. Changes in chromosome complement in long-term pea callus cultures. Acta biol. Acad. Sci. hung., 1977, 28, 183-189.
- Murashige, T., Skoog, R. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 1962, 15, 473-497.

- Nagl, W. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature*, 1976, 261, 614-615.
- Partanen, C.R. The validity of auxin-induced divisions in plants as evidence of endopolyploidy. *Exp. Cell Res.*, 1963, 31, 597-599.
- Partanen, C.R. On the chromosomal basis for cellular differentiation. *Amer. J. Bot.*, 1965, 52, 204-209.
- Reese, G. Über einen bemerkenswerten Fall von Polysomatie in Wurzelspitzen. *Cytologia*, 1973, 38, 539-601.
- Salmia, M.A. Cytology of two *Lathyrus* tissues grown in vitro. *Annal. bot. Fennici*, 1974, 11, 279-284.
- Seman, J., Hlásniková, A. Dynamics of ploidy changes in tobacco callus cultures depending on the time of cultivation. *Acta F.R.N. Univ. Comen. - Genetika*, 1977, 8, 7-14.
- Sen, S. Polysomaty and its significance in Liliales. *Cytologia*, 1973, 38, 737-751.
- Shamina, Z.B., Frolova, L.V. Chromosomal instability in the long-term cultivation of plant tissue in vitro. Abstracts of the 3rd Internat. Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Leicester, 1974, 281.
- Shimada, T., Tabata, M. Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. *Jap. J. Genet.*, 1967, 42, 195-201.
- Singh, B.D., Harvey, B.L., Kao, K.N., Miller, R.A. Karyotypic changes and selections pressure in *Haplopappus gracilis* suspension cultures. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1975, 17, 109-116.
- Sunderland, N., Nuclear cytology. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Oxford e. a., 1973, 161-190.
- Torrey, J.G. Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells. *Exp. Cell Res.*, 1961, 23, 281-299.
- Torrey, J.G. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1967, 20, 265-275.
- Tschermak-Woess, E. Karyologische Pflanzenanatomie. *Protoplasma*, 1956, 46, 797-834
- Venketeswaran, S., Spiess, E.P. Tissue culture studies on *Vicia faba*. III. Effect of growth factors on chromosome morphology. *Cytologia*, 1963, 28, 201-212.

ON KARYOTYPIC DIFFERENTIATION OF CALLUS CELLS  
IN LONG-TERM CULTURE

H. Kallak

S u m m a r y

The callus cultures isolated from the cotyledons of *Pisum sativum* and plantlets of *Crepis capillaris* and *Haplopappus gracilis* and subcultured in vitro up to 7-10 years were examined cytologically. The metaphase as well anaphase analyses revealed some definite tendencies in the karyotypic variability of prolonged callus cultures. Either an increase or a decrease in the chromosome number of callus cells could be observed. The pea callus strain which up to 3.5 year cultivation contained predominantly diploid ( $2x = 14$ ) cells became subsequently a hypertriploid ( $2n=23$ ) one, whereas the originally polyploid ( $\geq 4x$ ) hawk's-beard ( $2x = 6$ ) callus strain became a hyperdiploid ( $2n = 7$ ) one.

In the course of long-term subculturing some permanent tissue lines with modal chromosome complements were formed. These callus strains were characterized either by the predominance of cells with particular karyotype (diploid or polyploid, euploid or aneuploid, structurally normal or aberrant) or by maintenance of certain equilibrium between the cells with different ploidy level. The latter was characteristic of *Haplopappus* callus and some pea callus strains. The dominant modal karyotype of callus cells might essentially differ from that of the initial explant cells, as in the case of the hypertriploid pea callus strain. The anomalies in the reproduction and segregation of chromosomes obviously provided the basis for the karyotypic variability of callus cells and the selective proliferation of particular cell types might lead to the formation of a karyotypically permanent strain.

In some cases the originally common callus culture grown under apparently similar conditions diverged into karyotypically different strains. As to the possible mechanism of the differentiation of such callus strains the competitive selection for cells with dominant karyotypes was under consideration.

СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ 2,4-Д И НММ  
IN VIVO И IN VITRO НА ПРИМЕРЕ ТКАНЕЙ CREPIS CAPILLARIS

Х. Каллак, М. Ваппер

Исследованиями последних лет установлено мутагенное действие у многих химических соединений, загрязняющих окружающую среду. В настоящее время наиболее опасным считается действие пестицидов, которые могут долго циркулировать в среде обитания и накапливаться в органическом круговороте. В исследованиях, посвященных проблемам потенциальной мутагенности химикатов, особое значение придается выяснению сущности дифференциального воздействия мутагенов, в зависимости от разных модифицирующих факторов. К числу последних, несомненно, относятся генотипические и фенотипические особенности организмов и клеток, подлежащих воздействию химикатов. Показано, что на действие одного и того же потенциального мутагена по-разному реагируют не только разные виды организмов, но и разные особи одного вида и даже разные клетки одного организма (Зоз, Рапопорт, 1971; Куринный, Пилинская, 1976; Дубинин, Пашин, 1978; Ватти и др., 1979; Касьяненко, Кодолева, 1979; Karim, Bradshaw, 1968; Opatrný, 1973; Nuti Ronchi et al., 1976; Radin et al., 1978).

К числу химикатов, проявляющих дифференциальное биологическое воздействие, относится и широко применяемый гербицид 2,4-Д. В зависимости от условий воздействия (концентрация и др.) и особенностей возделываемых объектов, этот химикат действует то как гербицид, то как ауксин, то оказывает, то не оказывает мутагенного или канцерогенного воздействия (Куринный, Пилинская, 1976; Unrau, Larter, 1952; Croker, 1953; Williams, 1953; Faludi, 1964; Grant, 1972; Mohandas, Grant, 1972; Tomkins, Grant, 1974; Seiler, 1978). По литературным данным и нашим предыдущим исследованиям известно, что цитогенетическое воздействие 2,4-Д проявляется также в разных культурах растительных тканей (Каллак, Каареп, 1976; Валандидзе, 1977; Каллак и др., 1977; Kallak, Yarvekylg, 1971; Navránek, Novak, 1973; Bayliss, 1975; Singh, Harvey, 1976; Ronchi et al., 1976; Ghosh, Gadgil, 1979). Однако каллусная культура креписа оказалась инертной в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д. Увеличение количества химиката в

среде питания до предельных токсических доз не привело к заметным изменениям числа или строения хромосом в делящихся клетках подошного каллусного штамма (Каллак и др., 1979).

На основе этого исследования возник вопрос, объясняется ли инертность каллуса креписа в отношении 2,4-Д видовой спецификой, особенностями данной каллусной культуры, характером действия 2,4-Д или условиями обработки. Для выяснения обстоятельств, определяющих поведение каллусной культуры креписа под воздействием 2,4-Д, были поставлены опыты, целью которых стало: 1) сравнение эффектов цитогенетического воздействия 2,4-Д на каллусную культуру и первичные корешки креписа; 2) сравнение эффектов цитогенетического воздействия 2,4-Д и супермутагена НММ на крепис. Во всех вариантах изучали также дозовый эффект химикатов.

#### Материал и методика

Исследования проводились на первичных корешках и каллусной культуре креписа (*Crepis capillaris* (L.) Wallr.). Воздушно-сухие или предварительно замоченные в воде в течение 8 часов семена обрабатывали водными растворами 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты) в концентрации 5, 10, 20, 50, 100 и 300 мг/л или НММ (п-нитрозо-п-метилмочевину) в концентрации 100, 300 и 500 мг/л. Обработку проводили в течение 4 или 12 часов. После обработки семена промывали в воде и выращивали в чашках Петри до появления корешков с длиной 2-3 мм.

В качестве каллусной культуры исследовали штамм, изолированный от стеблевых тканей проростков и выращенный *in vitro* в течение 3,5-6,5 лет. Культура выращивалась на среде Мурасиге и Скуга со следующими добавками (мг/л): аденин (1,0), 2,4-Д (1,0), гидролизат казеина (500), М-инозит (100) и витамины по Уайту. Для выяснения цитогенетических эффектов исследуемых химикатов повысили концентрацию 2,4-Д в среде питания до 2, 5 или 10 мг/л или добавляли НММ в количестве 1 или 8 мг/л.

Для цитогенетических исследований приготавливали давленные препараты в ацеторсеине. Данные обработаны статистически. Доверительные границы вычислены по методу  $\bar{P}$  с уровнем значимости 0,05.

## Результаты исследований

Для выявления мутагенного действия 2,4-Д и НММ определили количество аберративных ана- и телофаз и степень плоидности хромосом в клетках подопытных тканей. Аберративными считали ана- и телофазы с мостиками, фрагментами и оставшими хромосомами (рис. 1). Для каждой точки фиксации просмотрели 200-700 меристематических или каллусных клеток на соответствующей фазе митоза.

Исследованная культура креписа является сформированным штаммом, который характеризуется низкой частотой ( $\sim 4-5\%$ ) аберративных ана- и телофаз и стабильным модальным кариотипом (Каллак, Ваппер, 1979). Кариотип большинства (70-80%) делящихся клеток представлен семью хромосомами, из которых одна является аберративной (рис. 2б).

В дополнение предварительному исследованию цитогенетического воздействия 2,4-Д на каллус креписа в 24-ом и 35-ом пассажах (Каллак, Ярвекюльг, Ваппер, 1979) были проведены повторные исследования воздействия 2,4-Д на каллус креписа еще в 38-ом, 46-ом и 50-ом пассажах. К времени фиксации в 50-ом пассаже каллусная культура росла на среде с 2,4-Д 2 мг/л уже в течение 26 пассажей, а на среде с 2,4-Д 5 мг/л - в течение 3 пассажей. Продолжительное культивирование на среде с 2,4-Д 10 мг/л оказалось невозможным из-за кумуляции токсического действия химиката.

Метафазный анализ клеток 38-го, 46-го и 50-го пассажей не показал заметных различий, по сравнению с предыдущими данными: во всех подопытных вариантах преобладали метафазы с модальным анеуплоидным кариотипом  $2n = 7$ . Результаты ана- и телофазного анализов представлены на рисунке 3. Достоверное увеличение количества аберративных ана- и телофаз обнаруживается лишь в 50-ом пассаже при воздействии 2,4-Д в концентрации 5 мг/л. Следовательно, повторные опыты подтверждают данные, полученные в предыдущих исследованиях. За исключением некоторых случаев подопытный каллус креписа не реагирует достоверными цитогенетическими изменениями на увеличение концентрации 2,4-Д до предельно токсических доз.

Для выяснения факторов, определяющих инертность каллусной культуры креписа в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д были проведены параллельные опыты с семенами креписа. Воздействию растворами 2,4-Д в разной концентрации

подвергали воздушно-сухие или замоченные в течение 8 часов в воде семена креписа. Цитогенетический анализ проводили в меристематических клетках первичных корешков длиной 2-3 мм. Результаты исследования показаны на рисунке 4. Поскольку применяемые концентрации 2,4-Д не вызывали изменений в числе хромосом, на гистограмме представлена только частота аберративных ана- и телофаз в разных подопытных вариантах: 1) воздействие 2,4-Д на воздушно-сухие семена в течение 12 часов; 2) воздействие 2,4-Д на прорастающие семена в течение 12 часов; 3) воздействие 2,4-Д на прорастающие семена в течение 4 часов.

Из данных, представленных на рисунке 4, следует, что в отличие от каллусных клеток креписа в меристематических клетках первичных корешков проявляется цитогенетическая активность 2,4-Д. Цитогенетическое воздействие 2,4-Д имеет дифференциальный характер, в зависимости от концентрации раствора и условий обработки. Так, постепенное повышение концентрации химиката до 100 мг/л вызывает заметное увеличение количества аберративных ана- и телофаз во втором варианте (воздействие 2,4-Д на прорастающие семена в течение 12 часов). Некоторое увеличение количества аберративных ана- и телофаз обнаруживается также при воздействии 2,4-Д на прорастающие семена в течение 4 часов (вариант 3) или на воздушно-сухие семена в течение 12 часов (вариант 1), но в гораздо меньшей мере. Зависимость цитогенетической активности 2,4-Д от условий обработки особенно ярко проявляется при концентрации 100 мг/л: частота аберративных ана- и телофаз во втором варианте в два раза больше, чем в остальных вариантах.

Учитывая то обстоятельство, что каллусные клетки и меристематические клетки первичных корешков креписа по-разному реагируют на цитогенетическое воздействие 2,4-Д, оказалось уместным сравнивать на этих же модельных тест-системах эффекты действия известного супермутагена НММ.

Воздушно-сухие и замоченные 8 часов семена креписа обрабатывали растворами НММ в течение 4 часов. Цитогенетический анализ меристематических клеток первичных корешков длиной 2-3 мм показал, что при использованных концентрациях (100, 300 и 500 мг/л) нитрозометилмочевина не вызывает заметных изменений в числе хромосом. Результаты анализа ана- и телофаз в возделываемых корешках представлены на рисунке 5. Полученные данные свидетельствуют о достоверном увеличении ко-

личества aberrативных ана- и телофаз при повышении концентрации мутагена. Обнаруживается также зависимость эффекта воздействия от физиологического состояния обработанных семян. При воздействии НММ в концентрации 300 мг/л на прорастающие семена встречается в 2,5 раза больше aberrативных ана- и телофаз, чем при воздействии этим же раствором на сухие семена. При остальных использованных концентрациях НММ такой разницы нет.

Для изучения цитогенетической активности НММ в каллусной культуре кренписа в среду питания был добавлен мутаген в количестве 1 или 8 мг/л. Цитогенетический анализ провели после 8-суточного выращивания каллусной ткани на среде с мутагеном. На рисунке 6 представлены данные, полученные в результате анализа ана- и телофаз в подопытной каллусной культуре. Можно отметить, что добавление в среду питания мутагена приводит к достоверному увеличению aberrативных ана- и телофаз. При этом проявляется дозовая зависимость: если при концентрации НММ 1 мг/л доля aberrативных ана- и телофаз остается в пределах 14-20 процентов, то при концентрации 8 мг/л их количество достигает 30 процентов.

В отличие от воздействия 2,4-Д под воздействием мутагена НММ в каллусных клетках обнаруживаются также изменения в числе хромосом. Об этом свидетельствуют данные, представленные на рисунке 7. Добавление в среду питания мутагена ведет к уменьшению количества метафаз с модальным кариотипом ( $2n = 7$ ), стабилизированным в течение многолетнего культивирования *in vitro*. Зато увеличивается доля метафаз с хромосомными наборами 8-II и  $\geq$  12. Встречаются разные структурные мутации хромосом (рис. 8). Увеличение количества клеток с анеуплоидными наборами 8-II особенно заметно под воздействием мутагена в концентрации 8 мг/л. Следовательно, по этому маркеру также проявляется дозовая зависимость действия мутагена.

### Обсуждение

Проведенные исследования еще раз указывают на специфику реагирования обработанных тканей и клеток как на существенный модифицирующий фактор при проявлении воздействия биологически активных химикатов.

Так, на основе данных, полученных в результате исследования цитогенетического воздействия 2,4-Д на кариотипически стабильный каллусный штамм кренписа, можно предположить, что

Этот химикат не вызывает изменений в степени плоидности или частоте митозов в клетках креписа, или заключить, что каллусная культура не выявляет соответствующих эффектов действия, т.е. не является подходящей тест-системой на мутагенность. В пользу кариотипической инертности вида *Crepis capillaris* свидетельствует уже то обстоятельство, что крепис относится к числу неполисоматических видов растений. К тому же, уровень кариотипической изменчивости клеток креписа в условиях культуры также значительно ниже, чем у многих видов растений. Однако проведенные нами на семенах креписа опыты показывают, что под воздействием 2,4-Д достоверно увеличивается количество аберративных ана- и телофаз в меристематических клетках первичных корешков у этого вида. В определенных условиях (в зависимости от физиологического состояния обработанных семян и применяемой концентрации 2,4-Д) количество аномальных ана- и телофаз обработанных клеток четырехкратно превышает это же число в клетках контрольного варианта. Аномальные ана- и телофазы с мостиками и фрагментами свидетельствуют об аберрациях в строении хромосом, не подвергавшихся своевременной репарации. Следовательно, крепис как вид не является инертным в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д.

Цитогенетические эффекты действия 2,4-Д на прорастающие семена креписа вполне сравнимы с соответствующими эффектами супермутагена НММ. По литературным данным хорошо известно, что НММ вызывает достоверное увеличение количества хромосомных аберраций в делящихся клетках у разных видов растений, в том числе и у креписа (Соболев, 1966; Шарма, 1966; Зоз и др., 1974; Шамаева, Гарина, 1975; Григорова, 1978). Наши исследования показывают, что цитогенетическое воздействие обоих мутагенов зависит от применяемой концентрации, показывая дозовую эффект. При повышении концентрации 2,4-Д до 300 мг/л (1,4 мМ) становится заметным гербицидное действие химиката: митозы в первичных корешках прекращаются после обработки замоченных семян и встречаются в малом количестве только после обработки сухих семян. Зато митотическая активность достаточно высока для цитогенетического анализа при обработке замоченных семян креписа с НММ в дозе 300 мг/л (2,9 мМ), а сухих семян еще в дозе 500 мг/л (4,9 мМ). Воздействие исследованных химикатов зависит и от физиологического состояния обработанных семян. Цитогенетическая активность 2,4-Д и НММ более заметна при обработке прорастающих семян, чем при об-

работке сухих семян. Зависимость действия химиката от продолжительности обработки нами исследована пока только в отношении 2,4-Д, но по литературным данным это явление обнаружено и для НММ (Шарма, 1966).

Сопоставление эффектов действия 2,4-Д и НММ на семена креписа еще раз показывает способность цитогенетического реагирования этого вида на разные химикаты.

Проверка "инертности" каллусной культуры креписа в качестве тест-системы дала также отрицательный результат: испытываемый штамм креписа реагировал на воздействие НММ как увеличением частоты аберративных ана- и телофаз, так и изменением модалного кариотипа. По обоим маркерам обнаруживается дозовый эффект действия химиката. Следовательно, каллусная культура креписа как тест-система в принципе способна выявить мутагенное действие химикатов и их дозовую зависимость.

Инертность каллусной культуры креписа в реагировании на действие 2,4-Д можно частично объяснить тем обстоятельством, что крепис как вид, по-видимому, действительно более резистентен в отношении цитогенетической активности этого химиката, чем некоторые другие виды растений. Сравнительное изучение цитогенетического воздействия 2,4-Д на семена креписа, гороха, бобов и лука показывает, что крепис в этом отношении наименее чувствительный. Таким образом, в реагировании каллусной культуры креписа в какой-то мере проявляется видовая специфика. Однако не в этом суть явления.

В некоторых случаях каллусная культура как система может оказаться более резистентной в отношении цитогенетического действия химиката, чем ткани интактных организмов у этого же вида. По данным Радина и Карлсона (Radin, Carlson, 1978) пестициды бентазон и фенмедиформ действуют дифференциально на интактные ткани и каллус табака, причем каллус оказывается более резистентным. О дифференциальном воздействии НММ на первичные эксплантаты и трехлетние каллусные штаммы свидетельствуют результаты опытов, проведенных Опатрни (Opatrny, 1973). Данные, полученные нами при сравнении воздействия 2,4-Д на первичные корешки и каллус гороха, также показывают, что цитогенетические эффекты действия этого химиката значительно сильнее выявляются в меристематических клетках первичных корешков, чем в каллусе (данные в печати).

Повышенную резистентность каллусных культур в отношении цитогенетической активности химикатов можно объяснить разны-

ми обстоятельствами, зависящими от особенностей культур тканей, а также от методики обработки. Если семена обрабатываются химикатами в течение нескольких часов, то в среде питания каллусной культуры соответствующие химикаты сохраняются в течение нескольких дней и недель, в зависимости от скорости распада испытуемых соединений. Продолжительная обработка предполагает применение пониженных концентраций химикатов во избежание токсичного воздействия. С другой стороны, при длительном воздействии химикатов на каллусные культуры в их клетках могут возникнуть некоторые процессы, устраняющие или замедляющие токсичное или мутагенное действие химикатов. Относительная резистентность каллусной культуры может быть достигнута в результате действия разных репарационных систем клеток или отбора ранее существовавших или вновь возникающих резистентных (мутантных) в отношении испытуемого химиката клеток. Опатрни (Opatrińy, 1973) считает наиболее вероятными механизмами повышения резистентности каллусных культур репарацию и отбор, т.е. преимущественное деление клеток, неза- тронутых действием мутагена.

Относительно резистентности исследованного нами каллусного штамма креписа в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д можно предполагать, что в основе этого явления лежит отбор - преимущественное деление клеток наиболее приспособленных к содержанию химиката в среде питания. В пользу этого предположения говорит прежде всего то обстоятельство, что подопытный каллус креписа в течение многих лет выращивался на среде, содержащей в качестве ауксина 2,4-Д (1 мг/л). Именно на среде с 2,4-Д сформировался каллусный штамм с определенным модальным кариотипом ( $2n = 7$ ) и низкой частотой аберраций. Повышение дозы 2,4-Д в 2 или 5 раз не вызвало цитогенетических изменений в культуре, привыкшей расти на среде с 2,4-Д, а дальнейшее повышение концентрации химиката привело к прекращению роста и гибели культуры. Зато введение в среду питания "чужеродного" соединения НММ нарушило установленное годами кариотипическое равновесие каллусных клеток креписа. Появились клетки с разными нетипичными для штамма кариотипами, увеличилась частота нарушенных ана- и телофаз.

Для более подробного анализа механизмов реагирования каллусных клеток на потенциальные мутагены и специально на 2,4-Д следует провести испытания, в которых воздействию 2,4-Д подвергались бы культуры, выращенные заранее на среде

без 2,4-Д, или в качестве потенциального мутагена применялся бы какой-то другой химикат.

### Выводы

1. Цитогенетическое воздействие ауксинового гербицида 2,4-Д на крепис проявляется дифференциально, в зависимости от особенностей подопытных клеток и условий обработки. Повышение концентрации 2,4-Д в среде питания каллусной ткани до токсичного уровня (10 мг/л) не вызывает заметных цитогенетических изменений, а в клетках первичных корешков под воздействием химиката (5-300 мг/л) достоверно увеличивается количество aberrативных ана- и телофаз, причем обнаруживается зависимость от дозы, продолжительности действия и физиологического состояния семян.

2. Супермутаген НММ вызывает достоверные цитогенетические изменения как в меристематических клетках первичных корешков, так и в каллусных клетках креписа. Кроме увеличения частоты aberrативных ана- и телофаз в каллусных клетках под воздействием НММ изменяется и степень пloidности.

3. Инертность подопытного каллусного штамма креписа в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д объясняется, по-видимому, длительным отбором в культуре клеток, наиболее приспособленных к содержанию этого химиката в среде питания.

### Л и т е р а т у р а

- Ватти К.В., Мамон Л.А., Джапаридзе Л.А., Барабанова Л.В. Сравнительное изучение мутагенеза у особей разных полов. Анализ частоты индуцированных транслокаций. - Генетика, 1979, 15, 1989-1995.
- Вашакидзе Л.К. О цитогенетическом эффекте кинетина и 2,4-Д в культуре ткани *Vitis vinifera*. - В сб.: 3-ий съезд Всес. о-ва генетиков и селекционеров им.Н.И.Вавилова. Тез. докл. Л., 1977, 88.
- Григорова Н.В. Сравнительная цитогенетическая характеристика химических мутагенов. - В сб.: Химический мутагенез и гибридизация. М., "Наука", 1978, 203-211.
- Дубинин Н.П., Пашин Ю.В. Мутагенез и окружающая среда. М., "Наука", 1978.

- Зоз Н.Н., Рапопорт И.А. Закономерность химического мутагенеза на культурных растениях. - В сб.: Химический мутагенез и селекция. М., "Наука", 1971, 136-147.
- Зоз Н.Н., Серебряный А.М., Бабаев М.Ш., Абрамов В.И., Колотенков П.В., Костяковский Р.Г. Химические мутagens. У. Генетическая активность новых нитрозосоединений на растениях. - Цитология и генетика, 1974, 8, 37-40.
- Каллак Х.И., Ваппер М.А. Цитогенетическая характеристика длительно культивированного креписа. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1979, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 18-29.
- Каллак Х., Каареп Ю. Цитогенетическая характеристика действия 2,4-Д на каллусные ткани *Parlorarrus gracilis*. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 32-51.
- Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я., Ваппер М.А. Культура растительных тканей как модель для изучения мутагенного действия гербицидов. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1979, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 30-47.
- Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я., Пальм М.А., Ваппер М.А. О дифференциальном эффекте токсического и мутагенного действия гербицида 2,4-Д. - В сб.: 3-ий съезд Всес. о-ва генетиков и селекционеров. Тез. докл. Л., 1977, 203.
- Касьяненко А.Г., Королева Н.С. Оценка генетической опасности пестицидов. Изв. АН СССР, сер. биол., 1979, 3, 401-409.
- Курманный А.И. Исследование пестицидов как мутагенов внешней среды. Киев, "Наук. думка", 1976.
- Соболев Н.А. Применение химических мутагенов в селекции зерновых бобовых культур. - В сб.: Супермутagens. М., "Наука", 1966, 176-184.
- Шамаева Н.Н., Гарина К.Н. Цитогенетическое влияние N-нитрозо-N-метилмочевины на клетки семян *Crepis capillaris* L. в условиях длительного хранения. - Генетика, 1975, II, 15-21.
- Шарма Б. Сравнение действия N-нитрозометилмочевины с различными физическими и химическими мутагенами на горохе *Pisum sativum* L. - В сб.: Супермутagens. М., "Наука", 1966, 143-159.

- Bayliss, M.W. The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.*, 1977, 8, 99-103.
- Crocker, B.H. Effects of 2,4-D and 4,4,5-T on mitosis in *Allium cepa*. *Bot. Gaz.*, 1953, 114, 274-283.
- Faludi, B. Genetical differences in the sensitivity to 2,4-D herbicide. *Ann. Univ. scient. Budapest Sec. biol.*, 1964, 7, 73-75.
- Ghosh, A., Gadgil, V.N. Shift in ploidy level of callus tissue: a function of growth substances. *Indian J. Exp. Biol.*, 1979, 17, 562-564.
- Grant, W.F. Pesticides - subtle promoters of evolution. *Symp. Biol. Hung.*, 1972, 12, 43-50.
- Havránek, F., Novák, F.J. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 1973, 68, 308-318.
- Kallak, H., Yarvekylg, L. On the cytogenetic effects of 2,4-D on pea callus in culture. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, 1971, 22, 67-73.
- Karim, A., Bradshaw, A.D. Genetic variation in simazine resistance in wheat, rape and mustard. *Weed Res.*, 1968, 8, 283-291.
- Mohandas, T., Grant, W.F. Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. *Can. J. Genet. and Cytol.*, 1972, 14, 773-783.
- Opatrný, Z., Effect of N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N-nitrosourethane upon the growth of tissue cultures of tissue cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Biol. Plant.*, 1973, 15, 179-188.
- Radin, D.N., Carlson, P.S. Herbicide-tolerant tobacco mutants selected in situ and recovered via regeneration from cell culture. *Genet. Res. Camb.*, 1978, 32, 85-89.
- Ronchi, V.N., Martini, G., Buiatti, M. Genotype-hormone interaction in the induction of chromosome aberrations: effect of 2,4-D and kinetin on tissue cultures from *Nicotiana* Spp. *Mutation Research*, 1976, 36, 67-72.
- Seiler, J.P. The genetic toxicology of phenoxy acids other than 2,4,5-T. *Mutation Research*, 1978, 55, 197-226.

- Singh, B.D., Harvey, B.L. Effects of different 2,4-D concentrations on the cytogenetic behaviour of plant cells cultured in vitro. Biol. plant. Acad. Sci. bohemosl., 1975, 17, 167-174.
- Tomkins, D.J., Grant, W.F. Differential response of 14 weed species to seven herbicides in two plant communities. Can. J. Bot., 1974, 52, 525-533.
- Unrau, J., Larter, E.N. Cytogenetical responses of cereals to 2,4-D. Can. J. Bot., 1952, 30, 22-27.
- Williams, J.H. Differential varietal response of root tissues to exogenous growth regulators in soybeans, oats and corn. Agron. J., 1953, 45, 293-297.

ON COMPARISON OF CYTOGENETIC ACTIVITY OF 2,4-D AND NMU  
IN VIVO AND IN VITRO ON MODEL OF THE TISSUES OF  
CREPIS CAPILLARIS

H. Kallak, M. Vapper

S u m m a r y

The cytogenetic effects (i. e. changes of aberrant anaphases and telophases) of the widely used herbicide 2,4-D and supermutagen NMU on prolonged callus culture as well as on primary roots of *Crepis capillaris* were under study. It was found that 2,4-D produces different effects depending on the characteristics of the treated tissues and the conditions of administration. The addition of this chemical into the medium at concentrations of 2.0, 5.0 or 10.0 mg/litre did not cause any remarkable variations in the chromosome complements of callus cells, whereas the treatment of seeds with 2,4-D at concentrations of 5.0 - 300 mg/litre during 4 or 12 hours brought about notable changes in the frequency of aberrant mitoses in primary roots. Under the influence of NMU at concentrations of 1.0 or 8.0 mg/litre changes of both chromosome number and structure in callus cells could be seen. The treatment of seeds with NMU at concentrations of 100, 300 and 500 mg/litre during 4 or 12 hours raised the frequency of aberrant anaphases and telophases in primary roots, but did not alter the chromosome number of meristematic cells. The

resistance of callus culture to the cytogenetic activity of 2.4-D can be explained by the long-term selection of callus cells most adjusted to the content of this chemical in culture medium.

## ИЗУЧЕНИЕ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА КАТЕХОЛ-2,3-ОКСИГЕНАЗЫ НА УРОВНЕ ИНТАКТНЫХ КЛЕТОК

А.Х. Кильк, Л.А. Касак, А.Л. Хейнару

Способность деградировать разнообразные ароматические соединения является характерным признаком для почвенных псевдомонад (Chakrabarty, 1976). Разложение ароматических соединений происходит обыкновенно через промежуточный продукт катехол или его производные (Feist, Hegemann, 1969; Williams, Murray, 1974) (рис. 1). Поэтому ключевыми ферментами являются катехол-1,2-оксигеназа (K120) и катехол-2,3-оксигеназа (K230). Первый фермент расщепляет ароматическое ядро в орто-, второй в мета - положении (Feist, Hegemann, 1969; Murray et al., 1972; Sala-Trepat et al., 1972; Nakazawa, Yokota, 1973). При наличии в клетках *Pseudomonas putida* TOL-плазмиды хромосомные гены K120 не экспрессируются, а мета-расщепление ароматических соединений с K230 идет по плазмидному пути (Williams, Murray 1974; Wong, Dunn, 1974; Worsey et al., 1978). По индукции синтеза K230 можно судить об экспрессии TOL-специфических генов. Определение этого фермента проводится обычно по методу Фейст-Хегемана в бесклеточном экстракте (Feist, Hegemann, 1969). Так как K230 нестабильная, определение фермента в бесклеточном экстракте связано с некоторыми трудностями: клетки необходимо разрушать в присутствии органических растворителей (например 10% ацетона) (Nozaki et al., 1963) и активность фермента определить непосредственно после приготовления экстракта.

В настоящей работе исследована возможность определения активности K230 и некоторых других ферментов на уровне интактных клеток.

### Материал и методы

Штаммы бактерий. В работе исследовались 4 стандартных и 8 местных штаммов псевдомонад, общая характеристика которых представлена в таблице I.

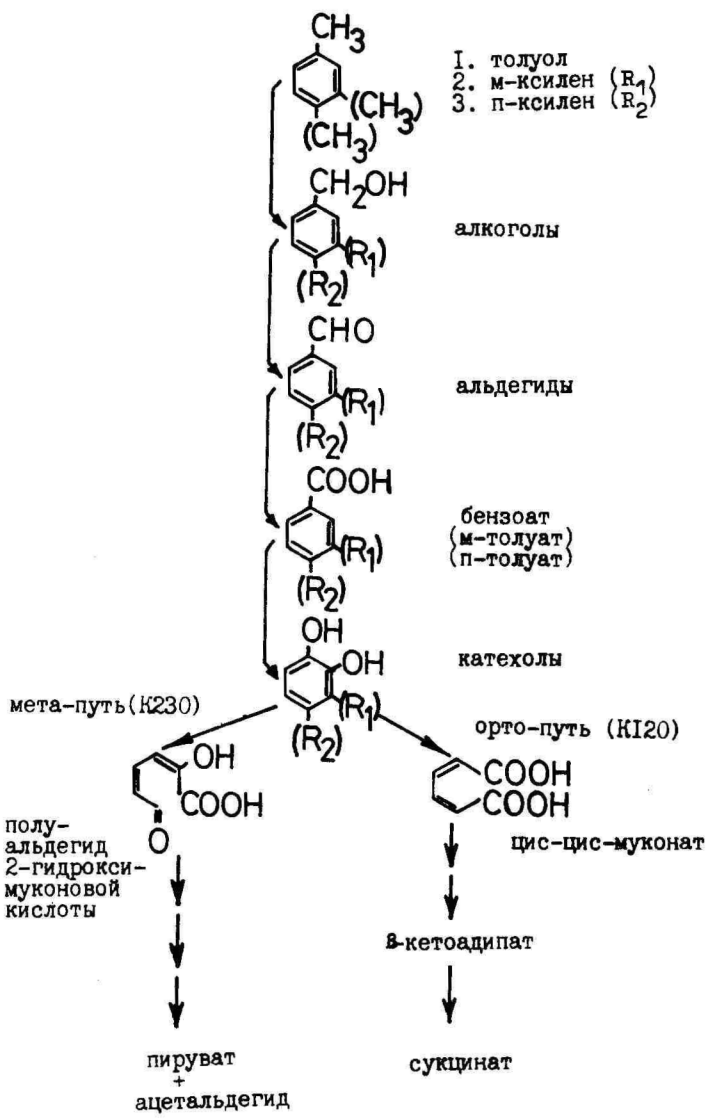


Рис. I. Метаболизм толуола и ксилола у *Ps. putida mt-2* TOL<sup>+</sup>

Т а б л и ц а I

Характеристика исследуемых штаммов псевдомонад\*

№ п/п	Штаммы бактерий	Плазмиды	Происхождение
1	2	3	4
I.	<i>Ps. putida</i> mt-2(160)	TOL(pWWO)	от др. П.Броды, Англия
2.	<i>Ps. putida</i> mt-2(Paw85)	-	от др. П.Броды, Англия
3.	<i>Ps. putida</i> mt-2(Paw340)trp str-r	-	от др. П.Броды, Англия
4.	<i>Ps. putida</i> AC804 met	TOL	от др. А.М. Чакрабарти, США
5.	<i>Ps. species</i> Nr. 1	TOL-1	местный
6.	<i>Ps. putida</i> var. Nr. 2	TOL-2	местный
7.	<i>Ps. putida</i> var. Nr. 3	TOL-3	местный
8.	<i>Ps. species</i> Nr. 4	TOL-4	местный
9.	<i>Ps. species</i> Nr. 5	TOL-5	местный
10.	<i>Ps. species</i> Nr. 6	TOL-6	местный
II.	<i>Ps. putida</i> var. Nr 7	TOL-7	местный
12.	<i>Ps. putida</i> var. Nr 8	TOL-8	местный

\* Потребность в триптофане (trp) и метионине (met), резистентность к стрептомицину (str-r), наличие плазмид биодеградации толуола (TOL)

Питательные среды. В качестве полной среды применялась L-среда. Минеральные среды содержали раствор M9 (Adams, 1959), Спицайзена без добавления цитрата натрия (Spizizen, 1958) или солей с низкой концентрацией фосфата (г/л) -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,4,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1,0,  $\text{CaCl}_2$  - 0,006, трис-HCl - 0,01 M. Растворы микроэлементов приготовили по Баушоп-Эльсдену (Baushop, Elsdén 1960). Источниками углерода и энергии служили м-толуат, p-толуат, бензоат и сукцинат в конечной концентрации 10 mM (Duggleby et al., 1977).

Условия культивирования микробов и индукции синтеза ферментов. Культивирование бактерий проводили при 30° при условии сильной аэрации (проток воздуха через питательную среду). В опытах по индукции TOL -специфических ферментов бактерий выращивались на селективной среде до оптической плотности равной 0,5 при  $\lambda = 580$  нм, клетки осаждались центрифугированием при 4°C, промывались раствором инеральных солей

и ресуспендировались в минимальной среде с сукцинатом до оптической плотности равной 0,05. Культуру бактерии выращивали до оптической плотности равной 0,5, клетки осаждали центрифугированием, промывали и ресуспендировали в среде с индуктором до оптической плотности 0,01 ... 0,05. При вышеназванных условиях индуктор является единственным источником энергии и углерода и, следовательно, весь метаболизм клетки направлен через экспрессию  $TOI$ -плазмидных генов.

**Определение активности ферментов.** Активность катехол-2,3-оксигеназы (E.C.1.13.1.2.) определялась по Наказава и Ёкота (Nakazawa, Yokota, 1977). В параллельных опытах вместо суспензии клеток были использованы бесклеточные экстракты (Feist, Hegemann, 1969), приготовленные с ацетоном (10%) или без него. Клетки разрушались ультразвуком в дезинтеграторе УЗДН-ИУ42 и при помощи пресса Хьюза. Активность ферментов определялась спектрофотометрическим методом на приборе "Specord UV VIS". В случае применения суспензии интактных клеток была определена оптическая плотность в реакционной смеси и рассчитан соответственный сухой вес (рис. 2). Активность фермента K230 была вычислена по образованию 2-гидроксимуконowego полуальдегида в микромолях в течение одной минуты на миллиграмм сухого веса бактерий, определяемый по зависимости к оптической плотности микробной суспензии при  $\lambda = 580$  нм или на миллиграмм общего белка (мкмоль/мин/мг сухого веса или мкмоль/мин/мг белка).

Активность K120 определялась по методу Хегемана (Hegemann, 1966), причем вместо бесклеточного экстракта в реакционную смесь добавляли суспензию клеток. Об активности K120 судили по возрастанию концентрации цис-цис муконата при  $\lambda = 260$  нм. Активность K120 выдержали в мкмоль/мин/мг сухого веса бактерий.

Определение гидролазы 2-гидроксимуконowego полуальдегида осуществлялась по модифицированной методике Фейста-Хегемана (Feist, Hegemann, 1969). Об активности гидролазы 2-гидромуконowego полуальдегида судили по снижению количества 2-гидроксимуконowego полуальдегида при  $\lambda = 375$  нм.

Для вычисления активности ферментов определялся коэффициент экстинкции полуальдегида 2-гидроксимуконовой кислоты, полученной из катехола по методу Фейста-Хегемана (Feist, Hegemann, 1969). В бесклеточном экстракте общий белок определялся по методу Хартри (Hartree, 1975) и Лоури (Lowry et al., 1951).

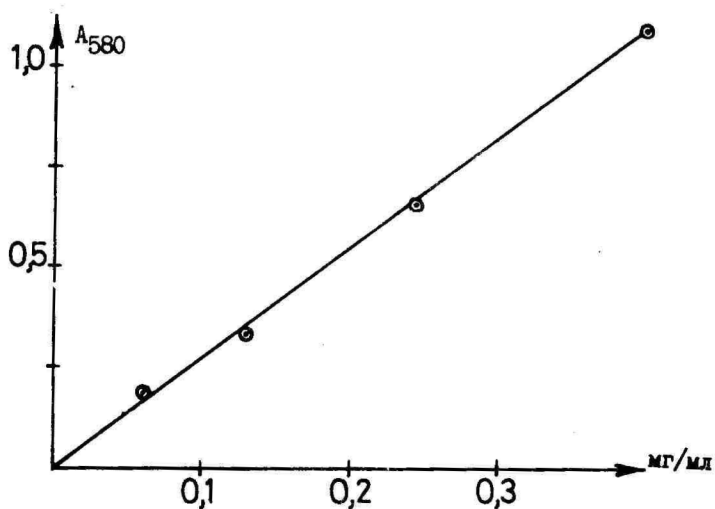


Рис. 2. Зависимость между оптической плотностью и сухим весом бактерий штамма *Ps. putida mt-2 pW10*

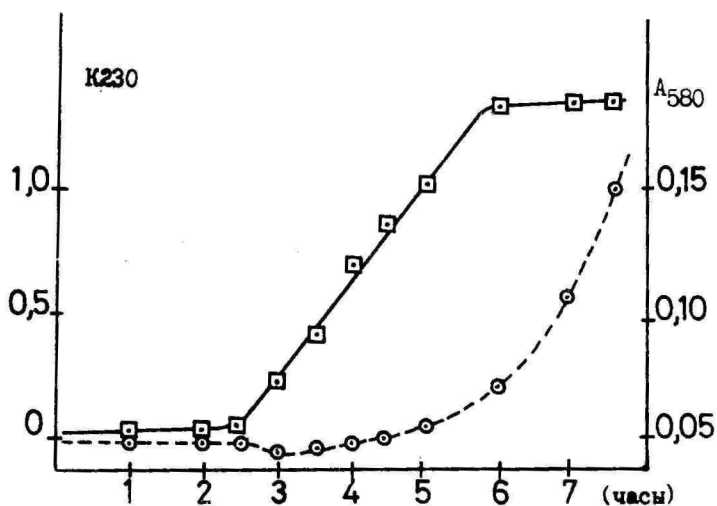


Рис. 3. Индукция синтеза катехол-2,3-оксигеназы у штамма *Ps. putida mt-2 pW10*  
 □-□-□-активность катехол-2,3-оксигеназы (K230)  
 ○-○-○-рост микробов

## Результаты и обсуждение

В предварительных опытах нами была разработана новая методика определения индукции синтеза K230 на уровне интактных клеток. С этой целью были оптимизированы состав питательной среды, количество добавленных микроэлементов, концентрация субстрата и клеток в реакционной смеси, а также условия культивирования микробов при аэрации культуры. В отличие от японских авторов (Nakazawa, Yokota, 1977) в наших опытах микробы культивировались в средах, где единственным источником углерода и энергии (а также индуктором TOL-специфических генов) служили п и м-толуат или ксилен. В этих условиях весь метаболизм клетки был направлен через экспрессию плазмидных генов.

Применяя питательные среды, содержащие фосфат в низких концентрациях, удалось получить полную индукцию синтеза K230 до размножения основной части микробов в изучаемой популяции (рис. 3). В типичных случаях индукция синтеза K230 начиналась спустя 2,5 ... 3,5 часа после перенесения клеток в среду с индуктором и продолжалось около трех часов. Время лаг-периода до интенсивной индукции K230 зависело от физиологической активности клеток, а также от промывания и условий центрифугирования клеток. Для опыта брались растущие на сукцинате клетки в логарифмической фазе роста. В разных опытах максимальная активность K230 у штамма *P. putida* mt-2 колебалась в пределах 0,4 ... 1,5 ед/о.е. при  $\lambda = 580$  нм. При этом конститутивный уровень фермента K230 в клетках был от самого нуля до 0,2 ед/о.е. при  $\lambda = 580$  нм. Была выяснена связь между конститутивным и максимальным уровнем индукции этого фермента в присутствии индуктора - чем выше конститутивный уровень, тем ниже уровень индукции K230. Для выяснения этого явления было изучено снижение уровня K230 при росте клеток в средах с сукцинатом. Эти опыты показали, что уровень K230 снижается в течение 4 ... 5 часов прямо пропорционально размножению клеток. Из этого следует, что внутриклеточная K230 должна быть стабильной и при делении клеток молекулы K230 распределяются между дочерними клетками. Можно предполагать, что в наших условиях выращивания (в присутствии индуктора) микробы, имеющие высокий конститутивный уровень K230, начинают размножаться. Поэтому в микробной популяции в целом уровень индукции K230 не достигает уровня,

который имеется в индуцированной системе при применении клеток бактерий с нулевым конститутивным уровнем K230.

Уже в 1963 году японские исследователи выделили в чистом виде K230 (Nozaki et al., 1963). Было выяснено, что этот фермент состоит из четырех субчастиц и для активности фермента необходимы ионы двухвалентного железа, а ингибиторами являются другие двухвалентные катионы, связывающие SH-группы. С другой стороны, для роста псевдомонад необходимы такие микроэлементы ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). В опытах выяснилось, что высокие концентрации микроэлементов действительно уменьшают уровень активности K230. Поэтому мы снизили концентрации этих микроэлементов в средах выращивания ( $\text{CuSO}_4$  и  $\text{CoSO}_4$  до  $10^{-6}\%$  и  $\text{ZnSO}_4$  и  $\text{MnSO}_4$  до  $10^{-5}\%$ ). Рост микробов при этом не ухудшался.

Активность K230 можно было детектировать непосредственно во всех использованных нами минеральных средах. Все же при применении более богатых сред, а особенно среды Спицайзена, где микробы растут очень быстро, уровень индукции K230 оказался несколько ниже, по сравнению с уровнем, полученным при применении среды с низкой концентрацией фосфатов.

В экстрактах, полученных из культуральной жидкости, K230 полностью инактивируется. Поэтому необходимо промыть клетки и ресуспендировать в буферном растворе. Приготовленные в таких условиях в экстрактах K230 тоже инактивируется довольно быстро, так как в присутствии кислорода железо-II легко окисляется на железо-III. При добавлении стабилизирующего агента - 10%-ного ацетона (Nozaki et al., 1963; Lee, Dagley, 1977) активность K230 при хранении экстракта все же уменьшается. Поэтому активности K230 в бесклеточных экстрактах необходимо определять непосредственно после разрушения клеток. С другой стороны, при применении в опытах интактных клеток их можно сохранять по крайней мере 6 часов в присутствии ингибитора роста бактерий - хлорамфеникола (100 мг/мл) без заметного снижения активности K230. Низкие концентрации этого антибиотика не влияют на активность K230 (Nakazawa, Yokota, 1977).

В наших условиях опыты  $K_m$  катехол-2,3-оксиганезы для катехола при применении бесклеточных экстрактов сравнялась с 5 мкМ, а при интактных клетках - 25 мкМ. Кинетика этой реакции не изменялась при концентрации катехола, превышающей  $K_m$  500 раз. Так как K230 не выходит в таких условиях из клеток, вероятно, только сравнительно высокие концентрации катехола в клеточной суспензии обеспечивает достаточный уро-

вень этого субстрата в клетке. Предварительная обработка клеток с толуолом (Nakazawa, Yokota, 1977) не дала в наших опытах никакого эффекта.

В таблице 2 представлены данные об активности K230 в бесклеточных экстрактах и на уровне интактных клеток, полученных нами и другими авторами у штамма *Ps. putida* mt-2 pWVO. Из данных таблицы 2 видно, что активность K230 значительно колеблется в работах разных авторов, особенно при применении бесклеточных экстрактов. Уровень активности K230, определяемый в интактных клетках и в бесклеточных экстрактах, оказывается сходным (различия меньше одного порядка). В то же время почти такое же колебание отмечается при определении активности K230 в бесклеточных экстрактах разными авторами (табл. 2). В последнем случае немалое значение имеет способ получения бесклеточного экстракта, а также условия культивирования микробов. Даже коэффициенты экстинкции у разных групп исследователей неодинаковые:  $29 \times 10^3$  (Feist, Hegemann, 1969),  $30 \times 10^3$  (Dunn, Gunsalus, 1973),  $44 \times 10^3$  (Nakazawa, Yokota, 1973). Нами был определен коэффициент экстинкции равный  $\sigma' = 40 \times 10^3$ , что почти совпадает с данными японских авторов (Nakazawa, Yokota, 1973), которые применяют сходные условия культивирования бактерий *Ps. putida* mt-2 pWVO.

Исходя из вышесказанного рекомендуемая нами методика определения индукции синтеза K230 является нетрудоемкой и дает более одинаковые результаты в повторных опытах.

Пригодность методики была испытана еще у других штаммов псевдомонад, имеющих TOL-плазмиды (табл. 3). У местных TOL<sup>+</sup> штаммов была определена активность K230 при культивировании клеток на м- и п-толуате. Как и в случае первоначальной TOL-плазмиды pWVO (табл. 2) уровень индукции при росте клеток на п-толуате значительно ниже, чем на м-толуате, что совпадает с литературными данными (Worsey, Williams, 1975; Williams, Worsey, 1976). В свою очередь, м-ксилен является даже лучшим индуктором синтеза K230, чем м- и п-толуаты (табл. 3) (Williams, Murray, 1974; Worsey et al., 1978). Интересно еще отметить, что у штамма *Ps. putida* AC804 met<sup>-</sup>, имеющего делеционный мутант TOL-плазмиды TOL\* (Chakrabarty et al., 1978), уровень индукции K230 оказался во всех опытах ниже, чем в случае первоначальной TOL-плазмиды pWVO.

Наши данные об определении активности катехол-1,2-оксигеназы у штаммов *Ps. putida* mt-2; 340 trp<sup>-</sup>str<sup>res</sup> и *Ps. putida*

Т а б л и ц а 2

Активность катехол-2,3- и -1,2-оксигеназ штамма *Ps. putida mt-2 pWWO*

Фермент	Индуктор	Способ определения	Активность фермента*		Происхождение	
			4	5		
1	2	3	4	5		
катехол-2,3-оксигеназа	м-толуат	бесклеточный экстракт	0,984		Nakazawa, Yokota, 1977	
			1,7		Austen, Dunn, 1977	
			3,3		Worsey et al., 1978	
			0,189		Nakazawa et al., 1978	
			3,3		Nakazawa et al., 1978	
	интактные клетки			2,7		Nakazawa, Yokota, 1977
				1,4		настоящая работа
				0,167		Nakazawa, Yokota, 1977
				0,6		настоящая работа
				3,5		настоящая работа
п-толуат		интактные клетки	1,0		Nakazawa, Yokota, 1977	
			1,0		настоящая работа	
			5,0		Worsey et al., 1978	
ксилен		интактные клетки	1,0		настоящая работа	
катехол-1,2-оксигеназа	бензоат	клеточный экстракт	0,059		Nakazawa, Yokota, 1973	
			0,254			
		интактные клетки	0,1		Williams, Murray, 1974	
			0,120**		настоящая работа	

\* в бесклеточном экстракте - мкмоль/мин/мг белка;

в интактных клетках - мкмоль/мин/мл бактерий (сухого веса)

\*\* бесплазмидный штамм *Ps. putida mt-2 Paw 340 trp str-r.*

Т а б л и ц а 3

Активность катехол-2,3-оксигеназы у местных штаммов  
*Pseudomonas* sp. TOL<sup>+</sup>

№№ п/п	Штаммы бактерий	Индуктор	Активность K230 мкмоль/мин/мг сухого веса бактерий
1.	<i>Pseudomonas</i> sp. TOL-1	м-толуат п-толуат	0,6 0,3
2.	<i>Pseudomonas putida</i> var. TOL-2	м-толуат п-толуат	0,8 0,1
3.	<i>Pseudomonas putida</i> var. TOL-3	м-толуат п-толуат	0,6 0,3
4.	<i>Pseudomonas</i> sp. TOL-4	м-толуат п-толуат	0,8 0,1
5.	<i>Pseudomonas</i> sp. TOL-5	м-толуат п-толуат	0,7 0,3
6.	<i>Pseudomonas</i> sp. TOL-6	п-толуат	0,3
7.	<i>Pseudomonas putida</i> var. TOL-7	п-толуат	0,3
8.	<i>Pseudomonas putida</i> var. TOL-8	п-толуат	0,1

mt-2 Pw85, потерявших TOL -плазмиду, совпадали с литературными данными (табл. 2). При росте бактерий в присутствии индуктора KI20 - бензоата, активность этого фермента определить нетрудно. В случае роста бактерий на толуате индуцируются TOL -плазмидные гены и синтез KI20 заторможен (Williams, Murray, 1974; Worsey, Williams, 1977; Worsey et al., 1978). Это подтвердили и наши опыты со штаммами *P. putida* mt-2 pWFO.

Хотя активность второго TOL -специфического фермента - гидролазы 2-гидроксимуконowego полуальдегида ниже активности K230, и здесь оказалось возможным определить активность этого фермента на уровне интактных клеток (0,02 мкмоль/мин/мг сухого веса бактерий).

Итак, нами были разработаны оптимальные условия определения активности K230 и некоторых других ферментов при индукции их синтеза на уровне интактных клеток.

#### Выводы

I. Разработана методика для определения индукции и активности TOL -плазмидных ферментов на уровне интактных клеток.

2. Активность K230 можно определить уже в микробной суспензии, имеющей оптическую плотность равную при  $\lambda = 560$  нм 0,005.

3. Катехол-2,3-оксигеназа является стабильной в клетках псевдомонад.

## Л и т е р а т у р а

- Adamas, M.H. In: "Bacteriophages", Interscience Publishers Inc., New York, 1959, 445-447.
- Austen, R.A., Dunn, N.W. A comparative study of the NAH and TOL catabolic plasmids in *Pseudomonas putida*. *Austr. J. Biol. Sci.*, 1977, 30, 357-366.
- Bauchop, T., Elsdon, S.R. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, 1960, 23, 457-469.
- Chakrabarty, A.M. Plasmids in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.*, 1976, 10, 7-30.
- Chakrabarty, A.M., Friello, D.A., Bropp, L. M. Transposition of plasmid DNA segments specifying hydrocarbon degradation and their expression in various microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, 75, 3109-3112.
- Duggleby, C.J., Bayley, S.A., Worsey, M.J., Williams, P.A., Broda, P. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 1977, 130, 1274-1280.
- Dunn, N.W., Gunsalus, I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 1973, 114, 974-979.
- Feist, C.F., Hegeman, G.D. Phenol and benzonate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.*, 1969, 100, 869-877.
- Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochem.*, 1972, 48, 422-427.
- Hegemann, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type. *J. Bacteriol.*, 1966, 91, 1140-1154.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.
- Murray, K., Duggleby, C.J., Sala-Trepat, J.M., Williams,  
P.A. The metabolism of benzoate and methylbenzoates  
via the meta-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla*  
mt-2. Eur. J. Biochem., 1972, 28, 301-310.
- Nakazawa, T., Hayashi, E., Yokota, T., Ebina, Y., Nakazawa,  
A. Isolation of TOL and RP4 recombinates by inte-  
grative suppression. J. Bacteriol., 1978, 134, 270-  
277.
- Nakazawa, T., Yokota, T. Benzoate metabolism in *Pseudo-*  
*monas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two  
benzoate pathways. J. Bacteriol., 1973, 115, 262-  
267.
- Nakazawa, T., Yokota, T. Isolation of a mutant TOL  
plasmid with increased activity and transmissibility  
from *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2. J. Bacteriol.,  
1977, 129, 39-46.
- Nozaki, M., Kogamiyama, H., Hayaishi, O. Metapyroca-  
techase. I. Purification, crystallization and some  
properties. Biochem. Z., 1963, 338, 582-590.
- Sala-Trepat, J.M., Murray, K., Williams, P.A. The meta-  
bolic divergence in the meta cleavage of catechols  
by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. Eur. J. Biochem.,  
1972, 28, 347-356.
- Spizizen, J. Transformation of biochemically deficient  
strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1958, 44, 1072-1078.
- Williams, P.A., Murray, K. Metabolism of benzoate and  
the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla)  
mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid.  
J. Bacteriol., 1974, 120, 416-423.
- Williams, P.A., Worsey, M.J. Ubiquity of plasmids in  
coding for toluene and xylene metabolism in soil  
bacteria: evidence for the existence of new TOL  
plasmids. J. Bacteriol., 1976, 125, 818-828.
- Wong, C.L., Dunn, N.W. Transmissible plasmid coding for  
the degradation of benzoate and m-toluate in *Pseudo-*  
*monas arvilla* mt-2. Genet. Res., 1974, 23, 227-232.
- Worsey, M.J., Franklin, F.C.H., Williams, P.A. Regula-

- tion of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.*, 1978, 134, 757-764.
- Worsey, M.J., Williams, P.A. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 1975, 124, 7-13.
- Worsey, M.J., Williams, P.A. Characterization of a spontaneously occurring mutant of the TOL20 plasmid in *Pseudomonas putida* MT20: possible regulatory implications. *J. Bacteriol.*, 1977, 130, 1149-1158.

#### INDUCTION OF CATECHOL-2.3-OXYGENASE SYNTHESIS USING CELL SUSPENSIONS

A.H. Kilk, L.A. Kasak, A.L. Heinaru

#### S u m m a r y

A new method for the study of catechol-2.3-oxygenase (C23O) synthesis using cells suspensions was developed. The optimal conditions for induction, such as ingredients of medium, amount of microelements, concentrations of the substrates and cells in reaction mixture as well as the growth conditions by aeration of the culture were found out. It was possible to detect complete induction of C23O before the division of the main part of cell population. The minimum density of cell suspension for measurement the TOL plasmid specific enzyme activity was 0.005 ( $\lambda = 580 \text{ nm}$ ).

ВЛИЯНИЕ ЭЗОГЕННОГО ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА  
НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ  
У ДЕНИТРИФИКАТОРА *BACTERIUM AGILE* VAR. *HARTLEBII*

Л. Кухлберг, Р. Вязранд

Образование и активность ферментов цикла трикарбонных кислот (ЦТК) у бактерий подчиняется многосторонней регуляции, механизмы которой зависят от типа микроорганизма. Из физиологических факторов, влияющих на образование ферментов ЦТК, наиболее существенными являются характер источников углерода и конечных акцепторов электронов.

У факультативного анаэроба *Escherichia coli* переход клеток от использования малата на усвоение глюкозы сопровождается подавлением синтеза ферментов ЦТК (Gray et al., 1966). Молекулярные механизмы подавления синтеза ферментов ЦТК у факультативных анаэробов глюкозой в настоящее время окончательно не выяснены. У *E. coli* синтез сукцинатдегидрогеназы контролируется внутриклеточным уровнем циклического аденозинмонофосфата (Takahashi, 1975). Представители рода *Bacillus* не содержат циклического АМФ и предполагается, что у них в регуляции синтеза ферментов, подвергающихся катаболитной репрессии, участвуют нуклеотидполифосфаты (Dowds et al., 1978).

У аэробных бактерий из рода *Pseudomonas* ферменты ЦТК являются конститутивными и не подвергаются катаболитной репрессии глюкозой (Tiwary, Campbell, 1969). У псевдомонад ЦТК может функционировать и в анаэробных условиях при денитрификации (Sprangler, Gilmore, 1966).

В настоящей работе мы представляем данные о регуляции образования ферментов цитратного цикла источником углерода и циклическим АМФ у денитрификатора *Bacterium agile* var. *hartlebii*.

## Методы исследования

Культура *Bacterium agile* var. *hartleibii*. В-554 была получена из Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов. Бактерии для опытов выращивали при 28° С в литровых колбах при постоянной аэрации стерильным воздухом. Среда содержала следующие минеральные соли (г/л):  $\text{KNO}_3$  - 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 2,0;  $\text{CaCl}_2$  - 0,1;  $\text{FeCl}_3$  - в следах. Источниками углерода являлись глюкоза или сукцинат в концентрациях 5 г/л (при pH среды 7,4).

Для получения бесклеточных экстрактов клетки бактерии выделяли из питательной среды в середине логарифмической фазы роста культур центрифугированием в холоде при 8000 g и +4° С в течение 20 мин и промывали фосфатным буфером (pH 7,5; 50 mM). Промытые клетки замораживали и разрушали прессом типа Hughes при -35° С. Осколки клеток удаляли центрифугированием в холоде при 18000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость использовали для определения активностей ферментов. Составы реакционных смесей, при составлении которых исходили из общеизвестных методик, приведены в таблице I. Белок определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

В опытах по изучению роли циклического АМФ в образовании ферментов ЦТК бактерии выращивали на вышеуказанной среде с глюкозой. Из культуры в логарифмической фазе роста клетки собирали центрифугированием и промывали питательной средой, не содержащей источника углерода. Суспензию промытых клеток разделили на 5 частей и затем инкубировали в течение 6 часов в минеральной среде со следующими органическими соединениями: 1. Глюкоза - 0,5%; 2. Глюкоза - 0,5% и циклический АМФ - 2,5 mM; 3. Сукцинат - 0,5%; 4. Сукцинат - 0,5% и глюкоза - 0,5%; 5. Глюкоза - 0,5%; сукцинат - 0,5% и циклический АМФ - 2,5 mM. Активности ферментов ЦТК определяли до и после инкубации клеток в указанных средах.

## Результаты и их обсуждение

Активности ферментов цитратного цикла у *Bacterium agile* var. *hartleibii* зависят от источника углерода в питательной среде. В клетках, выращенных на минеральной среде с сукцинатом, активности ферментов ЦТК до 5 раз превышают те же активности клеток, выращенных (на срезе с глюкозой)

Т а б л и ц а I

Составы реакционных смесей для определения активности ферментов  
цитратного цикла. Концентрация выражена в мкмольх/мл, , объем смеси 2,0 мл/

Фермент и № КФ	Состав реакционной смеси (мм)	Определяемое соединение	$\lambda$ (нм)	$\epsilon \lambda^{MM}$
I	2	3	4	5
Аконитат-гидра- таза 4.2.I.3	Фосфатный буфер (рН 7,4; 50), цитрат натрия (30), бесклеточный экстракт (0,4-0,8 мг белка)	цис-аконитат	240	3,54
Сукцинатдегидро- геназа I.3.99.I	Фосфатный буфер (рН 7,6; 100), $K_3Fe(CN)_6$ (0,5), сукцинат натрия (20), KCN(2), ЭДТА (I), бесклеточный экстракт (2-3 мг белка)	$K_3Fe(CN)_6$	420	I,03
Фумарат-гидра- таза 4.2.I.2	Фосфатный буфер (рН 7,3; 100), фумарат натрия (25), бесклеточный экстракт (0,5-I мг белка)	фумарат	300	0,106
Малатдегидроге- наза I.I.I.37	Фосфатный буфер (рН 7,4; 92), L-аспаратат натрия (39), 2-оксоглутарат (I), NADH (0,18), аспаратаминотрансфераза (310 мЕд/мл), бесклеточный экстракт (2-5 мкг белка)	NADH	340	6,3
Оксоглутаратде- гидрогеназный комплекс	Трис-буфер (рН 7,6; 50), 2-оксоглутарат (I), коэнзим А (0,1), $NAD^+$ (2), TPF (0,2), глутатион (3), $MgCl_2$ (I), бесклеточный экстракт (I мг белка)	NADH	340	6,3

(табл. 2). Эти результаты позволяют заключить, что синтез ферментов ЦТК частично подвергается катаболитной репрессии глюкозой. По этому феномену исследованная штамма *Bacterium agile var. hartlebilii* отличается от аэробных бактерий рода *Pseudomonas*, у которых подавления синтеза ферментов ЦТК глюкозой не обнаружено (Tiwary, Campbell, 1969).

Т а б л и ц а 2

Активности ферментов цитратного цикла в бесклеточных экстрактах *Bacterium agile var. hartlebilii* при выращивании на разных источниках углерода и азота  
(в нмолях/мин/мг белка)

Источники углерода и азота	Сукцинат-дегидрогеназа	Фумарат-гидратаза	Аконитат-гидратаза	Малат-дегидрогеназа	Оксоглутаратдегидрогеназа
Сукцинат +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (а)	13,4	394		3694	
Сукцинат +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (б)	26,2±1,5	1225±142	45±5,3	4282	49,2
Глюкоза +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (в)	16,6±1,3	323±154	54±8,9	821±86	7,9
а / б	0,51	0,32		0,86	
б / в	1,6	3,8	0,8	5,2	6,2

У многих факультативных бактерий, катаболизирующих глюкозу путем гликолиза, в регуляции синтеза ферментов, подвергающихся катаболитной репрессии, участвует циклический АМФ.

Как показывают результаты наших опытов (табл. 3), циклический АМФ в концентрации 2,5 мМ при наличии в инкубационной среде сукцината полностью снимает вызванную глюкозой репрессию синтеза ферментов ЦТК. В инкубационной среде, содержащей глюкозу и циклический АМФ, синтез ферментов ЦТК остается репрессированным. Следовательно, для возобновления синтеза ферментов ЦТК у *Bacterium agile var. hartlebilii* требуется одновременно высокий уровень внутриклеточного циклического АМФ и наличие индуктора (сукцината). Аналогичный тип регуляции синтеза бета-галактозидазы и триптофаназы обнаружено у *E. coli* (Perlman, Pastan, 1969), изоцитрат-лиазы у *Pseudomonas MA* (Bellion, Kim, 1978) и *Nocardia salmonicolor* (Westwood, Higgins, 1976) и ряда других ферментов (обзор этих работ см. Rickenberg, 1974 и Pastan, Adhya, 1976).

Т а б л и ц а 3

Активности ферментов цитратного цикла в бесклеточных экстрактах *Bacterium agile var. hartlebii* после адаптации на разных источниках углерода (в % от активности на сукцинате)

Вариант	Сукцинат-дегидрогеназа	Фумарат-гидратаза	Аконитат-гидратаза	Малатдегидрогеназа
Глюкоза	21	55	60	48
Глюкоза + цАМФ	35	85	84	46
Глюкоза + сукцинат + цАМФ	108	116	140	91
Глюкоза + сукцинат	47	79	94	81
Сукцинат	100	100	100	100

Регуляция синтеза ферментов ЦТК у *Bacterium agile var. hartlebii* по-видимому, более сложная, чем у вышеуказанных ферментов. В данном случае глюкоза вызывает только частичную репрессию образования ферментов ЦТК и цикл продолжает функционировать в клетках, растущих на среде с глюкозой. Кроме того, источники углерода (глюкоза, сукцинат) не являются единственными факторами, влияющими на образование ферментов ЦТК. Замена в питательной среде нитрата на аммиак ведет к 2-3-кратному уменьшению активности ферментов ЦТК (табл. 2). Следовательно, увеличение энергетических потребностей клеток в связи с восстановлением нитрата вызывает дополнительную активацию синтеза ферментов ЦТК.

Взаимосвязь между энергетическими и анаболическими потребностями клеток, с одной стороны, и активностями ферментов, с другой - установлено у *E. coli* и *B. subtilis* (Gray et al., 1966; Tanaka, Hanson, 1975).

Участвует ли в этом процессе циклический АМФ - не известно. Возможно, что в регуляции синтеза ферментов ЦТК у *Bacterium agile var. hartlebii* участвует несколько автономных механизмов и опосредованная циклическим АМФ катаболитная репрессия является одним из них.

### Заклучение

Образование ферментов ЦТК в *Bacterium agile* var. *hartleyi* регулируется источниками углерода и азота. Синтез ферментов ЦТК частично подавляется при роста на среде с глюкозой и активируется на среде с сукцинатом, а также при переходе клеток от использования аммиака на использование нитрата. Циклический АМФ опосредует вызванную глюкозой репрессию синтеза ферментов ЦТК.

### Л и т е р а т у р а

- Bellion, E., Kim, Y.S. Catabolite repression of isocitrate lyase in methylamine-grown *Pseudomonas MA*. Effect of carbon and nitrogen sources. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 541, 425-434.
- Woods, B., Baxter, L., McKillen, M. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 541, 18-34.
- Gray, C.T., Wimpenny, J.W.T., Mossman, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the function of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 117, 33-41.
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- Pastan, I., Adhya, S. Cyclic adenosine 5-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, 1976, 40, 527-551.
- Perlman, R.L., Pastan, I. Cyclic 3'5'-AMP: stimulation of  $\beta$ -galactosidase and tryptophanase induction in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 30, 656-664.
- Rickenberg, H.V. Cyclic AMP in prokaryotes. *Ann Rev. Microbiol.*, 1974, 28, 353-369.
- Spangler, W.J., Gilmour, C.M. Biochemistry of nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri*. I. Aerobic and nitrate respiration routes of carbohydrate catabolism. *J. Bacteriol.*, 1966, 91, 245-250.

- Tiwary, N.P., Campbell, J.J.R. Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 192, 395-401.
- Rakahashi, I. Effect of glucose and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate on the synthesis of succinate dehydrogenase and isocitrate lyase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 1975, 122, 215-223.
- Tanaka, N., Hanson, R.S. Regulation of the tricarboxylic acid cycle in gram-positive, facultatively anaerobic bacilli. *J. Bacteriol.*, 1975, 122, 215-223.
- Westwood, A.W., Higgins, I.J. The effect of cyclic AMP on catabolite repression of isocitrate lyase in *Nocardia salmonicolor* (NCIB 9701). *J. Gen. Microbiol.* 1976, 97, 133-135.

THE INFLUENCE OF CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE  
ON THE FORMATION OF THE TRICARBOXYLIC ACID ENZYMES  
IN A DENITRIFYING BACTERIUM *BACTERIUM AGILE*  
VAR. *HARTLEBII*

L.A. Kuhlberg, R.E. Vääränd

S u m m a r y

The dependence of the tricarboxylic acid (TCA) cycle enzyme activities in *Bacterium agile* var. *hartlebil* B-554 on the carbon source and nitrogen source was investigated. The synthesis of the TCA cycle enzymes was partly inhibited during growth of bacteria in glucose medium and activated while growing on succinate. The activities of the TCA cycle enzymes in the cells grown in the presence of nitrate were higher than in the cells grown with addition of ammonia. The catabolite repression caused by glucose in totally reversed by cyclic AMP in the presence of succinate as inducer. It is supposed that cyclic AMP-mediated catabolite repression is involved in the regulation of the synthesis of the TCA cycle enzymes.

## ЯВЛЕНИЕ АУТОФАГОЦИТОЗА ПРИ ПЕРЕВОДЕ КЛЕТОК В ТКАНЕВУЮ КУЛЬТУРУ

Ю.К. Кярнер

При разработке разных вопросов клеточной биологии нами использованы эмбриональные фибробласты курицы первичной тканевой культуры в латентной фазе развития (Кярнер, 1966а, б, 1971; Вейдебаум, Кярнер, 1973, 1978; и др.). Каким образом культивируемые клетки различаются от исходных - этот вопрос на самых различных уровнях при применении метода тканевых культур остается актуальным до последнего времени. Перевод клеток из организма в культуру, несомненно, оказывает на клетки сильное травматизирующее действие. Для оценки степени такого воздействия мы изучали явление аутофагоцитоза, которое обычно рассматривают как сублетальную реакцию клеток на разные повреждающие факторы (de Duve, Wattiaux, 1966; Deter et al., 1967).

### Материал и методика

Были изучены фибробласты подкожной соединительной ткани 9-суточных куриных эмбрионов до и после трипсинизации и последующей культивации. Трипсинизации подвергались мелкие кусочки ткани размерами не более  $1 \text{ мм}^2$ . Трипсин применялся в концентрации 0,25% в изотоническом растворе, содержащем глюкозу, калий и натрий. pH рабочего раствора было около 7,4-7,6. Трипсинизация проводилась на магнитной мешалке и клетки удаляли через каждые 10 минут. Раствор трипсина с клетками охлаждали на льду и центрифугировали со скоростью до 1000 об/мин. Затем заливали надосадочную жидкость и клетки суспендировали снова, выливали надосадочную жидкость и клетки суспендировали в питательной среде для фибробластов (Puck et al., 1956). Культуры выращивали на кусочках покровных стекол во флаконах из-под пеницилина. Как покровные стекла, так и флаконы были обработаны по прописи Родс и соавторов (1957).

Кусочки подкожной соединительной ткани, а также клетки после трипсинизации и во второй день после посева фиксировали последовательно в 2,5%-ном глутаральдегиде и 1%-ном тетраоксида осмия забуференными с 0,1 М каходилатом натрия и

заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы изготовляли на ультратоме ЛКБ-8800, контрастировали уранилом ацетата и цитратом свинца (Reynolds, 1963) и изучали под электронными микроскопами УЭМБ-100В и ЭВМ-100ЛМ.

### Результаты исследований

Фибробласты подкожной соединительной ткани характеризуются множеством рибосом, которые в виде полисом располагаются в относительно плотной основной цитоплазме (в цитозоле), или прикреплены к мембранам эндоплазматической сети (рис. 1, 2, 3). Микротрубочки являются обычным компонентом зоны Гольджи (рис. 1 и 3), а микрофиламенты собираются в пучки под плазматической мембраной (рис. 2). Цистерны шероховатой эндоплазматической сети имеют продолговатую форму преимущественно с узким просветом, который наполнен умеренно плотным мелкозернистым веществом. Более круглые расширения цистерн со светлым содержимым обнаруживаются лишь местами. Комплекс Гольджи вокруг центриолей состоит из отдельных диктиосом (рис. 1, 3). Последние содержат 4-5 своего рода уплощенных мешочков, которые окружены как гладкими, так и окаймленными пузырьками. В единичных клетках вблизи диктиосом встречаются аутофагосомы, окруженные двумя мембранами и содержащие участки интактной цитоплазмы (рис. 3). Вакуоли с глыбками электронноплотного материала обнаруживаются в большем количестве (рис. 1, 3). Митохондрии обладают плотным матриксом и немногочисленными беспорядочно расположенными перегородками. Единичные капли жира разбросаны в цитоплазме без особой закономерности. Все фибробласты тесно связаны с коллагеновыми волокнами.

Сразу после трипсинизации и последующего центрифугирования в клетках обнаруживаются незначительные изменения. Как правило, основная цитоплазма, матрикс митохондрий и содержимое цистерн эндоплазматической сети сохраняют свою плотность (рис. 4, 5, 6). Частичное набухание обнаруживается лишь в единичных митохондриях. Цистерны шероховатой эндоплазматической сети узкие и длинные. Хотя в этом отношении морфологические измерения не проводились, их количество по сравнению с интактной тканью оказывается повышенным. Местами цистерны образуют округлые плотные вздутия. Часть мешочков в диктиосомах комплекса Гольджи расширена. Микротрубочки и -филаменты сохранены в цитоплазме после описанной обработки. Чаще

встречаются структуры лизосомального ряда. Они представляют-ся в виде светлых вакуолей, которые содержат фрагменты цистерн шероховатой эндоплазматической сети, мелкие пузырьки и скопления электронноплотного материала (рис. 4, 5, 6). Диссоциация вызывает местами образование на поверхности клеток коротких округлых выростов, часть которых, по-видимому, отрывается (рис. 6). Такие выросты содержат множество рибосом, которые после изоляции выроста наблюдаются только в виде микросом. Между диссоциированными клетками располагаются коллагеновые волокна и мембранный дебрис.

Клетки, прикрепленные к стеклу, на второй день после посева обладают уже заметными особенностями (рис. 7, 8). Основная цитоплазма менее плотная и количество рибосом в ней уменьшено. Микротрубочки встречаются гораздо реже. Зато микрофиламенты наблюдаются как слоем под плазматической мембраны, так и в виде сеточки в остальной цитоплазме. Цистерны шероховатой эндоплазматической сети имеют неравномерные очертания и часто переходят в ряды пузырьков. Плотность интрацистернальной полости уменьшена. Мешочки в диктиосомах короткие и располагаются более рыхло (рис. 7). Количество мелких пузырьков увеличено. Матрикс митохондрий светлый. Следует отметить многочисленность лизосом (см. Кярнер, 1976). Их матрикс варьирует в больших пределах и бывает как светлым (рис. 8), так и электронноплотным (рис. 7, 8). Разные мембраны, в частности мелкие пузырьки в матриксе лизосом, указывают на их связь с аутофагоцитозом. Аутофагосомы с более интактным содержимым локализуются вблизи комплекса Гольджи.

### Обсуждение

Н.Г. Хлопиным (1946) показано, что первичные кусочковые эксплантаты представляют собой дифференцирующиеся тканевые системы, в которых ткани сохраняют свои гистобластические потенции. То же самое относится и к трипсинизированным первичным тканевым культурам (Михайлов, 1959; Пильдвер, 1963; и др.). Легко подвергаются культивированию незрелые эмбриональные ткани, где процент камбиальных элементов относительно высокий и многие клетки еще далеки от своей терминальной дифференциации. Как показывают наши неопубликованные данные, большинство из прикрепленных и распластанных на стекле клеток интенсивно включает радиотимидин. Цитологические особен-

ности при переводе клеток в культуру можно трактовать исходя из двух позиций: культивирование как активация к пролиферации и культивирование как повреждение.

Одним индуктором деления следует считать обработку клеток трипсином (Noonan, Burger, 1973). Однако давно известно, что самым главным фактором пролиферации является сыворотка в составе питательной среды. Вообще предполагают, что клетки в организме выполняют разные функции лишь при соответствующей стимуляции (Амос, 1967), что именно сыворотка содержит различные системы контроля лежащих в основе плейотипической активации клеток (Frelin, 1978), в том числе их пролиферации (Mongomery, Tilles, 1971; Oey et al., 1974; Armelin, Armelin, 1978). Такой процесс активации при наличии сыворотки приносит с собой интенсивное накопление лизосомоподобных структур (Gropp, 1960; Flaxman, Mulnard, 1961; Кярнер, 1963).

Функция лизосом, в частности в форме аутофагии, тесно связана с поддержанием клеточного "здоровья" (de Duve, 1969). Правильность такого рассуждения подтверждают следующие примеры: сегрегация потенциально токсических материалов, удаление поврежденных компонентов клетки и реутилизации последних путем их переваривания.

Аутофагоцитоз наблюдается при самых различных повреждающих факторах (de Duve, Wattiaux, 1966), в том числе при избытке некоторых витаминов и гормонов (Ashford, Porter, 1962; Deter, de Duve, 1967). Трипсинизация вызывает глубокие превращения клеточной поверхности (Overton, 1968) и сама индуцирует увеличение количества лизосом (Friedman et al., 1969). А сыворотка может быть источником избыточных биологически активных веществ и тоже способствует образованию лизосом и это без ожидаемой интенсификации эндоцитоза (Flaxman, Mulnard, 1961). Итак, оба вышеописанные стимуляторы деления являются одновременно повреждающими агентами.

Многочисленность лизосом и их крупные размеры свидетельствуют уже о хроническом характере повреждения клеток в тканевой культуре (Buckley, 1973). Причины такого повреждения можно найти во многих условиях культивирования, которые не соответствуют требованиям культивируемых клеток. До сих пор мы не умеем учитывать питательные надобности всех клеток (Waymouth, 1967). То же относится к концентрации водородных ионов. Так, показано (Lie Sverre et al., 1973), что фиоро-  
бласти человека имеют в культуре нормальный вид только при

pH 6.8, а при pH 7.7 (что гораздо ближе к общепринятым нормам) в них наблюдается интенсивный аутофагоцитоз. Несоответствие предполагает и в осмотическом давлении среды, что оказывает влияние как увеличение размеров лизосом (Buckley, 1973), так и везикуляцию диктиосом (Menefee, Evans, 1960). Изучение влияния парциального давления кислорода на пролиферацию клеток выявило, что прирост эмбриональных фибробластов был в 10 раз выше при 5% кислорода, по сравнению с обычным культивированием при 18% кислорода в воздухе (Bradley et al., 1978). Свой отпечаток на морфологию клеток в культуре, несомненно, оказывает и распластывание на твердый субстрат, что вызывает и искажения в клеточном скелете (Van Peteghem, Mageel, 1978).

Итак, перечисленные факторы показывают, что в настоящее время условия тканевых культур оказываются для клеток часто экстремальными. А в таких условиях реутилизация клеточных компонентов после их переваривания в лизосомах приобретает особое значение. В связи с этим нельзя оставлять без внимания и очевидное отрывание клеточных выростов, которое называют клазматозом (более подробно см. Поликар, Бесси, 1970). Эти же авторы считают клазматоз тоже чрезвычайно важным процессом для повторного использования фрагментов клетки. Рассматриваемое явление весьма любопытно и в том отношении, что клетки способны отторгать часть белок-синтезирующего аппарата (Pfeifer, Guder, 1975) и тем самым часть плазматической мембраны. Во всяком случае это обстоятельство следует исследовать более подробно.

Из вышеизложенного вытекает, что перевод клеток в тканевую культуру связан с глубокими перестройками их морфологии и метаболизма. Тем более удивительно то, что "строгая специфичность тканей" как "эмпирическая закономерность" (Михайлов, 1967) остается в силе и в таких экстремальных условиях.

#### Выводы

Диссоциация трипсином подкожной соединительной ткани 9-суточных куриных эмбрионов вызывает в цитоплазме фибробластов следующие изменения: увеличение количества аутолизосом, расширение мешочков комплекса Гольджи и местами клазматоз богатых рибосомами выростов. Прикрепленные и распластанные на стекле фибробласты характеризуются малой плотностью основной цитоплазмы, везикуляцией комплекса Гольджи, отсут-

ствием микротрубочек и обилием лизосом. Обсуждается роль условий диссоциации и последующей культивации у активации и повреждении клеток.

### Л и т е р а т у р а

- Вейдебаум Т., Кярнер Д.К. Влияние колхицина на ультраструктуру фибробластов куриных эмбрионов в тканевой культуре. Изв. АН Эст. ССР, 1973, 22, В3, 269-273.
- Вейдебаум Т.И., Кярнер Д.К. Изменение эндомембранной системы и митохондрий в культивируемых куриных фибробластах при действии колхицина и после его удаления. Морфометрический анализ. - Цитология, 1978, 20, 1216-1220.
- Кярнер Д.К. О светомикроскопической организации цитоплазмы в однослойных тканевых культурах. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1963, вып. 143. Труды по медицине УШ, 320-325.
- Кярнер Д.К. О лизосомах и витальном окрашивании фибробластов в первичных тканевых культурах. Арх. анат., 1966а, 53, 60-66.
- Кярнер Д.К. Цитологические особенности первичных тканевых культур. Труды по тканевой биол. I, - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та. 1966б, вып. 189, 4-15.
- Кярнер Д.К. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трипсинозированной тканевой культуре. - Цитология, 1971, 13, 1204-1210.
- Кярнер Д.К. Морфология лизосом в культивированных фибробластах эмбрионов курицы. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 64-73.
- Михайлов В.П. Проявление тканевой детерминации в культурах из трипсинозированных тканей. Тез. докл. научн. конф. по проблеме детерминации и пластичности тканей, посвящ. памяти акад. А.А. Заварзина. Л., 1959, 72-73.
- Михайлов В.П. Биология тканей. - В кн.: Эволюционно-морфологические и физиологические основы развития советской медицины. Л., "Медицина", 1967, 69-89.

- Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки. М., Мир, 1970.
- Пыльдвере К.И. О росте и превращении так называемой "кожно-мышечной ткани" в однослойной трипсинизированной культуре. Арх. анат., 1963, 45, 20-28.
- Родс В., Буд У., Дункан Д. Современное состояние лабораторных вирусологических исследований в диагностике полиомиелита с особым упоминанием метода тканевых культур. - В сб.: Полиомиелит, М., Медгиз, 1957, 201-224.
- Хлопин Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Изд. АН СССР, Л., 1946.
- Amos, H. Evidence for a "governor" on protein synthesis in animal cells: positive signals in serum. Nat. Cancer Inst. Monogr., 1967, 26, 23-48.
- Armelin, H.A., Armelin, M.C.S. Resting-proliferative transition in cultured mammalian cells. Nat. Cancer Inst. Monogr., 1978, 48, 81-84.
- Ashford, T.P., Porter, K. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. J. Cell Biol., 1962, 12, 198-202.
- Bradley, T.R., Hodgson, G.S., Rosendaal, M. The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. J. Cell Physiol., 1978, 97, 517-522.
- Buckley, I.K. The lysosomes of cultured chick embryo cells. A correlated light and electron microscopic study. Lab. Invest., 1973, 29, 411-421.
- de Duve, C. The lysosome in retrospect. In: Lysosomes in Biol. and Path., ed. by Dingle, J.T., Fell, H.B., North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London, 1969, 1, 3-40.
- de Duve, C., Wattiaux, R. Functions of lysosomes. Ann. Rev. Physiol., 1966, 28, 435-492.
- Deter, R.L., Baudhuin, P., de Duve, Ch. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. J. Cell Biol., 1967, 35, C11-C16.
- Deter, R.L., de Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy: on some physical properties of rat liver lysosomes. J. Cell Biol., 1967, 33, 437-449.

- Flaxman, A., Mulnard, J. A cytological and cytochemical approach to the problem of the nature and origin of the metagranules in chick cells cultivated in vitro. Arch. Biol. (Belg.), 1961, 72, 573-606.
- Frelin, Chr. The growth of heart cells in culture. Evidence for a multiple activation of the pleiotypic program. Biochimie, 1978, 60, 627-638.
- Friedman, I., Laufer, A., Davies, A.M. Studies on lysosomes in rat heart cell cultures. I. The effect of lysosomal labilizers. Brit. J. Exp. Pathol., 1969, 50, 213-218.
- Gropp, A. Untersuchungen an Zellen in der Gewebekultur als Beitrag zu Fragen der Stoffaufnahme. Verh. Deutschen Ges. Pathol., 1960, 44, 220-225.
- Lie Sverre, O., Schofield, B.H., Taylor, H. A., Jr., Doty, S.B. Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: dependence on medium pH. Pediat. Res., 1973, 7, 13-19.
- Menefee, M., Evans, V.J. Structural differences produced in mammalian cells by changes in their environment. J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 1303-1323.
- Montgomery, B.D., Tilles, J.G. Morphology and function of cells of human embryonic liver in monolayer culture. J. Cell Biol., 1971, 50, 222-231.
- Noonan, K.D., Burger, M.M. Induction on 3T3 division at the monolayer stage. Exp. Cell Res., 1973, 80, 405-414.
- Oey, J., Vogel, A., Pollack, R. Intracellular cyclic AMP concentration responds specifically to growth regulation by serum. Proc. Nat. Acad. Sciences U.S.A., 1974, 71, 694-698.
- Overton, J. The fate of desmosomes in trypsinized tissue. J. Exp. Zool., 1968, 168, 203-214.
- Pfeifer, U., Guder, W.G. Stimulation of cellular autophagy by parathyroid hormone and cyclic adenosine 3', 5': monophosphate in isolated tubular fragments from the rat's kidney cortex. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath., 1975, 19, 51-67.
- Puck, T.T., Marcus, P.I., Cieciura, S.J. Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer. J. Exp. Med., 1956, 103, 273-282.

- Reynolds, E.S. The use of lead citrate as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 208-212.
- Van Peteghem, M.C., Mareel, M.M. Alterations in shape surface structure and cytoskeleton of HeLa cells during monolayer culture. *Arch. biol. (Belg.)*, 1978, 89, 67-87.
- Waymouth, Ch. Somatic cells in vitro: their relationship to progenitive cells and to artificial milieux. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 1967, 26, 1-21.

OBSERVATION ON AUTOPHAGOCYTOSIS PRODUCED BY  
TISSUE CULTURING TECHNIQUE

J.K. Kärner

S u m m a r y

Chick embryonic fibroblasts dissociated by trypsin show an increase in the number of autophagic vacuoles, dilatation of saccules of the Golgi complex and locally reveal shedding of ribosome-filled blebs. On the second day after seeding the cells have a low density cytoplasm and vesicular Golgi complex. Microtubules are not visible any more. The most striking aspect of cultured fibroblasts is a high number of lysosomes. They contain membranous debris and obviously arise by autophagocytosis. The role of culturing conditions in stimulation for division as well as in damaging is discussed.

## ИЗУЧЕНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

А. Пийрсоо

Под влиянием стромы кроветворного органа стволовая кроветворная клетка дифференцируется в коммитированные клетки-предшественники одной из возможных линий дифференцировки (Wolf, Trentin, 1968). Однако вопросы о клеточном составе стромы кроветворных органов и гистогенетических связях между разными типами стромальных клеток остаются окончательно невыясненными и требуют еще всестороннего экспериментального изучения. С использованием методов тканевой культуры, световой и электронной микроскопии нами изучались рост и дифференцировка разных стромальных клеток селезенки эмбрионов и новорожденных (до 2-дневного возраста) мышей. Работа выполнена на кафедре генетики и цитологии и в лаборатории генетики и молекулярной цитологии НИИ Общей и молекулярной патологии ТГУ.

### Материал и методика

Материалом исследования служили тканевые культуры кусочковых эксплантатов селезенки. Эксплантаты выращивали как на покровных стеклах, так и на мембранных фильтрах (Synpor № 8) в лежащих флаконах из-под пенициллина. Длительность культивирования эксплантатов была до I месяца.

Обзорные препараты окрашивали гематоксилин-эозином, тионином и азур-П-эозином. Клеточные границы серебрили по методике Ранвье. Для электронномикроскопического изучения культуры фиксировали отдельно в 2,5%-ном глутаровом альдегиде и 1%-ном растворе четырехоксида осмия, забуференном какодилатом натрия. Материал заливали в эпон-812. Полутонкие срезы окрашивали полихромно метиленовым синим - азур-П-эозином и фуксином по методу Humphrey, Pittmann (1974). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме ЛКБ-8800 и окрашивали ацетатом уранила и цитратом свинца по Reynolds (1963). Препараты просматривали в микроскопе УЭМБ-100В.

## Результаты

В зоне роста культуры эмбриональной селезенки новорожденных мышей отмечается 3 типа роста стромальных клеток: фибробластический - характерен для фибробластоподобных клеток - фибробластов, ретикулярных клеток и эндотелиальных клеток, растущих в виде тяжей и трабекул; эпителиальный - характерен для эндотелия и мезотелия; макрофагальный - характерен для распластанных высокодифференцированных макрофагов. Зоны соответствующих типов клеток расположены более или менее отдельно друг от друга, в разных участках зоны роста. Изучение эксплантатов на полутонких срезах показывает, что после первичных изменений в начале культивирования (миграция и дегенерация клеток), клеточный состав эксплантата стабилизируется и состоит, в основном, из 5 типов стромальных клеток: фибробластов, ретикулярных клеток, 2 типа эндотелиальных клеток и макрофагов. Реже центральный эксплантат покрыт мезотелиальными клетками.

Ф и б р о б л а с т ы не отличаются от типичных коллаген-продуцирующих соединительнотканых фибробластов. Фибробласты (рис. 1) имеют одно овальное ядро, в котором обычно располагается крупное ядрышко. Хроматин локализуется равномерно по всей кариоплазме. Лишь возле ядерной оболочки отмечается небольшое уплотнение хроматина. В культуре фибробласты характеризуются светлой цитоплазмой в отличие от сильной базофильности фибробластов интактной селезенки. В цитоплазме фибробластов располагается большое количество свободных рибосом и полисом, а также расширенные цистерны гранулярной цитоплазматической сети. Импрегнация аргирофильных волокон по Карупу, полихромное окрашивание полутонких срезов и электронномикроскопическое исследование показывают, что эти клетки окружены соединительноткаными фибриллами и волокнами. В ходе культивирования увеличивается количество межклеточного материала.

Рост фибробластов в культуре происходит в основном за счет менее дифференцированных фибробластов.

Р е т и к у л я р н ы е клетки не окружены соединительноткаными фибриллами и волокнами и они похожи на мезенхимные клетки эмбриональной селезенки, описанные в работах Zamboni, Weistin, 1964 и Weiss, 1976. Ретикулярные клетки (рис. 2) тесно соприкасаются своими плазматическими

мембранами. В светлой цитоплазме ретикулярных клеток располагается относительно небольшое количество рибосом и полисом. В широкой околоядерной зоне пластинчатого комплекса располагается несколько диктиосом и окружающие их большое число микропузырьков, большинство из которых окаймленные.

Типичные мононуклеарные фагоциты или макрофаги (рис. 3) распластываются на свободной поверхности субстрата. В отдельных случаях распластывание происходит и на поверхности зоны роста фибробластоподобных клеток. Эти высокодифференцированные макрофаги растут в культуре разобщенно и лишь изредка наблюдается межклеточные контакты. В цитоплазме макрофагов четко выявляется эндо- и эктоплазма. Эти клетки наблюдаются и внутри центрального эксплантата.

Среди изученных макрофагов всегда встречаются и многоядерные гигантские клетки или симпласты, количество ядер в которых колеблется в очень больших пределах. Типичные высокодифференцированные мононуклеарные фагоциты характеризуются прежде всего выраженным лизосомальным аппаратом, который состоит из первичных лизосом, ауто- и гетерофагосом, остаточных телец, многопузырчатых телец и миелиновых фигур (рис. 4). Количество фагосом увеличивается в ходе культивирования.

Среди высокодифференцированных фагоцитов встречаются клетки, которые заполнены большими (до 1-2 мкм) азурофильными дегенерирующими эритроцитами и их обломками (рис. 5).

Мононуклеарные фагоциты с электронноплотными гранулами (рис. 6) отличаются от типичных высокодифференцированных макрофагов тем, что у них основными лизосомальными структурами являются плотные тельца, а типичные фагосомы с гетерогенным содержанием почти отсутствуют. Характерным признаком этих клеток является и наличие обширного пластинчатого комплекса (рис. 7), где иногда даже в одном срезе видны 6-8 диктиосом. Вокруг диктиосом наблюдается большое количество мелких пузырьков (50-100 А) разного типа: окаймленные, светлые, электронноплотные.

В ходе культивирования во многих плотных тельцах происходит образование миелиновых фигур (рис. 8). Важно отметить, что дифференцирующиеся нейтрофильные гранулоциты имеют неслучайные контакты с этими мононуклеарными фагоцитами.

Эндотелиальные клетки (рис. 9, 10)

растут в зоне роста культуры как эпителиоморфно (на свободной поверхности стекла), так и в виде тяжей и трабекул (на подслое фибробластоподобных клеток). В эксплантате после исчезновения гистотипической структуры эндотелиальные клетки синусов невозможно отличить от окружающих фибробластоподобных клеток. Эндотелиальные клетки артериол теряют свою полярность и материал базальной мембраны окружает клетки со всех сторон (рис. 11).

Мезотелиальные клетки органически не входят в состав стромы селезенки, их исследование оправдано тем, что они являются постоянными компонентами многих культур, так как в составе эксплантата часто остаются мезотелиальные клетки, окружающие капсулу селезенки. Мезотелиальные клетки растут также эпителиоморфно, но в зоне их роста всегда наблюдаются и гетероморфные разрастания и группы нераспластанных клеток, которые характерны только для мезотелия (рис. 12).

### Обсуждение

Клетки лимфоидных и кроветворных тканей и крови были одними из первых, которые изучались в внеорганизменных условиях (Carrel, Burrows, 1910). Но в морфологической идентификации клеток кроветворной ткани как *in vivo* так и *in vitro* существуют разногласия и в настоящее время (Старостин и Мичурин, 1977). С целью получения новых детальных сведений о морфо-физиологии стромальных клеток кроветворных органов предпринята и настоящая работа.

Изучение стромальных клеток селезенки эмбрионов и новорожденных мышей на использованной нами экспериментальной модели показывает, что в условиях тканевых культур происходит специфическая дифференцировка разных типов стромальных клеток. Образующиеся зоны разных стромальных клеток вокруг эксплантата изолированы друг от друга, т.е. обычно эти зоны являются более или менее чистыми зонами одного клеточного типа. Центральный эксплантат мы можем рассматривать как органную культуру, где в начале культивирования происходит упрощение клеточного состава из-за дегенерации и миграции многих клеток, а позже клеточный состав стабилизируется.

Фибробластоподобные клетки в изученной культуре представлены настоящими фибробластами, окруженными межклеточными фибриллами или (и) настоящими коллагеновыми волокнами и ре-

тикулярными клетками, вокруг которых межклеточный материал отсутствует. В литературе термин "ретикулярная клетка" ("ретикулозная клетка") настолько запутан, что при пользовании им необходимо всякий раз указывать характерные признаки названных клеток. Мы пользовались им именно в отношении тесно расположенных фибробластоподобных клеток, которые не окружены межклеточными фибриллами и волокнами и тем самым строго отличаются от типичных фибробластов.

Происхождение и гистогенетические связи этих двух типов фибробластоподобных клеток окончательно не выяснены. Предполагаем, что увеличение количества этих клеток происходит за счет менее дифференцированных клеток данного типа, имеющих в исходном материале (Пийрсоо, 1979). Характерные для селезенки электронноплотные фибробласты (Баранов, 1974; Пийрсоо, 1979) в виду высокой специализации нежизнеспособны в условиях тканевых культур. В изученных культурах нам не удалось идентифицировать дендритные ретикулярные клетки, которые и по данным Steinman et al., 1974 отсутствуют у новорожденных мышей.

Мононуклеарные фагоциты или макрофаги охарактеризованы во всех работах о культивировании кровяных и лимфоидных тканей. Анализируя литературные и собственные данные, можно уверенно сказать, что "блуждающие клетки" (wandering cells) в работе Lewis, Webster (1921), "ретикулярные полибласты" (reticular cell polyblast) в работе Максимова (1916), ретикулярные клетки III типа в работе Hiraki et al. (1965) и т.д. соответствуют истинным мононуклеарным фагоцитам.

На свободной поверхности стекла высокодифференцированные макрофаги растут разобщенно. Причиной изолированного роста клеток является наличие подвижных ундулирующих мембран, которые препятствуют контактированию клеток (Bergan, Stalberg, 1966), и отрицательные заряды клеточных мембран (Skutelsky, Danon, 1969). Выраженный лизосомальный аппарат со всеми типами лизосом является характерным для всех зрелых мононуклеарных фагоцитов. Типичные мононуклеарные фагоциты в культуре происходят как из высокодифференцированных клеток исходного материала, так и путем созревания макрофагов в культуре. Созревание макрофагов в культуре можно сравнить с процессом активации макрофагов (Rhodes, 1975; Mørland, Kaplan, 1977). Но важно отметить, что большое количество клеток мононуклеарных фагоцитов не достигает зрелости и в культуре клетки данного ряда дифференцировки сохраняются в стадиях монобластов-промоноцитов.

Значительный интерес представляют нетипичные макрофаги, в которых образуются азурофильные электронноплотные гранулы, но в цитоплазме которых отсутствуют фагосомы. По ультраструктуре эти гранулы можно включить в систему лизосом под названием плотные тельца (Кярнер, 1976). Морфологически сходные клетки охарактеризованы в работах Scott (1967), Wisse et al., (1976).

Предполагаем, что образование наблюдаемых электронноплотных гранул в этих клетках связано со специфической дифференцировкой в условиях тканевых культур определенного типа клеток стромы, так называемых интердигитирующих ретикулярных клеток, неоднократно описанных в селезенке Pictet et al., 1969; Veerhman, 1974). По литературным данным вышеназванные клетки относятся к системе мононуклеарных фагоцитов (van Bwijk et al., 1974; Veerhman, van Bwijk, 1975). Наличие двух разных типов макрофагов как в интактной селезенке (Пийрсоо, 1979), так и в культуре позволяет предположить, что в селезенке имеется 2 популяции мононуклеарных фагоцитов. Гистогенетическая связь между этими клетками требует специального изучения.

Обнаруженные два разных типа роста эндотелиальных клеток в изученных культурах селезенки (в виде тяжей - трабекул и эпителиоморфно) позволяют предположить, что отмеченные в интактной селезенке различия между эндотелиальными клетками синусов и артериол сохраняются и в культуре. Это еще раз подтверждает положение Н.Г. Хлопина (1946), что эндотелий "проявляет себя как очень своеобразный в отношении своих биологических и гистологических свойств детерминированный тканевый тип". В настоящее время имеются прямые данные, указывающие на способность синтеза эндотелиальными клетками коллагенового материала (Gospodarowicz et al., 1977; Levene, Newlor, 1977) в культуре. По нашим данным коллагеновый материал базальной мембраны не только сохраняется, но и увеличивается. В эксплантате эти клетки теряют полярность и окружены материалом базальной мембраны.

Образующиеся разрастания мезотелиальных клеток в зоне роста очень похожи на реактивные разрастания мезотелия в опытах *in vivo* (Сапожникова, 1975).

## Л и т е р а т у р а

- Баранов В.Н. Современные представления о тонкой структуре селезенки. Архив анат., 1974, 67, 91-100.
- Кярнер Ю. Морфология лизосом в культивированных фибробластах эмбрионов курицы. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, вып. 383. Труды по генетике и цитологии I, 64-73.
- Максимов А.А. О культивировании *in vitro* соединительной ткани взрослых млекопитающих. Русск. арх.анат. гист. и эмбриол., 1916, I, 115-182.
- Пийрсоо А. Клеточный состав селезенки эмбрионов и новорожденных животных. - Уч. зап. Тартуского гос.ун-та, 1979, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 59-78.
- Сапожникова Л.Р. Реактивные разрастания мезотелия париетального листка брюшины. Архив анат., 1975, 48, 66-70.
- Старостин В.И., Мицурина Т.В. Строма кроветворных органов и ее взаимодействие со стволовой кроветворной клеткой. Морфология человека и животных. Антропология. Итоги науки и техники, ВИНТИ, М., 1977, 7, 59-110.
- Хлопин Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Л., 1946.
- Berman, L., Steelberg, C. Primary cultures of macrophages from normal human peripheral blood. Lab. Investig., 1966, 11, 1322-1331.
- Carrel, A., Burrows, M. Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. of Am. med. assoc., 1910, 55, 1379-1394.
- Gospodarowicz, D., Mescher, A.L., Birdwell, C.R. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation *in vitro* by fibroblast and epidermal growth factors. Exp. Eye Res., 1977, 25, 75-89.
- Hiraki, K., Kitajima, K., Kibata, M., Kotsuka, T. Studies on splenic reticulum cells by tissue culture. Reticuloend. System Soc. premot. Sci., Tokyo, 1965, 33-40.
- Humphrey, C.D., Pittmann, E.F. A simple methylene blue-

- azure II basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.*, 1974, 49, 9-14.
- Levene, C.I., Heslop, J. Synthesis of collagen by cultured pig aortic endothelium and its possible role in pathogenesis of fibrous atherosclerotic plaque. *J. of Mol. Med.*, 1977, 2, 145-152.
- Lewis, W.H., Webster, R.T. Wandering cells, endothelial cells and fibroblasts in cultures from human nodes. *J. Exp. Med.*, 1921, 34, 397-405.
- Morland, B., Kaplan, G. Macrophage activation in vivo and in vitro. *Expl. Cell Res.*, 1977, 108, 279-288
- Pictet, J., Orci, L., Fossmann, W.G., Cirardier, L. An electron microscope study of the perfusion-fixed spleen. 1. The splenic circulation and the RES concept. *Z. Zellforsch.*, 1969, 96, 372-399.
- Rhodes, J. Macrophage heterogeneity in receptor activity: the activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. *J. Imm.*, 1975, 114, 976-981.
- Scott, B.L. The occurrence of specific cytoplasmic granules in the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, 19, 417-431.
- Skutelsky, E., Danon, D. Reduction in surface charge as an explanation of the recognition by macrophages of nuclei expelled from normoblasts. *J. Cell Biol.*, 1969, 43, 8-15.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 1431-1445.
- Zamboni, L., Weistin, E. The ultrastructure of the human fetal spleen. I. *J. Ultrastruct. Res.*, 1964, 11, 469-493.
- van Ewijk, W., Verzijden, J.H.M., van der Kwast, Th.H., Luijck-Meijes, S.W.M. Reconstruction of the thymus dependent area in the spleen of lethally irradiated mice. A light and electron microscopical study of the T-cell microenvironment. *Cell Tissue Res.*, 1974, 149, 43-60.
- Veerman, A.I.P. On the interdigitating cells in the thymus area of the rat spleen: a relation between

- the mononuclear phagocyte system and T-lymphocytes. Blood, 1974, 43, 247-257.
- Veerman, A.I.P., van Ewijk, W. White pulp compartments in spleen of rate and mice. A light and electron microscopic study of lymphoid and nonlymphoid cell types. Cell and Tissue Res., 1975, 156, 417-422.
- Weiss, L. The hematopoietic microenvironment of bone marrow: on ultrastructural study of the stroma in rats. Anat. Rec., 1976, 186, 161-184.
- Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J., Daems, W.Th. The pit cell: description of a new type of cell occuring in rat liver sinusoids and peripheral blood. Cell Tiss. Res., 1976, 173, 423-435.
- Wolf, N.S., Trentin, J.J. Hemopoietic colony studies.V. J. Exp. Med., 1968, 127, 205-209.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol., 1963, 17, 208-212.

**A COMPARATIVE STUDY OF STROMAL CELLS OF  
HAEMATOPOIETIC TISSUE IN VITRO**

A.Piirsoo

S u m m a r y

An investigation of the morphology and ultrastructure has shown that the types of stromal cells of foetal spleen in tissue culture may be classified into five distinct groups, each type having one or more characteristic feature. These cells are: fibroblasts, reticular cells, endothelial cells, macrophages and mononuclear phagocytes, whose cytoplasm is filled with dense lysosomes.

The histogenesis of these cell types is discussed.

## КРОВЕТВОРЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СЕЛЕЗЕНКИ

А. Пийрсоо

Под влиянием стромы кроветворного органа стволовая кроветворная клетка дифференцируется в коммитированные клетки-предшественники одной из возможных линий дифференцировки (Wolf, Trentin, 1968). Влияние микроокружения носит характер индуктивного воздействия (Trentin, 1970, 1976). Учитывая то, что многое осталось неизвестным о контролирующих и регулятивных механизмах, которые определяют разные направления дифференцировки, упрощенные модели (тканевые культуры) в комплексе с современными методами цитологического анализа (электронная микроскопия, цитохимия и др.) могут дать существенные сведения о закономерностях дифференцировки кроветворных клеток.

### Материал и методика

Материалом исследования служили тканевые культуры кусочковых эксплантатов селезенки. Эксплантаты выращивали как на покровных стеклах, так и на мембранных фильтрах (Synpor № 8) в лежащих флаконах из-под пенициллина. Длительность культивирования эксплантатов была до 1 месяца.

Обзорные препараты окрашивали гематоксилин-эозином, тионином и азур-П-эозином. Для электронномикроскопического изучения культуры фиксировали отдельно в 2,5%-ном глutarовом альдегиде и 1%-ном растворе четырехокси осмия, забуференном какодилатом натрия. Материал заливали в эпон-812. Полутонкие срезы окрашивали полихромно метиленовым синим - азур-П-эозином и фуксином по методу Humphrey, Pittmann (1974). Ультратонкие срезы изготовляли на ультратоме ЛКБ-8800 и окрашивали ацетатом уранила и цитратом свинца по Reynolds (1963). Препараты просматривали в микроскопе УЭМВ-100В.

### Результаты исследования

В тканевых культурах кусочковых эксплантатов эмбриональной селезенки кроветворение продолжается в течение многих недель. Основными направлениями дифференцировки кроветворных клеток является созревание клеток нейтрофильных гранулоци-

тов, мононуклеарных фагоцитов и мегакариоцитов. Эритропоэз в культуре эмбриональной селезенки не поддерживается. Пролиферация и созревание кроветворных клеток происходит как на поверхности слоя фибробластоподобных клеток (фибробласты и ретикулярные клетки), так и внутри эксплантата и между двумя слоями фибробластоподобных клеток или между слоями фибробластоподобных клеток и макрофагов.

Из дифферона мононуклеарных фагоцитов в культуре наблюдается большое количество нераспластанных монобластов и промоноцитов, которые расположены колониально на подслое фибробластоподобных клеток (рис. 1, 2). Большинство колоний содержит более 200-300 клеток. Для них характерны небольшие размеры (10-15 мкм), округлые или подковообразные ядра и базофильная цитоплазма с немногими азурофильными гранулами. В колониях монобластов промоноцитов всегда встречаются клетки в митозе.

Электронномикроскопический анализ подтверждает светооптические данные о малодифференцированности вышеназванных клеток. В цитоплазме этих клеток наблюдаются полисомы, небольшие цистерны цитоплазматической сети, отдельные митохондрии с электронноплотным матриксом и лизосомы, а также небольшой пластинчатый комплекс (рис. 2). В ходе созревания увеличивается количество лизосом, появляются и отдельные фагосомы. Важно отметить, что большинство из этих малодифференцированных клеток мононуклеарных фагоцитов не достигает зрелости и они сохраняются в таком состоянии в культуре долгое время.

Типичные колонии нейтрофильных гранулоцитов небольшие. Они содержат 10-20 клеток, которые располагаются довольно тесно (рис. 3, 4). Нередко в колонии можно наблюдать клетки в митозе. В миелоидных колониях встречаются клетки разных стадий дифференцировки; от миелобластов до зрелых нейтрофильных гранулоцитов. Интересно отметить, что в большом количестве имеются клетки с кольцевидными базофильными ядрами. Происходящая *in vitro* морфологическая дифференцировка гранулоцитов в общих чертах не отличается от дифференцировки *in vivo*.

Миелобласты (рис. 5) имеют овальное ядро с большим ядром. Уплотнение хроматина в ядре возле ядерной мембраны незначительное. В цитоплазме наблюдаются немногие первичные (азурофильные) гранулы и многопузырчатые тельца, которые идентифицированы как незрелые первичные гранулы.

При созревании миелобласта происходит ряд изменений, из которых основными являются изменение ядерной морфологии (ядра становятся более сегментированными), относительное увеличение электронноплотного хроматина и его периферическое скопление в ядре, а также увеличение количества цитоплазматических гранул.

Промиелоциты (рис. 6) характеризуются бобовидными или подковообразными ядрами с 1-2 ядрышками. Клетки с кольцевидными ядрами в культуре представляют собой также типичные промиелоциты. Характерным признаком таких клеток является место расположения пластинчатого комплекса в центре клетки. В цитоплазме промиелоцитов наблюдаются многие электронноплотные первичные гранулы. В зоне пластинчатого комплекса локализуется много светлых пузырьков (40-150 нм) и гранул с электронноплотным содержимым.

Миелоциты (рис. 7) имеют более изогнутое или сегментированное ядро и базофильную цитоплазму. В стадии миелоцита в цитоплазме появляются т.н. вторичные или специфические гранулы нейтрофилов. До стадии миелоцита клетки пролиферируются.

Важно отметить, что дифференцирующиеся нейтрофильные гранулоциты имеют тесные (в том числе и контакты типа "замка") контакты с мононуклеарными фагоцитами, имеющие электронноплотные гранулы (рис. 8).

Использованные нами условия тканевых культур пригодны для мегакариоцитогенеза. Колонии (обычно смешанные, с гранулоцитами) расположены в основном в зоне роста между двумя слоями фибробластоподобных клеток (рис. 9). Почти всегда мегакариоцитогенез коррелируется с интенсивным гранулопозом.

Мегакариобласты (рис. 10) (30-50 мкм) имеют односегментное светлое ядро с 2-3 большими ядрышками. В ходе дифференцировки отмечается увеличение размеров клеток и базофилии цитоплазмы. Ядра становятся более сегментированными, образуются небольшие цитоплазматические отростки. В цитоплазме появляются азурофильные гранулы и светлые вакуоли с азурофильным материалом в центре.

Промегакариоциты (рис. 11) (110-200 мкм) имеют многосегментное ядро. Относительно светлая цитоплазма почти лишена азурофильных гранул, но имеются небольшие светлые вакуоли.

В цитоплазме мегакариоцитов (рис. 12) наблюдаются как светлые вакуоли, так и азурофильные гранулы. В цитоплазме мегакариоцитов можно различить три зоны: перинуклеарную,

центральную и периферическую. В перинуклеарной и периферической зонах располагаются многочисленные рибосомы, митохондрии, отдельные канальцы цитоплазматической сети и небольшое количество гранул. Характерной чертой центральной зоны является сильно развитая система узких цистерн в виде разветвленных трубочек в разрезе и наличие большого количества гранул.

Часть электронноплотных гранул имеет гомогенное электронноплотное мелкозернистое содержимое и они окружены одной мембраной. Эти гранулы соответствуют  $\alpha$ -гранулам тромбоцитов и нередко они обнаруживались внутри демаркационных трубочек. Другая часть электронноплотных гранул по структуре идентична митохондриям, которые имеют лишь очень малые размеры и несколько крист. Эти структуры считаются идентичными  $\beta$ -гранулам тромбоцитов. Нередко в изученных мегакариоцитах обнаруживаются лизосомы с гетерогенным материалом внутри их. Редко в колонии мегакариоцитарных клеток наблюдаются и тромбоциты.

#### Обсуждение

Изучение дифференцировки кроветворных клеток на модели тканевых культур представляет интерес как в теоретических исследованиях, так и в практической медицине для вскрытия закономерностей регуляции дифференцировки и пролиферации кроветворных клеток.

В отличие от клеточных культур других кроветворных органов (Лурия, 1972; Dexter et al., 1973), где кроветворение обычно продолжается всего 5-6 дней, в тканевых культурах кусочковых эксплантатов эмбриональной селезенки кроветворение поддерживается в течение многих недель.

В изученных культурах кроветворение поддерживается в основном в трех направлениях: дифференцировка мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и мегакариоцитов.

Дифференцировка мононуклеарных фагоцитов характеризуется наличием большого количества нераспластанных монобластов и промоноцитов на подслое фибробластоподобных клеток. Эти клетки образуют колонии и делятся.

Следует отметить, что в литературе нераспластанные макрофаги идентифицированы как лимфоциты (Allgöver, Hulliger, 1960; Tomatis, Wang, 1965 a,b.), но проведенный нами электронномикроскопический и гистохимический анализ четко указыв-

вает на макрофагальную природу этих клеток.

В культуре большое количество этих изолированных клеток макрофагального ряда не достигает зрелости, и они сохраняются долгое время.

В изученных нами культурах наблюдаются как чистые колонии нейтрофильных гранулоцитов, так и колонии, в которых найдены клетки макрофагального ряда и (или) мегакариоциты.

Сравнивая полученные данные с литературными в отношении морфологии дифференцирующих клеток (Wetzel et al., 1967; Spicer et al., 1968; Spicer, Hardin, 1969; Bainton et al., 1971; Morris et al., 1977), можно заметить, что происходящая *in vitro* дифференцировка гранулоцитов в общих чертах морфологически не отличается от дифференцировки *in vivo*.

Мегакариоцитогенез в тканевых культурах эмбриональной селезенки происходит также без заметных отличий от данного процесса, происходящего в условиях *in vivo*, который представлен неоднократно в литературе (Breton-Corius, Guichard, 1975; Bentfeld-Barker, Bainton, 1977; Inzumi et al., 1977).

Значительный интерес представляет образование тромбоцитов в культурах, так как тромбоцитогенез в культурах ранее не был описан (Metcalf et al., 1975; McLeod et al., 1976).

По теории гемопоэтического индуктивного микроокружения (ГИМ) дифференцировка стволовой кроветворной клетки контролируется разными участками стромы кроветворной ткани (старостин и Мичурина, 1977; Wolf, Trentin, 1968; Haley et al., 1975; Tavassoli, 1975).

Важность межклеточных контактов между разными клеточными типами отмечалась во многих работах (Ben-Ishay, 1974, 1975; Weiss, 1976).

Следует подчеркнуть, что постоянными компонентами всех изученных колоний гранулопоэза являются клетки ряда дифференцировки мононуклеарных фагоцитов.

Нами наблюдались контакты между клетками из линии дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарными фагоцитами со многими электронноплотными гранулами. Такие межклеточные связи дифференцирующихся гранулоцитов и макрофагов (моноцитов) охарактеризованы и в литературе (Бенюмович и Цуладзе, 1971; Sauter, Kistler, 1970; Ben-Ishay, 1975).

Мы полагаем, что вышеназванные клетки стромы образуют микроокружение необходимое для дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов.

## Л и т е р а т у р а

- Венюмович М.С., Цуладзе Г.К. Изучение в культуре тканей лейкоцитов периферической крови человека. Успехи соврем. биол., 1971, 71, 391-411.
- Лурия Е.А. Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. М., 1972.
- Старостин В.И. Мичурина Т.В. Строма кроветворных органов и ее взаимодействие со стволовой кроветворной клеткой. Морфология человека и животных. Антропология. Итоги науки и техники. ВИНТИ, М., 1977, 7, 59-110.
- Allgöwer, H., Hulliger, L. Origin of fibroblasts from mononuclear blood cells: a study on in vitro formation of the collagen precursor hydroxyproline, in buffy coat cultures. Surgery, 1960, No. 4, 603-610.
- Bainton, D.F., Ulyot, J.I., Farquhar, M.J. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte in human bone marrow. J. Exp. Med., 1971, 134, 907-934.
- Ben-Ishay, Z. Reticular cells in erythroid islands: their erythroblastophagocytic function. J. of RES, 1974, 16, 340-346.
- Ben-Ishay, Z. Ultrastructural study of bone marrow-derived granulocytic colonies in diffusion chambers in rats. Scand. J. of Haematol., 1975, 15, 241-250.
- Bentfeld-Barker, M.E., Bainton, D.F. Ultrastructure of rat megakaryocytes after prolonged thrombocytopenia. J. of Ultrastruct. Res., 1977, 61, 201-214.
- Breton-Corius, J., Guihard, J. Two different types of granules in megakaryocytes and platelets as revealed by the diaminobenzidine method. J. of Microsc. et de Biol. Cell., 1975, 23, 197-202.
- Dexter, T.M., YAllen, T.D., Lajtha, L.G., Schofield, R., Lord, B.I. Stimulation of differentiation and proliferation of hemopoietic cells in vitro. J. Cell Physiol., 1973, 461-473.
- Haley, J.E., Tjlo, J.H., Smith, W.W., Brecher, G. Hematopoietic differentiative properties of murine spleen implanted in the omenta of irradiated and nonirradiated hosts. Exp. Hematol., 1975, 3, 187-196.
- Humphrey, C.D., Pittmann, E.F. A simple methylene blue-

- azure II basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.*, 1974, 49, 9-14.
- Inzumi, T., Haltori, A., Sanada, M., Muto, M. Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen. *Arch.Histol. Jap.*, 1977, 40, 305-320.
- McLeod, D.L., Shreeve, M.M., Axelrand, A.A. Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature*, 1976, 261, 492-494.
- Metcalf, D., McDonald, H.R., Odartchenko, N., Sordat, B. Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 1744-1748.
- Morris, R.B., Nichols, B.A., Bainton, D.F. Ultrastructure and peroxidase cytochemistry of normal human leukocytes at birth. *Develop. Biol.*, 1977, 44, 223-238.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 208-212.
- Sauter, A., Kistler, L. Rosette formation in white blood cell cultures from patients with acute myeloblastic leukemia. *Experientia*, 1970, 26, 526-528.
- Spicer, S.S., Hardin, J.H. Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. *Lab. Invest.*, 1969, 20, 388, 497.
- Spicer, S.S., Horn, R.G., Wetzel, B.K. Ultrastructural and cytochemical characteristic of leukocytes in various stages of development. *Biochem. Pharmacol.*, suppl., 1968, 143-157.
- Tavassoli, M. Studies on hemopoietic microenvironments. *Exp. Hemat.*, 1975, 3, 322-329.
- Tomatis, L., Wang, L. Long-term culture of thymic cells from newborn mouse fragments. *Proc.Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1965a, 118, 1037-1042.
- Tomatis, L., Wang, L. The presence of lymphocytes in long-term cultures of newborn mouse thymic epithelium. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1965b, 120, 472-480.
- Trentin, J.J. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. In: "Regulation of hematopoiesis", ed. A.S. Gordon, N.Y., 1970, 1, 161-186.

- Trentin, J.J. Hemopoietic inductive microenvironments (HIM): implications for myelofibrosis. *Adv. Biosci.*, 1976, 16, 77-85.
- Weiss, L. The hematopoietic microenvironment of bone marrow: on ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.*, 1976, 186, 161-184.
- Wetzel, B.K., Horn, R.G., Spicer, S.S. Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil, and basophil granulocytes in rabbits. *Lab. Invest.*, 1967, 16, 349-382.
- Wolf, N.S., Trentin, J.J. Hemopoietic colony studies.V. *J. Exp. Med.*, 1968, 127, 205-209.

#### HEMATOPOIESIS IN CULTURE OF FOETAL SPLEEN

A.Piirsoo

#### S u m m a r y

An ultrastructural analysis of haematopoiesis in the tissue culture of foetal spleen has been carried out.

Haematopoietic colonies of granulocytic (neutrophilic), megakaryocytic and macrophage types were observed and these colonies disclosed normal maturing cells at all stages of maturation. The maturational changes of the various cell types are described. Neutrophilic granulocytes were frequently found to be in close contact with mononuclear phagocytes, whose cytoplasm was filled with dense lysosomes.

## КОЛЕБАНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ПЕРОКСИСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ МЕТАНОЛУСВОИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ

Я.А. Симяскер, Э.А. Талпсеп, Р.К. Кыйвеер

Результаты исследования динамики активности алкогольоксидазы в периодических культурах (Veenhuis et al., 1978) и при различных режимах непрерывного культивирования (van Dijken et al., 1976) позволяют заключить, что содержание этого фермента в клетках метанолусваивающих дрожжей варьирует в широких пределах. В отношении причин колебания содержания алкогольоксидазы в клетках высказано два предположения.

Во-первых, содержание алкогольоксидазы в клетках определяется концентрацией метанола в среде. Алкогольоксидаза имеет низкое сродство к метанолу и Ван-Диекен (van Dijken et al., 1976) предполагает, что уменьшение скорости окисления метанола при низких концентрациях клетки компенсируют увеличением содержания алкогольоксидазы в клетках.

Во-вторых, Веехуис с соавторами (Veenhuis et al., 1976, 78) не обнаружил активности алкогольоксидазы в пероксисомах, перемещающихся из материнской клетки в образующиеся почки, и предполагает, что активность этого фермента у *Hansenula polymorpha* зависит от стадии клеточного цикла. Последнее предположение основывается только на результатах цитохимических исследований, что не позволяет оценить процесс количественно.

В настоящей работе мы поставили себе цель установить размеры колебаний активностей алкогольоксидазы и каталазы в клеточном цикле у *Candida boidinii* и *Pichia pinus*.

### Методика эксперимента

В качестве объекта использовали метанолусваивающие дрожжи *Candida boidinii* и *Pichia pinus* из коллекции ВНИИ Генетики.

Для получения клеток в определенных стадиях клеточного цикла были использованы два методических подхода.

Во-первых, клетки из асинхронно растущих культур подвергали фракционированию в градиенте плотности сахарозы.

Во-вторых, метод синхронно растущих культур. Клетки для фракционирования выращивали в 5-литровых колбах при постоянной аэрации с продуванием стерильного воздуха на среде следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -5,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,  $\text{MgSO}_4$ -0,5,  $\text{NaCl}$  - 0,1 с добавкой микроэлементов и витаминов. Содержание метанола в среде равнялось 5 мл/л. Пробы для фракционирования клеток брали в начале, середине и в конце логарифмической фазы роста. Пробы охлаждали до  $+4^\circ\text{C}$  и клетки промывали дважды в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Градиент сахарозы от 20 до 40 процентов приготавливали в центрифужных стаканах размерами  $h = 15$  см и  $a = 5$  см. На градиент наносили около  $8 \cdot 10^9$  клеток, суспендированных в 10 мл 50 мМ фосфатном буфере pH 7,5. До нанесения клеток градиент был охлажден до  $+4^\circ\text{C}$ . Разделение клеток проводили центрифугированием при 1300 g в течение 10 мин. Фракции клеток из градиента собирали шприцем и промывали в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Бесклеточные экстракты, используемые для определения активности ферментов, приготавливали путем разрушения замороженных клеток прессом типа Hughes. Неразрушенные клетки и клеточные осколки удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 16000 g, температуре  $+2^\circ\text{C}$ . Содержание белка в экстрактах определяли по Лоури (Lowry et al., 1951), активность каталазы по Бергмейеру (Bergmeyer et al, 1970) активность алкогольоксидазы по Тани (Tani et al., 1972).

Синхронно растущую культуру получали по Митчисон и Винцент (Mitchison a. Vincent, 1965). В качестве стартовой культуры использовали гомогенную фракцию маленьких клеток (табл.), которую выделяли по вышеуказанному методу из 4 литров культуры (конец логарифмической фазы). Все процедуры фракционирования проводили при комнатной температуре. Суспензия клеток для нанесения на градиент была приготовлена в питательной среде, не содержащей метанола. Эту же среду использовали для промывания клеток, извлеченных из градиента. Промытыми клетками инокулировали 1 л среды. Концентрация метанола в среде равнялась 0,5%, начальной плотности культуры  $15 \cdot 10^6$  клеток в мл,  $E_{623} = 0,155$ . Общее число клеток и число почкующихся клеток определяли микроскопически.

### Результаты

При центрифугировании клетки распределялись в градиенте на три визуально хорошо различимые зоны. В верхней зоне

(32...35% сахарозы) остались преимущественно маленькие клетки диаметром 2,5...5 мкм по длинной оси. Число больших и почкующихся клеток в этой зоне незначительное. Две нижние зоны менее гомогенные. Вторая фракция (32-35% сахарозы) обогащена клетками средней величины ( $d = 5...7,5$  мкм), а третья - почкующимися и крупными клетками (табл.).

Чаще всего при фракционировании клетки дрожжей и бактерий в градиенте плотности распределяются по стадиям клеточного цикла, так что образующиеся при делении или почковании молодые, небольшие клетки остаются в верхних слоях градиента, а взрослые и почкующиеся или делящиеся - в нижних. При этом наблюдается, как правило, равномерное распределение клеток в градиенте плотности (Sebastian et al., 1971; Poole, Pickett, 1978). В наших опытах распределение клеток в градиенте плотности было зональное - образовались три визуально различимые зоны, не учитывая осадка клеток на дне центрифужных стаканов, который образуют коагулированные между собой клетки. Возможно, что причиной зонального распределения клеток являются резкие колебания плотности клеток метанолсваивающих дрожжей в клеточном цикле.

Судя по размерам клеток, у *Candida boidinii* в верхней зоне градиента плотности сахарозы остаются молодые клетки, образующиеся при почковании (табл.). *Candida boidinii* имеет почти симметричный тип почкования, при котором размеры материнской клетки и образующейся в результате почкования дочерней, во время отделения последней примерно одинаковые. Но надо иметь в виду, что процедуры фракционирования (центрифугирование, промывание клеток и осмотическое воздействие раствора сахарозы) ведут к отрыву почек от некоторых клеток и образованию не идентичных по размеру дочерних и материнских клеток. В результате однократного промывания суспензии процент почкующихся клеток уменьшается от 42,6% до 35,7%. Следовательно, фракция небольших клеток содержит в некоторой степени и дочерние клетки, образующиеся в результате отрыва почек под действием аналитических процедур. Последнее обстоятельство, по-видимому, не мешает интерпретации результатов. При высеве указанной фракции в питательную среду наблюдается одномерный рост клеток и одновременное почкование у 50-60% клеток после 9-10-часового роста, что указывает на физиологическую однородность этой фракции (рис. 1):

Независимо от стадии развития культуры, из которой были выделены клетки для фракционирования, активность алкоголь-

Т а б л и ц а

Распределение клеток (в процентах) различной величины (в мкм по  
длинной оси) по фракциям центрифугирования в градиенте плотности  
сахарозы

Фаза роста	Номер фракция	Начало логарифмической			Середина логарифмической			Конец логарифмической		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
размеры клеток	2,5 - 5,0	80,0	8,2	10,3	81,1	25,0	14,2	84,4	21,1	11,5
	5,0 - 7,5	12,9	56,3	27,0	14,9	35,9	28,3	9,4	46,0	36,2
	7,5	1,4	10,3	14,3	1,8	8,6	30,0	1,3	18,6	6,9
почкующиеся клетки		5,7	25,0	48,4	2,25	30,5	27,4	4,4	14,3	45,4

оксидазы клеток второй фракции превышает ее активность в клетках первой и третьей фракции. Наиболее отчетливо это выражается в середине логарифмической фазы роста культуры (рис. 1). Низкая активность алкогольоксидазы во фракции маленьких клеток в быстро растущих культурах показывает, что содержание алкогольоксидазы у *S. boydii* в образующихся при почковании клетках невысокое. Во второй фракции, которую характеризует наиболее высокая активность алкогольоксидазы, клетки средней величины (5...7,5 мкм) составляют 56,3; 35,9 и 46,0% в зависимости от стадии развития культуры. Это несколько выше, чем в первой и третьей фракциях. Возможно, что параллельно с увеличением размеров увеличивается и активность алкогольоксидазы в клетках. У *Nauphula polyomorpha* показано, что параллельно с ростом клеток увеличивается в клетках число и размеры пероксисом (Veenhuis et al., 1978). У *Candida boydii* рост клеток, очевидно, не является единственным фактором, который влияет на накопление алкогольоксидазы. В клетках, полученных из конца логарифмической фазы роста, высокой активностью алкогольоксидазы обладает и фракция маленьких клеток. Последнее показывает, что заторможение размножения в конце логарифмической фазы роста ведет к увеличению активности алкогольоксидазы в клетках независимо от их размеров.

Низкая активность алкогольоксидазы в клетках третьей фракции по сравнению со второй фракцией, по-видимому, связана с несколько более высоким процентом больших (7 мкм) и почкующихся клеток в этой фракции. Более определенно на взаимосвязь почкования с уменьшением активности алкогольоксидазы указывает динамика алкогольоксидазы в синхронной культуре. Активность алкогольоксидазы находится в отрицательной корреляции с процентом почкующихся клеток (рис. 1).

В клеточном цикле уменьшение активности алкогольоксидазы начинается, вероятно, уже при подготовке клеток к почкованию на что указывает резкое снижение активности этого фермента в это время (7 часов от начала опыта), когда видимые почки наблюдались только у 8% клеток. Активность алкогольоксидазы остается низкой в течение всего периода почкования. Резкое (10...12 раз) уменьшение активности алкогольоксидазы трудно объяснить разбавлением фермента в результате синтеза белка. Более вероятно, что во время подготовки к почкованию и во время ее алкогольоксидаза инактивируется.

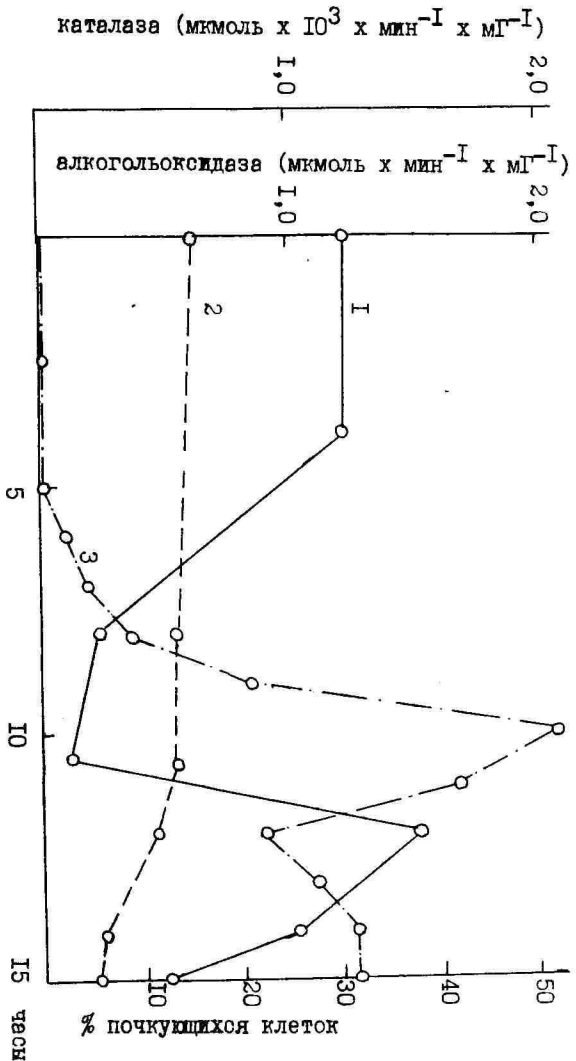


Рис. 1. Активность алкогольоксидазы и каталазы в клетках окисляющей культиуры *Sandida bovinis*. 1 - алкогольоксидаза, 2 - каталаза, 3 - процент почкувания.

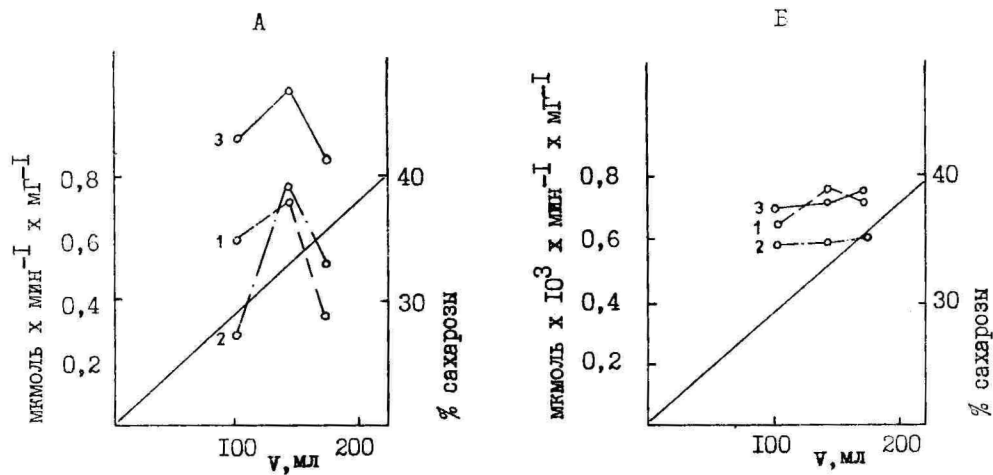


Рис. 2. Активность алкогольоксидазы (А) и каталазы (Б) в различных фракциях клеток *S. bovidinii*, полученных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. 1 - клетки из начала, 2 - середины и 3 - конца логарифмической фазы роста культур.

Обнаруженная у *S. boidinii* динамика алкогольоксидазы не является, очевидно, исключением. Результаты определения активности алкогольоксидазы во фракциях, полученных при центрифугировании в градинте плотности сахарозы, аналогичные полученным *P. pinus* (рис. 3). Возможно, что обнаруженная нами у *Candida boidinii* и *Pichia pinus* динамика колебания алкогольоксидазы в клеточном цикле является общей для всех метанолусваивающих дрожжей.

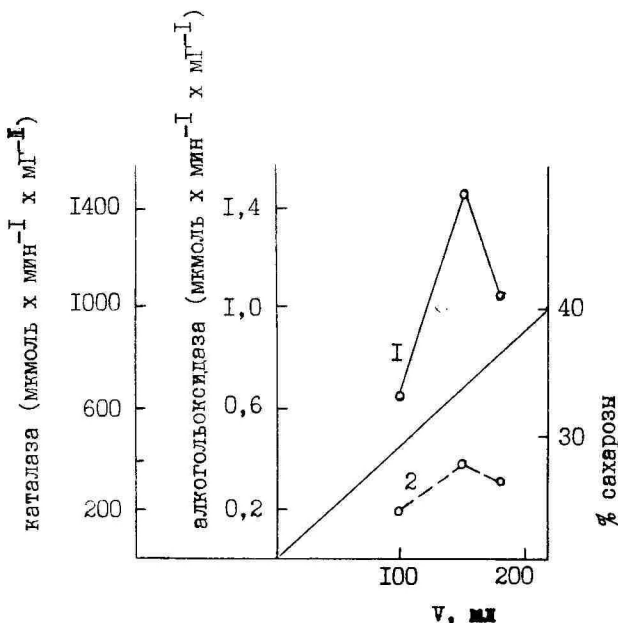


Рис. 3. Активность алкогольоксидазы (1) и каталазы (2) в различных фракциях клеток *P. pinus*, полученных центрифугированием в градинте плотности сахарозы

Механизм и физиологическая цель инактивации ключевого фермента метаболизма энергетического субстрата не ясна. У *Saccharomyces cerevisiae* (Кавраг, 1969) установлено, что во время почкования инактивируется транспортная система глюкозы и клетки переходят на использование эндогенного субстрата трегалозы. Возможно, что у метанолусваивающих дрожжей переключение на эндогенный метаболизм достигается инактивацией первого фермента усвоения метанола. Образование ферментов

катаболизма метанола репрессируется глюкозой (Eggeling et al., 1979). Это дает основание предполагать, что резкое уменьшение активности алкогольоксидазы во время почкования является катаболитной инактивацией, вызванной мобилизацией резервных сахаридов.

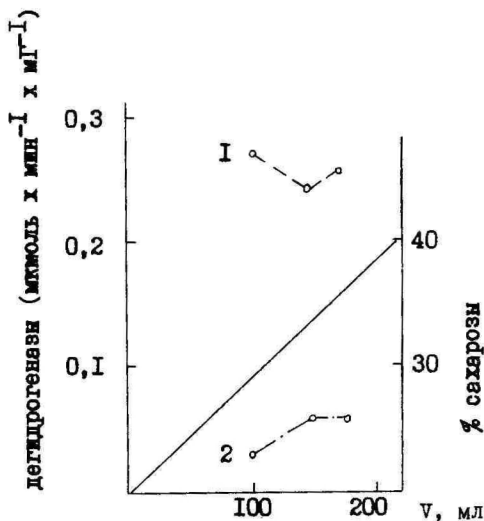


Рис. 4. Активность формальдегиддегидрогеназы (1) и форматдегидрогеназы (2) в различных фракциях клеток *S. boidinii*, полученных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы

Активность каталазы, формальдегиддегидрогеназы и форматдегидрогеназы, по-видимому, меньше зависит от клеточного цикла (рис. 2, 3, 4). Различная динамика активностей алкогольоксидазы и каталазы в клеточном цикле показывает, что контроль синтеза и активностей этих двух функционально связанных пероксисомных ферментов осуществляется автономными механизмами.

Суммируя вышесказанное, динамику алкогольоксидазы в клеточном цикле можно представить следующим образом. В образующихся при почковании дочерних клетках активность алкогольоксидазы низкая. Параллельно с увеличением размеров клеток происходит быстрое образование активного фермента. Максимальная активность алкогольоксидазы в клетках достигается, по-

видимому, перед окончанием линейного роста клеток. Инактивация алкогольоксидазы начинается при подготовке клеток к почкованию и активность фермента остается низкой в течение всего периода почкования.

#### Литература

- Bergmeyer, H.U. Methoden der Enzymatischen Analyse, 2. Auflage. Band I, S. 636-647, Academic-Verlag, Berlin, 1970.
- Dijken, J.P. van, Otto, R., Harder, W. Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Arch. Microbiol., 1976, 111, 137-144.
- Eggeling, L., Sahm, H. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1978, 5, 197-202.
- Kaspar, H. von Meyenburg. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. Arch. Microbiol., 1969, 66, 289-303.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, K. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.
- Mitchison, J.M., Vincent, W.S. Preparation of synchronous cell cycle by sedimentation. Nature, 1965, 205, 987-989.
- Poole, R.K., Pickett, A.M. Which cells are selected from exponential cultures by continuous-flow centrifugation? The selection of small cells from cultures of *Escherichia coli* and *Schizosaccharomyces pombe* that exhibit minimal density fluctuations during the cell cycle. J. Gen. Microbiol., 1978, 107, 399-402.
- Sebastian, J., Carter, B.L.A., Halvarson, H.O. Use of yeast populations fractionated by zonal centrifugation to study the cell cycle. J. Bacteriol., 1971, 108, 1045-1050.
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol oxidizing enzyme in a

- methanol-utilizing yeast *Kloeckera*, sp. No. 2201. *Agr. Biol. Chem.*, 1972, 36, 68-75.
- Veenhuis, M., Dijken, J.P. van, Harder, W. Cytochemical studies on the localization of methanol oxidase and other oxidases in peroxisomes of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.*, 1976, 111, 123-135.
- Veenhuis, M., Dijken, J.P. van, Pilon, S.A.F., Harder, W. Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.*, 1978, 112, 153-164.

CHANGES IN PEROXISOMAL ENZYME ACTIVITIES  
DURING THE CELL CYCLE OF METHANOL UTILIZING YEASTS

J.A. Simisker, E.A. Talpsep, R.K. Kõiveer

S u m m a r y

Fluctuations of the enzyme activities in the cell cycle of methanol utilizing yeasts *Candida boidinii* and *Pichia pinus* were investigated.

The activity of alcohol oxidase (AO) in the cells of actively growing cultures depends on the stage of the cell cycle. The minimal activity of AO was found in young cells produced by budding. The maximal activity of AO was detected in the fraction of medium size cells before they reached the budding phase. The activity of AO decreased abruptly when the cells proceeded budding.

The activities of formaldehyde and formate dehydrogenases and catalase were constant during the cell cycle.

Fluctuations of (AO) may be caused by enzyme inactivations. It is supposed that in the budding cells methanol uptake decreases and endogenous substances are used as energetic source.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ  
*E coli* НА ДНК TOL-ПЛАЗМИД

Я.К. Хабихт, Р.Л.-Э. Виллемс, А.Л. Хейнару

К настоящему времени накопилось множество данных о микроорганизмах, разложение некоторых соединений у которых определяется наличием деградативных плазмид. Среди веществ, разлагаемых по плазмидному пути, имеются многие фенольные соединения, хлорированные пестициды и гербициды.

Такие микробы стали прямым объектом для биотехнологии с целью получения новых штаммов бактерий, способных деградировать широкий диапазон таких соединений.

Основная информация о плазмидах биодеградации пока ограничивается определением наличия плазмид в опытах *in vivo* и биохимической характеристикой путей разложения.

Больше всего деградативных плазмид найдено в разных штаммах рода *Pseudomonas*.

TOL-плазмиды определяют синтез ферментов, разлагающих толуол и ксилол. В штамме *Pseudomonas putida mt-2* определена TOL-плазида pWVO, имеющая молекулярный вес около 78 Mdal.

По данным литературы, это пока единственная деградативная плазида, для которой составлена рестрикционная карта, позволяющая приступить к изучению транскрипции и промоторных участков названной плазмиды.

В подобных экспериментах широко применяется РНК-полимераза *E coli*. Этот фермент оказался довольно универсальным в осуществлении транскрипции на многих ДНК филогенетически далеких микроорганизмов.

Целью настоящего исследования явилось выяснить, транскрибирует ли ДНК-зависимая РНК-полимераза *E coli* ДНК TOL-плазмид и в случае положительного результата найти возможности определения сайтов связывания РНК-полимеразы *E coli* на ДНК TOL-плазмид.

Штаммы бактерий. В настоящей работе были применены стандартные штаммы псевдомонад *Ps putida mt-2* pWVO, полученные от др. П.А. Уиллиамса (Англия), и *Ps putida AC804 TOL<sup>X</sup> met*,

полученные от др. А.М. Чакрабарти (США).

Выращивание бактерий. В качестве полной среды применяли L среду (Duggleby et al, 1977).

Для получения препаративных количеств плазмидных ДНК инокулят выращивали в селективных средах (Adams, 1959; Vau-chop, Elsdon, 1960; Duggleby et al, 1977), а основную массу в селективных средах или в минимальной среде с глюкозой (инокулят 1:10). Культуры подвергались интенсивному аэрированию на качалках или стерильным воздухом.

Выделение плазмидной ДНК. Лизис клеток и получение обогащенного лизата для выделения препаративных количеств плазмидной ДНК проводили по методу Хансена и Ольсена (Hansen, Olsen, 1978).

Дальнейшую очистку плазмидной ДНК проводили разными методами, выбирая их согласно требованиям, предъявляемым к чистоте препаратов в поставленных опытах.

Для получения чистой фракции плазмидной ДНК мы употребляли метод центрифугирования обогащенного лизата в градиенте CaCl<sub>2</sub> в присутствии бромистого этидия (Duggleby et al, 1978).

Рестрикция плазмидной ДНК. Для рестрикции плазмидной ДНК применяли рестриктазы Hind III и Xho I. Реакционную смесь, содержащую около 1 мкг плазмидной ДНК в TEN буфере, соответствующую рестриктазу, и рестрикционный буфер (10 mM трис-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM дитиотритол, 100 mM NaCl) инкубировали при температуре 37°C в течение 3 ... 6 часов. Реакцию останавливали выращиванием проб при температуре 65°C в течение 10 минут.

Агарозный гель-электрофорез. Горизонтальный электрофорез плазмидной ДНК проводили в 0,7 ... 1,0%-ном агарозном геле, приготовленном в трис-ацетатном буфере. ДНК окрашивали в геле добавлением 1 мл 1 mM бромистого этидия на 1 литр раствора в течение 30 минут. Затем гель отмывали дистиллированной водой и фотографировали в УФ свете по общепринятой методике (Thompson et al, 1974).

Транскрипция плазмидной ДНК. Для изучения транскрипции плазмидной ДНК и сайтов связывания РНК-полимеразы с фрагментами ДНК использовали методику изучения инициации транскрипции на ДНК фага  $\lambda$  (Taylor, Burgess, 1979). Препараты, содержащие 1 ... 2 мкг ДНК TOL-плазмиды (в контрольных опытах ДНК фага  $\lambda$ ), растворяли в 300 мкл буфера А, содержащем 10 mM трис-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM дитиотритол, и затем к ним добавляли по 50 мкл

1 мМ растворов СТР, ГТР и УТР. В качестве метки использовали  $\alpha$  -  $^{32}\text{P}$ -АТР с удельной активностью примерно 10 Ки на ммоль по 2 мКи  $^{32}\text{P}$ -АТР (1 ммоль) на пробу. ДНК-зависимую РНК-полимеразу *E coli* вносили в реакционную смесь из расчета 1 мкг белка на 1 мкг ДНК. Смесь инкубировали при температуре 37°C. Реакцию останавливали через 5, 15 и 60 минут осаждением нуклеиновых кислот путем добавления равного количества 10%-ной трихлоруксусной кислоты (для лучшего осаждения применяли носитель - тРНК). Пробы выдерживали во льду 1 час и затем фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (поры 0,45 мкм). Фильтры промывали 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (5 x 1 мл каждого). Осадок нуклеиновых кислот оставляли связанным на фильтрах. О синтезе РНК судили по накоплению радиоактивной метки на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность считали по Черенкову (в 10 мл дистиллированной воды) в сцинтилляционном счетчике.

Связывание ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E coli* на рестрикционных фрагментах ДНК. В основу этого эксперимента была положена методика Тейлора и Бургесса (Taylor, Burgess, 1979). Препараты фрагментов ДНК (в контрольных экспериментах фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , интактная фага  $\lambda$ , интактная ДНК плазмиды) растворяли в 300 мкл буфера А. В реакционную смесь добавляли ДНК-зависимую РНК-полимеразу из расчета 1 мкг фермента на мкг ДНК. Реакцию связывания полимеразы с фрагментами ДНК проводили при температуре 37°C в течение 15 ... 20 минут. Затем реакционную смесь медленно фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры Миллипор (поры 0,45 мкм, скорость фильтрации не более 1 мл/мин.). Фильтры промывали. Комплекс ДНК-полимеразы адсорбируется на нитроцеллюлозные фильтры, свободная ДНК проходит через поры фильтра. Затем фильтры помещали в стеклянные пробирки с 0,5 мл раствора А, содержащем додецилсульфат натрия в конечной концентрации 0,2%. Пробы смешивали на качалке при температуре 37°C в течение одного часа. В этих условиях происходило разрушение комплекса ДНК-полимеразы. Фрагменты ДНК осаждали добавлением в пробирку одной десятой объема 3М Na-ацетата (рН 5,5), тРНК-носителя (40 мкг/мл) и 3,5 объемов 96%-ного этанола при температуре -40°C. Осадок собирали центрифугированием при 6000 x g. 30 минут. Осадок высушивали и растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды. Анализ проводили электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Условия электрофореза описаны выше.

Первой задачей настоящей работы явилось выяснение вопро-

са, транскрибируется ли ДНК-зависимая РНК-полимераза *E coli* ДНК **TOL**-плазмид. На рисунке 1 приведен график временной зависимости накопления метки -  $\alpha$  -  $^{32}\text{P}$ -АТР в РНК в течение

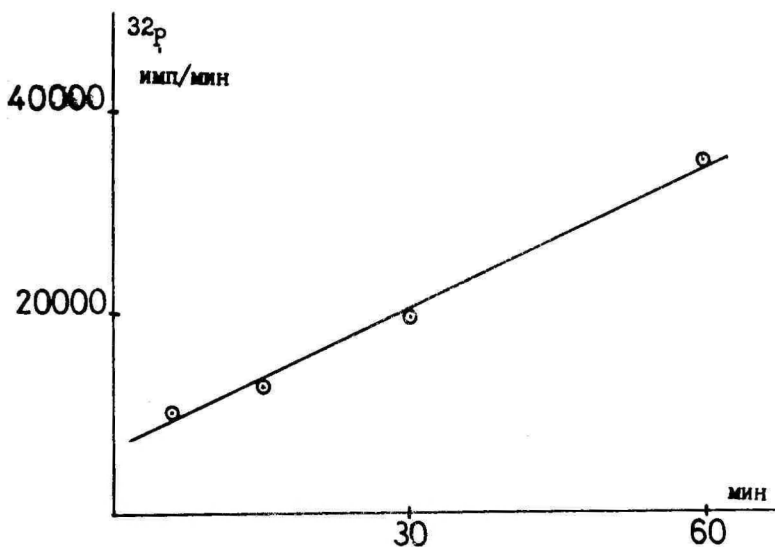


Рис. 1. Временная зависимость включения метки  $^{32}\text{P}$ -АТР в РНК при транскрипции ДНК  $pWVO$  ДНК-зависимой РНК-полимеразой *E coli*.

часа, полученный при транскрипции ДНК  $pWVO$ . Транскрипция **TOL<sup>x</sup>**-ДНК существенно не отличается от транскрипции ДНК  $pWVO$ . Фон опыта (неспецифическое связывание АТР на фильтрах в контрольных опытах без полимеразы или без ДНК) не превышал 10%. Таким образом, из результатов опыта явствует, что РНК-полимераза *E coli* транскрибирует ДНК **TOL**-плазмид. В течение 1 часа в РНК включилось 1,7% всей добавленной метки при транскрипции **TOL**-ДНК и 0,5% при транскрипции в контрольных опытах ДНК фага  $\lambda$ . Довольно низкий процент включения обусловлен предельно низкой (2нМ) концентрацией АТР и малой активностью полимеразы.

На рисунке 2 представлены данные о связывании рестрикционных фрагментов **TOL<sup>x</sup>**-ДНК с РНК-полимеразой *E coli*. Из-за недостаточных количеств препаратов **TOL<sup>x</sup>** фрагментов, а также из-за нехватки полимеразы, нам пока еще не удалось

выработать оптимальные условия для проведения данных экспериментов. Однако и из результатов этих опытов видно, что РНК-полимераза специфически связывается по крайней мере с одним рестриционным фрагментом  $TOL^x$ -ДНК - *Hind* III-B ( $22 \times 10^3$  пар оснований).

На рисунке 3 представлена ориентировочная рестриционная карта  $TOL$  плазмиды  $p^{WVO}$ , обобщающая результаты многих авторов (Хабихт и др., 1979; Виллемс и др., 1979; Downing et al., 1979; Downing, Broda, 1979) и настоящей работы. На физической карте  $TOL$ -плазмиды  $p^{WVO}$  и ее делеционных мутантов (рис. 3) фрагмент *Hind* III-B локализован в части плаз-

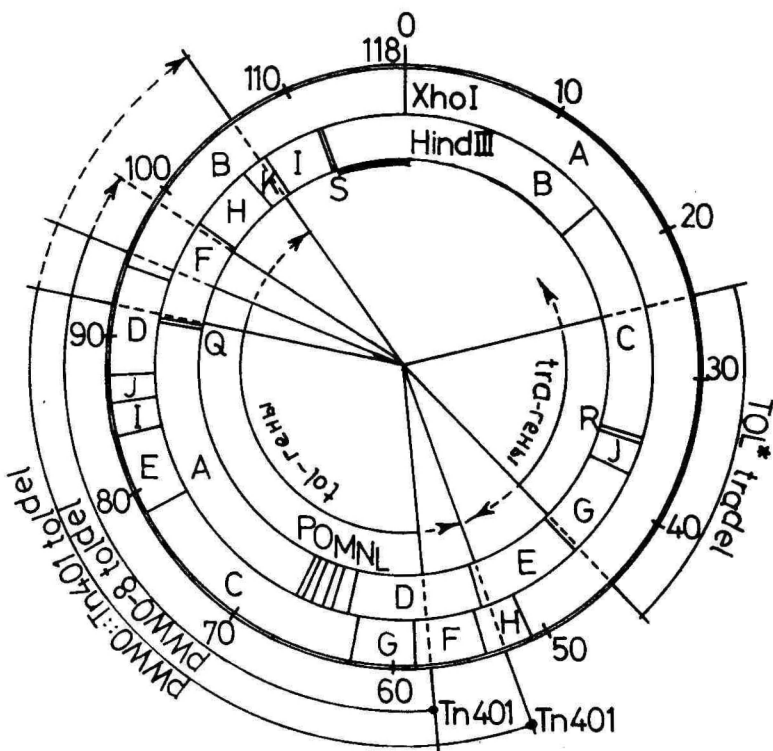


Рис. 3. Ориентировочная рестриционная и физическая карта  $TOL$ -плазмид. Масштаб в  $10^3$  пар оснований; " — " участок смазывания РНК-полимеразы.

миды, не связанной со структурными генами, определяющими **TOL**-специфическую функцию. Кроме того, в настоящее время не известен ни один делеционный мутант **TOL**-плазмиды **pWVO**, где делеция охватывала бы фрагмент **Hind III-B**. Из этого следует, что на фрагменте **Hind-B** с большой вероятностью может находиться место инициации транскрипции и **TOL**-специфических генов. Подтверждением этого служит еще тот факт, что с РНК-полимеразой связывается и незначительное количество **Xho I-B** фрагмента ДНК **pWVO**. Названный фрагмент на рестрикционной карте частично перекрывает фрагмент **Hind III-B** что способствует более точному определению сайтов связывания полимера-зы.

При параллельном электрофорезе фрагментов, проходящих че-рез поры фильтра, можно количественно определить соотношение их со связанными фрагментами. Как видно из фотографии геля, содержание фрагмента **Hind III-B** на фильтре относительно невелико. В случае больших фрагментов ДНК значительно сни-жается стабильность комплекса РНК-полимераза-ДНК на нитро-целлюлозных фильтрах. По данным Тэйлора и Бургесса (**Taylor, Burgess, 1979**), этот комплекс стабилен лишь для фрагмен-тов менее  $5 \times 10^3$  пар оснований. По-видимому, именно этим объясняется частичное связывание довольно больших фрагментов **TOL**-ДНК в наших опытах.

Нами еще не изучено связывание РНК-полимеразы на малень-ких рестрикционных фрагментах **TOL**-ДНК. Применяемая нами ме-тодика электрофореза в агарозном геле не позволяет анализи-ровать фрагменты менее тысячи пар оснований из-за использо-вания РНК-носителя. Поэтому вопрос о других промоторных уча-стках в **TOL**-плазмиде остается пока открытым. Можно все-та-ки предполагать, что в **TOL**-плазмиде, несмотря на ее большой молекулярный вес, имеется лишь несколько промоторных участ-ков.

Интересные результаты были получены нами и при изучении связывания РНК-полимеразы с интактными молекулами **TOL**-плаз-миды (рис. 2). Из двух форм **TOL**-ДНК, различающихся при гель-электрофорезе, только одна адсорбируется на фильтрах в комп-лексе с полимеразой. Вероятно, здесь наблюдается адсорбция одной формы **TOL**-ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах или, что еще более вероятно, наличие множества неспецифических сай-тов связывания полимеразы, что характерно для суперспирали-зованных форм ДНК. Однако сказанное пока еще слишком дискус-

сионный аргумент для определения молекулярной структуры разных форм TOL -ДНК.

### Выводы

1. РНК-полимераза *E. coli* транскрибирует рWVO и TOL<sup>X</sup> плазмидные ДНК.
2. Установлено связывание РНК-полимеразы *E. coli* на Hind III-В рестрикционных фрагментах TOL<sup>X</sup> ДНК.

### Л и т е р а т у р а

- Виллемс Р.Л.-Э., Хейнару А.Л., Хабиht Я.К. Физическая и генетическая карта TOL-плазмиды рWVO. - В кн.: Плазмиды как векторные молекулы при передаче генетической информации. Тарту, 1979, с. 43-45.
- Хабиht Я.К., Виллемс Р.Л.-Э., Хейнару А.Л., Порс А.Г.-Р. Генетическое и молекулярно-биологическое изучение TOL<sup>X</sup>-плазмиды. - В кн.: Плазмиды как векторные молекулы при передаче генетической информации. Тарту, 1979, с. 145-147.
- Downing R.G., Broda P.A. A cleavage map of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. - *Molec. Gen. Genet.*, 1979, 177, 189-191.
- Downing R.G., Duggleby C.J., Villems R., Broda P. An endonuclease cleavage map of the plasmid рWVO-8, a derivative of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. - *Molec. Gen. Genet.*, 1979, 168, 97-99.
- Duggleby C.J., Baley S.A., Worsey M.J., Williams P.A., Broda P. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in *Pseudomonas*. - *J. Bacteriol.*, 1977, 130, 1274-1280.
- Hansen J.B., Olsen R.H. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids рMG1 and рMG5. - *J. Bacteriol.*, 1978, 135, 227-238.
- Taylor W.E., Burgess R.R. *Escherichia coli* RNA polymerase binding and initiation of transcription of

- fragments of *rif<sup>r</sup>* DNA containing promoters for genes and for *rrnB*, *tufB*, *rplK*, A, *rplJ*, L and *rpoB*, C genes. *Gene*, 1979, 6, 331-365.
- Thompson R., Huges S.G., Broda P. Plasmid identification using specific endonucleases. - *Mol. Gen. Genet.*, 1974, 133, 141-149.
- Williams P.A., Murray K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoate by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. - *J. Bacteriol.*, 1974, 120, 416-423.

ON THE E. COLI RNA-POLYMERASE BINDING SITES  
ON TOL PLASMID DNA

J. Habicht, R. Villems, A. Heinaru

S u m m a r y

Plasmid DNA of TOL degradating strains of *Pseudomonas putida* were isolated in preparative scale. TOL plasmids DNA were studied by restriction endonuclease analyzes and *E. coli* RNA polymerase binding tests. It was found that *E. coli* RNA polymerase efficiently transcribes the pWVO and TOL<sup>X</sup> plasmid DNA in vitro and binds to a nitrocellulose filter as a complex with TOL<sup>X</sup> Hind III-B fragment. This fragment is about 22 kbp and is present in all TOL deletion mutants.

ИЗОФОРМЫ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ У МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ  
ДРОЖЖЕЙ *Candida boidinii* и *Pichia pinus*

Э.Х. Хейнару, Р.О. Кангур

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) в дрожжах встречается в виде нескольких изоферментов, состав которых определяется как видовыми особенностями, так и условиями культивирования. У *Saccharomyces cerevisiae* обнаружено три NAD-зависимых изоформы АДГ - одна из них конститутивная, а образование двух репрессируется глюкозой (Lutstorf, Megnet, 1968; Ciriacy, 1975). У парафинусваивающих дрожжах найдены NAD и NADP-зависимые изоформы АДГ, которые отличались по субстратной специфичности (Сапожникова, Лозинов, 1978; Barth, Künkel, 1979). У *Saccharomyces lipolytica* NAD-зависимая и две NADP-зависимые изоформы АДГ лучше реагируют с первичными спиртами длинной углеродной цепи (октанол) чем короткими цепями (этанол, метанол), а одна из NADP-зависимых изоформ с одинаковой эффективностью окисляет метанол, этанол и октанол (Barth, Künkel, 1979).

NAD-зависимые АДГ из различных источников, в том числе из дрожжей, реагируют с метанолом значительно хуже, чем с этанолом (Mani et al., 1970) и в окислении метанола у метанол-усваивающих дрожжей NAD-зависимая алкогольдегидрогеназа, очевидно, не участвует (Sahn, Wagner, 1973). Однако бесклеточные экстракты нескольких метанолусваивающих дрожжей катализируют восстановление NAD в присутствии метанола, что дает основание предполагать наличие АДГ видоизмененной субстратной специфичности (Mehta 1975a; 1975b; Симискер и др., 1977; Егоров и др., 1977). Данные об изоферментном составе АДГ и их субстратной специфичности у метанолусваивающих дрожжей отсутствуют.

В настоящей работе представлены результаты исследований изоферментного состава АДГ у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* и *Pichia pinus* при различных режимах выращивания.

## Материал и методика

Объектами исследования явились метанолусваивающие дрожжи *Candida boidinii* и *Pichia pinus* из коллекции ВНИИГЕНЕТИКА.

Дрожжи выращивали при постоянной аэрации с продуванием стерильного воздуха на среде следующего состава (в г/л):  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  - 5,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 0,1 с добавкой микроэлементов и витаминов. В качестве источника углерода и энергии в вышеуказанную среду добавляли глюкозу (20 г/л), этанол (10 г/л) или метанол (7 мл/л).

Для приготовления бесклеточных экстрактов клетки удаляли из среды в середине логарифмической фазы роста и промывали дважды трис- $\text{HCl}$  буфером, pH 7,9. Промытые клетки разрушали прессом Hughes при  $-30^\circ\text{C}$ . Неразрушенные клетки и клеточные осколки удаляли центрифугированием в течение 20 мин при  $16000 + 2^\circ\text{C}$ .

Изоформы алкогольдегидрогеназы разделяли по Девису (Davis, 1964), используя прибор ПЭФА - I. Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле в щелочных условиях (трис- $\text{HCl}$  - буфер, pH 8,9) при температуре  $4^\circ\text{C}$  и силе тока 4мА на одну трубку в течение 90 мин. Инкубационная смесь для проявления гелей содержала 50 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7,9,  $\text{NAD} - 0,333$  мМ, феназинметасульфат - 0,01%, нитросиний тетразолий - 0,01% и метанол или этанол - 33,3 мМ. Для проявления контрольных гелей исключали субстрат.

## Результаты и обсуждение

Изоферментный спектр АДГ у *C. boidinii* и *P. pinus* зависит от источника углерода в среде.

В клетках обоих видов дрожжей, выращенных на среде с глюкозой практически вся алкогольдегидрогеназная активность сосредоточена в одну изоформу АДГ, имеющую полосу на электрофореограммах с Rf 0,24. (рис. 1). Полосы с Rf 0,36 у *C. boidinii* и с Rf 0,36 и 0,46 у *P. pinus* окрашиваются на электрофореограммах очень слабо, что говорит о незначительном содержании этих изоформ в клетках при росте на среде с глюкозой. Следовательно, у *C. boidinii* и *P. pinus* имеется одна изоформа АДГ, образование которой не репрессирована глюкозой. Не исключено, что у *C. boidinii* отмеченная нами изо-

форма с Rf 0,24 не является гомогенной, а состоит из двух белков с близкой электрофоретической подвижностью.

У *P. pinus* при переходе от использования глюкозы на использование этанола число изоформ АДГ не увеличивается (рис. 1). По-видимому, в усвоении этанола у *P. pinus* участвует только нерепрессируемая глюкозой изоформа АДГ с Rf 0,24. У *S. bovidinii*, выращенной на среде с этанолом, на электрофореограммах значительно увеличивается по сравнению с ростом на глюкозе окрашивания полосы с Rf 0,36. Следовательно, переход клеток *S. bovidinii* от использования глюкозы на использование этанола сопровождается активацией образования изоформы АДГ. Эта изоформа АДГ (Rf 0,36), а также нерепрессируемая глюкозой изоформа АДГ (Rf 0,24) обнаруживается и в клетках *S. bovidinii* выращенных на среде с метанолом. Кроме вышеуказанных изоформ (Rf 0,36 и 0,24), в клетках *S. bovidinii* выращенных на среде с метанолом, обнаружена и изоформа с Rf 0,32 (рис. 3). В клетках *P. pinus* выращенных на среде с метанолом, обнаруживается нерепрессируемая глюкозой изоформа АДГ (Rf 0,24) и появляются изоформы с Rf 0,27; 0,32 и 0,43, образования которых не наблюдали при росте на среде с этанолом.

Все выше рассмотренные изоформы АДГ *S. bovidinii* и *P. pinus* активно восстанавливают нитросиний тетразолий в присутствии этанола, но окрашивание полос этих изоформ АДГ в присутствии метанола незначительно (рисунок). Последний факт указывает на низкое сродство этих изоформ АДГ к метанолу. По субстратной специфичности эти изоформы АДГ являются типичной NAD-зависимой алкогольдегидрогеназой (EC I.1.1.1), слабо реагирующей с метанолом. Учитывая их низкое сродство к метанолу, они, по-видимому, не играют существенной роли в усвоении метанола как единственного источника углерода и энергии.

Кроме вышеуказанных изоформ АДГ, у обоих видов дрожжей, выращенных на среде с метанолом, на электрофореограммах обнаружили две полосы с Rf 0,04 и 0,09, которые активно восстанавливают нитросиний тетразолий в присутствии метанола как субстрата. Полоса с Rf 0,04 проявляется только в присутствии метанола и почти не проявляется в присутствии этанола. Это указывает на то, что с переходом клеток на использование метанола индуцируется синтез двух белков, способных катализировать перенос водорода от метанола к нитросинему тетразолию. Но электрофорез очищенного препарата алкогольоксидазы

показал, что этот фермент дает полосы примерно в той же зоне, где находятся вышеуказанные дегидрогеназы, и не исключено, что окисление метанола и окрашивание геля здесь катализируется оксидазой. Восстановление нитросинего тетразолия на гелях очищенного препарата алкогольоксидазы в присутствии метанола не требует наличия NAD. Следовательно, электрофоретическое разделение изоформ АДГ не позволяло выявить NAD-зависимых дегидрогеназ, которые индуцируются ростом на среде с метанолом.

### Л и т е р а т у р а

- Дудина Л.П., Сукатова Г.В., Ерошин В.К. Обнаружение индуцибельной метанодегидрогеназы в дрожжах *Hansenula polymorpha* DL- В сб.: Рост микроорганизмов на C<sub>1</sub>-соединениях. Пушино, 1977, 90-91.
- Егоров А.М., Авилова Т.В., Платоненкова Л.С., Карзанов В.В., Говорёв Н.Н., Егорова О.А., Егоров Н.С., Березин И.В. О биосинтезе дегидрогеназ окисляющих C<sub>1</sub>-соединения. - В сб.: Рост микроорганизмов на C<sub>1</sub>-соединениях. Пушино, 1977, 88-89.
- Сапожникова Г.П., Лозинов А.Б. Активность алкогольдегидрогеназ субклеточных фракций дрожжей *Toxalopsis candida* выращенных на глюкозе и гексадекане. - Микробиология, 1978, 47, 682-688.
- Симискер Я.А., Микельсаар С.К., Хейнару Э.Х. Окисление метанола NAD-специфической метанолусваивающих дрожжей. - Микробиология, 1977, 46, 169-171.
- Giriacy, M. Genetics of alcohol dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Isolation and genetic analysis of adh mutants. Mut. Res., 1975, 29, 315 - 326.
- Barth, G., Künkel, W. Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeasts. *Saccharomyces lipolytica*. Z. Allg. Mikrobiol., 1979, 19, 381-390.
- Davis, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427.
- Lustorf, U., Menget, R. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. Arch. Biol. chem. Biophysics, 1968, 126, 933-944.

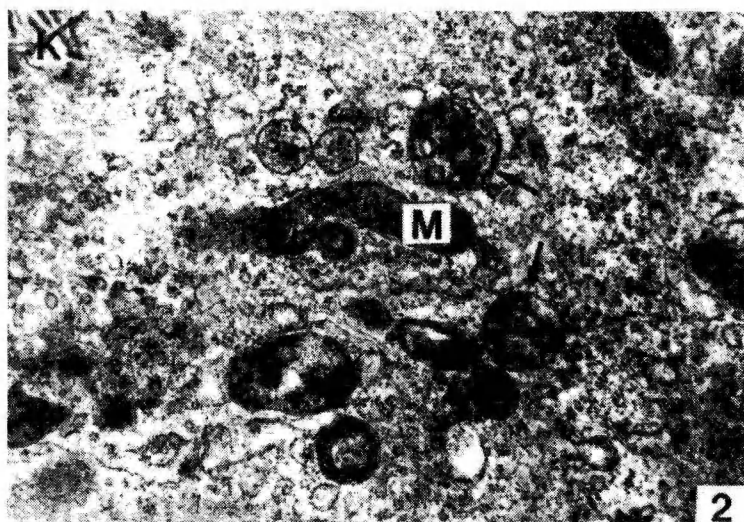
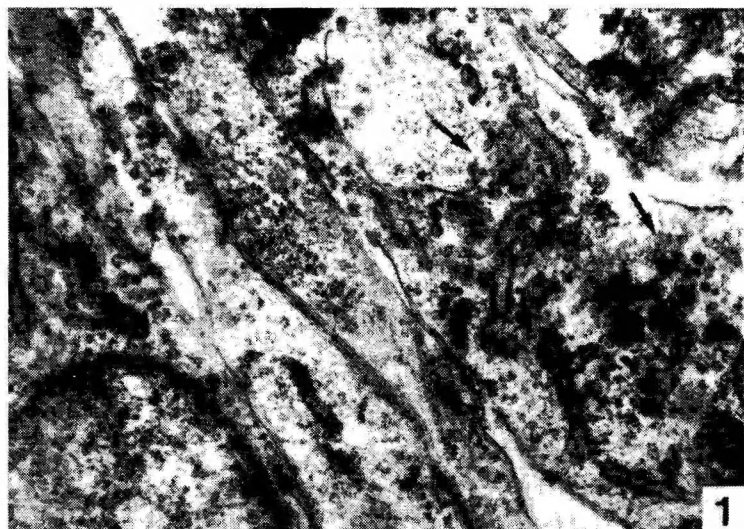
- Mani, J.-C., Pietruszko, R., Theorell, H. Methanol activity of alcohol dehydrogenases from human liver, horse liver and yeast. Arch. Biochem. Biophys., 1970, 140, 52-59.
- Mehta, R.J. Demonstration of methanol dehydrogenase in methanol assimilating yeast. Experientia, 1975a, 31, 407-408.
- Mehta, R.J. Pyridine nucleotide - linked oxidation of methanol in methanol - assimilating yeasts. J. Bacteriol., 1975b, 124, 1165-1167.
- Sahm, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem., 1973a, 36, 250-256.

ISOFORMS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN METHANOL-ASSIMILATING  
YEASTS *Candida boidinii* AND *Pichia pinus*

E.H. Heinaru, R.O. Kangur

S u m m a r y

Heterogeneity of the NAD-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) was studied by means of polyacrylamide gelelectrophoresis in the cell-free extracts of methanol-utilizing yeasts. The occurrence of the NAD-dependent ADH isoforms was regulated by the carbon source of the medium. In *C. boidinii* and *P. pinus* only one isoenzyme was not subjected to glucose repression. This constitutive ADH band is very probably formed by two ADH enzymes with similar electrophoretic mobility. During the growth of *C. boidinii* and *P. pinus* cells in the media containing ethanol or methanol some differences were observed in the spectrum of ADH. Two methanol inducible ADH having a low electrophoretic mobility and different substrate specificity with ethanol and methanol was observed.



**Подписи к рисункам статьи Т. Вейдебаума и Ю. Кярнера «Селективность аутофагоцитоза под влиянием разных антиметаболитов»**

Рис. 1. Разложение цистерн шероховатой эндоплазматической сети под влиянием трехчасового прижизненного окрашивания нейтральным красным. Стрелки указывают на мелкие пузырьки и облака аморфного электронноплотного вещества. Фибробластоподобные клетки курицы на 2 сут после посева. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 24\ 000$ .

Рис. 2. Многочисленные аутофагосомы с интактными цистернами (стрелки) 0,5 ч, после добавления актиномицина Д в питательную среду. Фибробластоподобные клетки курицы на 2 сут после посева. М — митохондрии; К — коллаген. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 24\ 000$ .

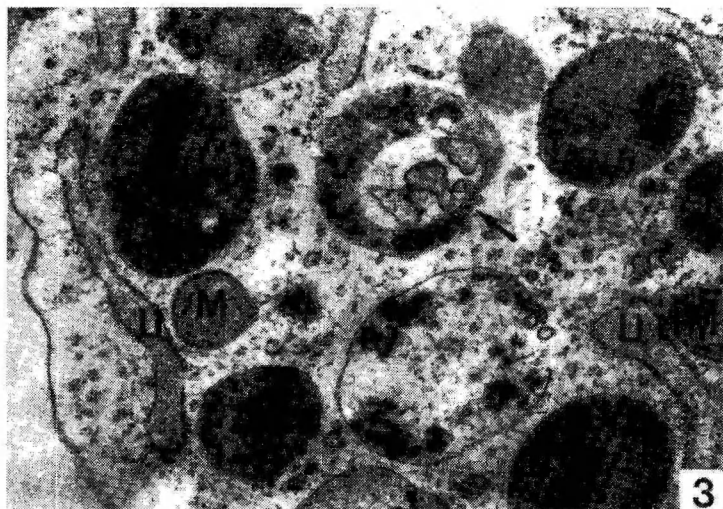


Рис. 3. Тело- и аутолизосомы после трехчасового опыта с актиномицином Д. Стрелки указывают на гибридную структуру, где, по-видимому, происходит слияние аутофагосомы с телолизосомой. Ц — цистерны шероховатой эндоплазматической сети; М — митохондрии. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 30\ 000$ .

Рис. 4. Крупные аутофагосомы (А) в фибробластоподобной клетке после удаления из среды актиномицина Д. Стрелки указывают на возможную их связь с телолизосомами. Я — ядро; К — коллаген. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 30\ 000$ .

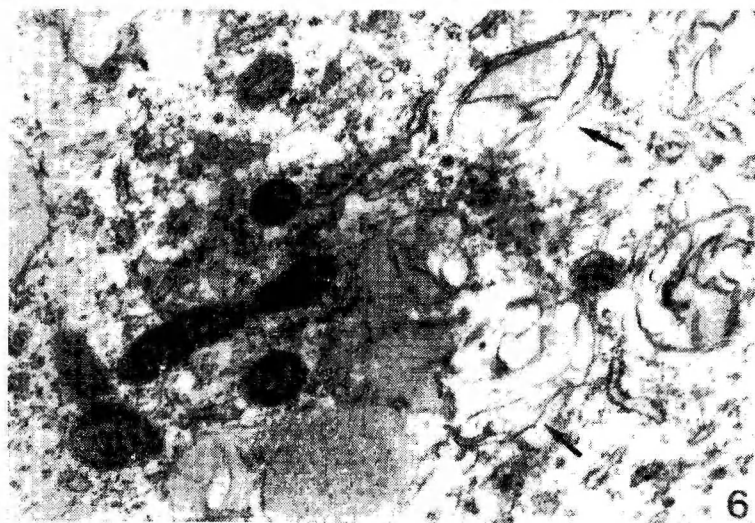
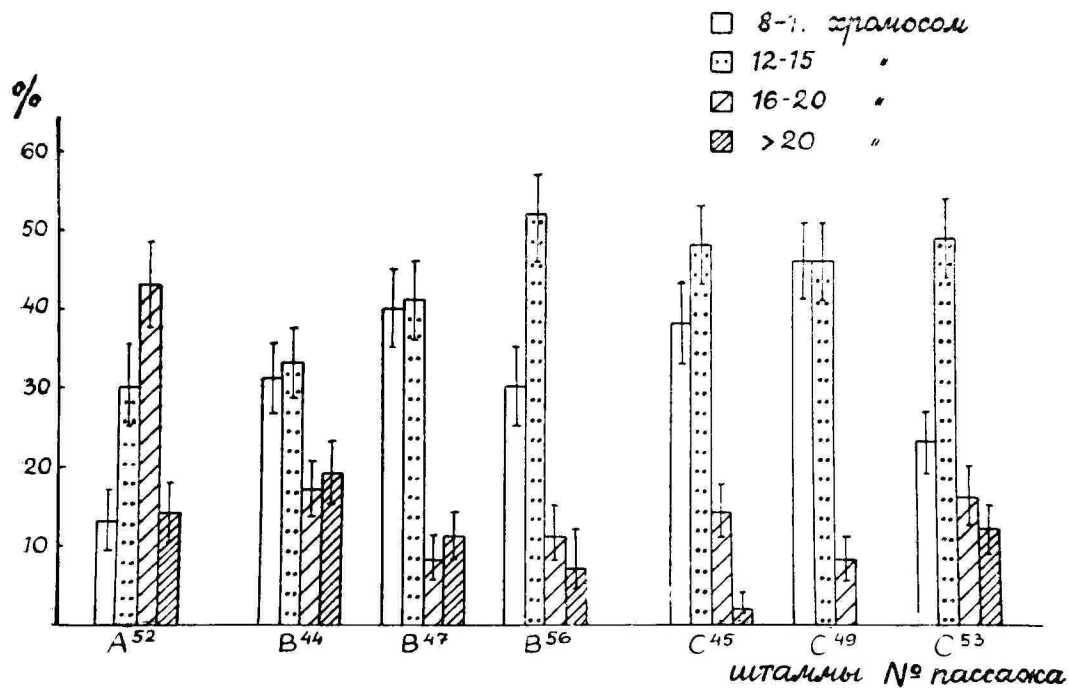


Рис. 5. Скопление мелких пузырьков с плотной сердцевиной в фибробластоподобной клетке в опыте с колхицином (3 ч.). Скопление частично окружено мембраной. Крупные липидные включения и меланоидные фигуры (стрелки) в цитоплазме. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 30\ 000$ .

Рис. 6. Липидные включения с рыхлыми меланоидными фигурами (стрелки) в цитоплазме фибробластоподобной клетки в опыте с колхицином (3 ч.). Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 24\ 000$ .



Подписи к рисункам статьи Х. Каллак «О кариотипической дифференцировке калусных клеток в длительной культуре»

Рис. 1. Соотношение (%) разноплодных метафаз в калусных штаммах гаглопашуса.

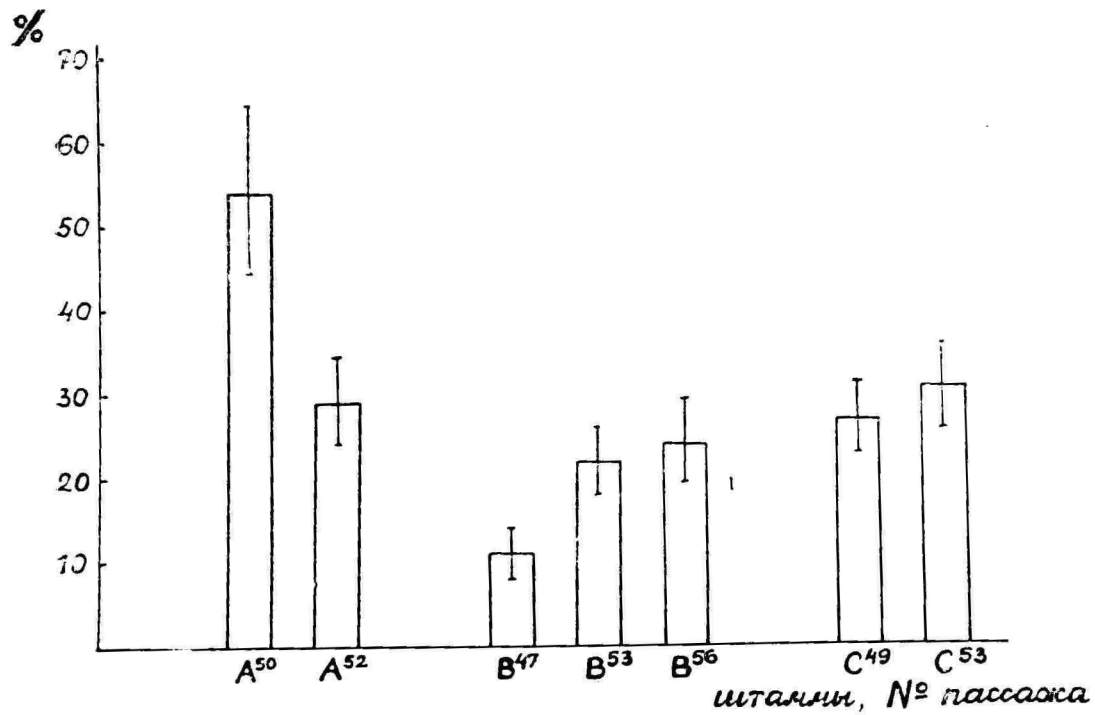


Рис. 2. Частота (%) aberrативных ана- и телофаз в каллусных штаммах гаплопаннуса.

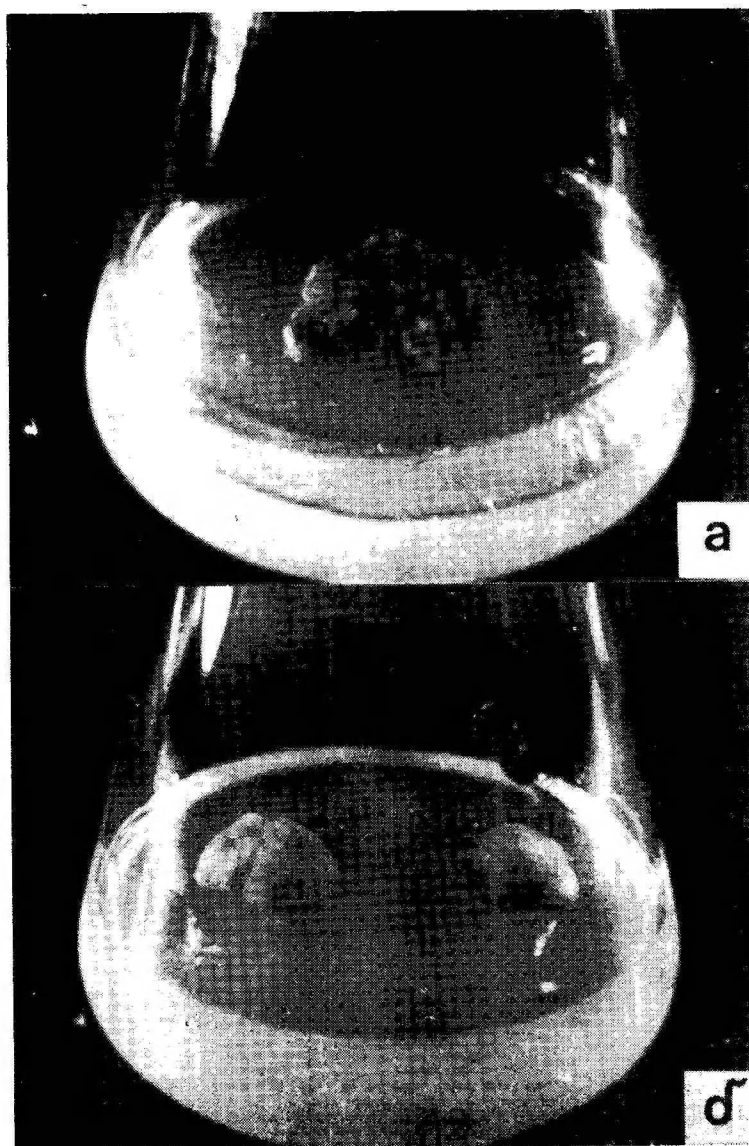


Рис. 3. Основные типы роста каллуса гороха: а) бугорчатый, б) подушечно-видный.

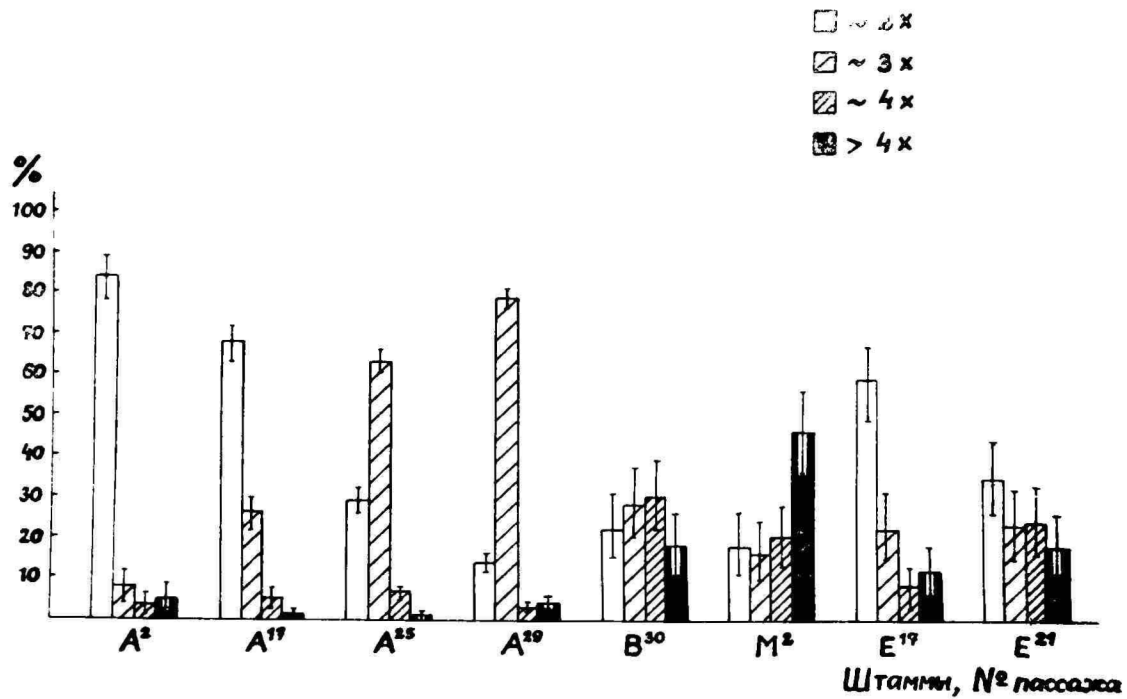


Рис. 4. Соотношение (%) разноплоидных метафаз в калусных штаммах гороха.

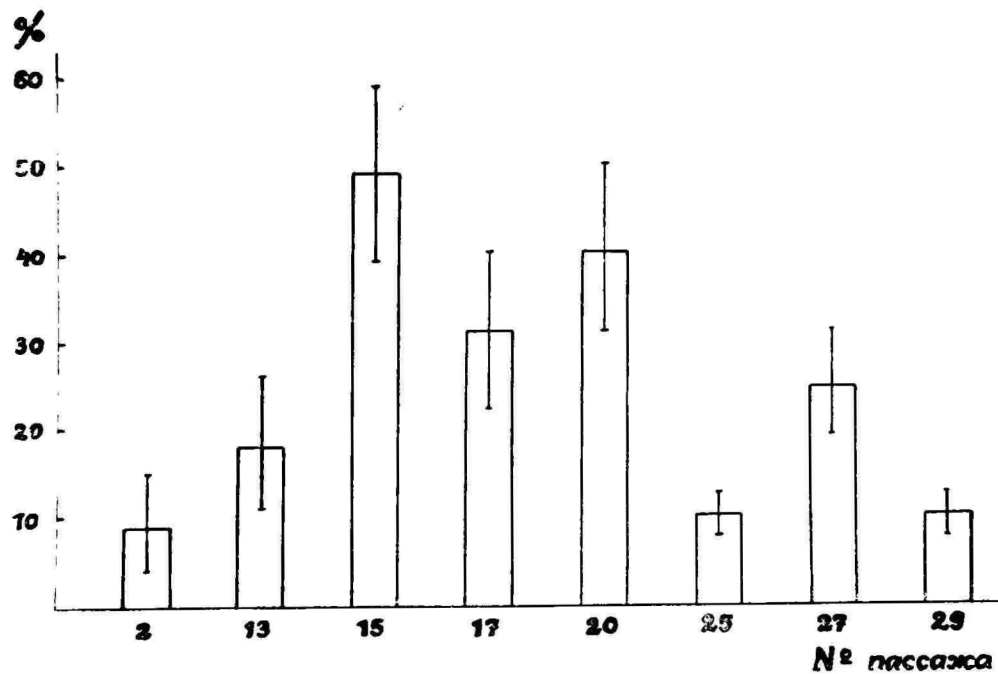


Рис. 5. Динамика частоты (%) aberrативных ана- и телофаз в каллусе гороха (штамм А).



Рис. 6. Модальные кариотипы калусных клеток гороха в штамме А: а) диплоидный набор ( $\times 3150$ ), б) гипертриплоидный набор ( $\times 2740$ ).

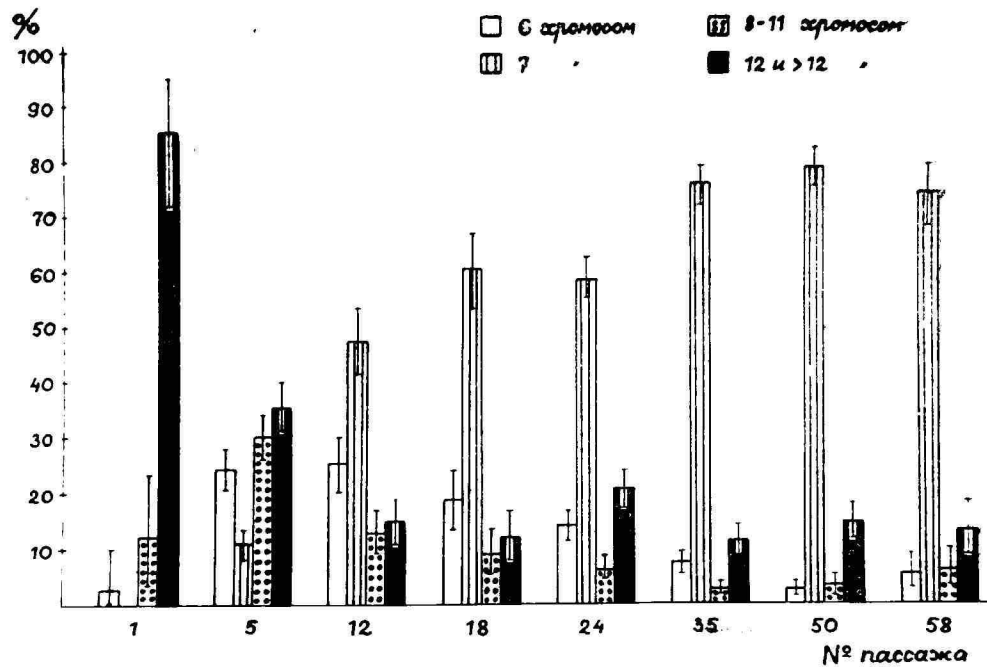


Рис. 7. Динамика соотношения (%) разноплондных метафаз в каллусе креписа (штамм Г).

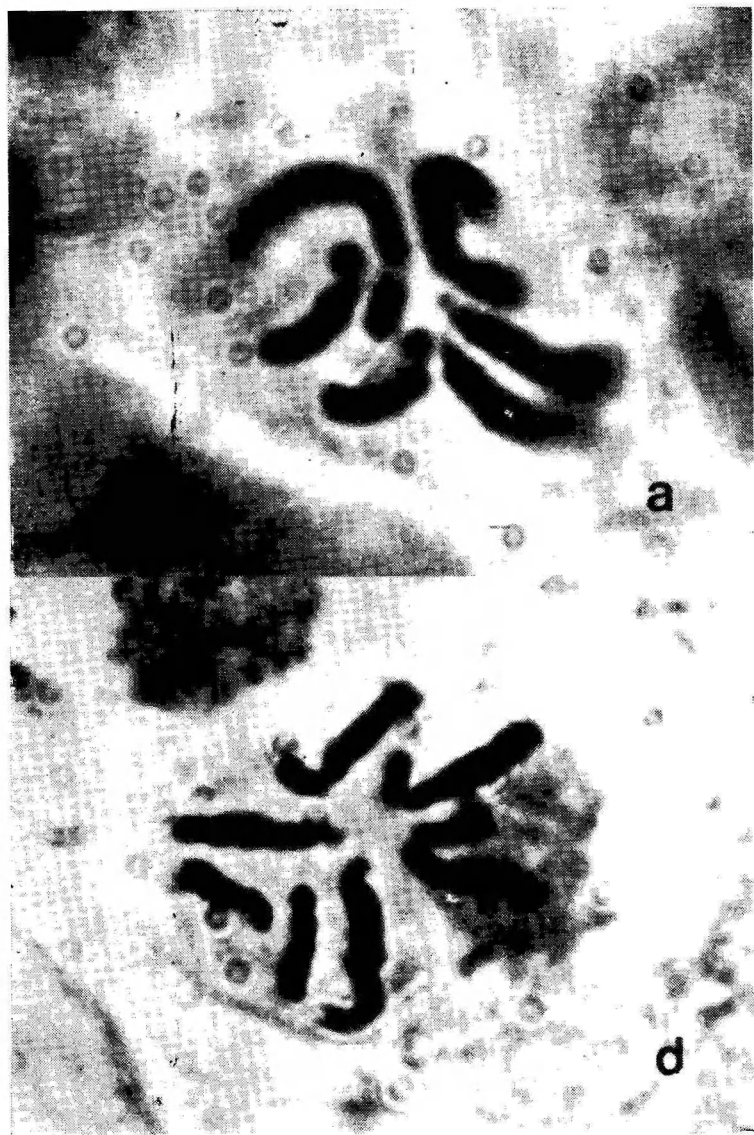


Рис. 8. Карiotипы калусных клеток клевера: а) диплоидный набор, б) анеуплоидный набор с aberrативной хромосомой.  $\times 2500$ .

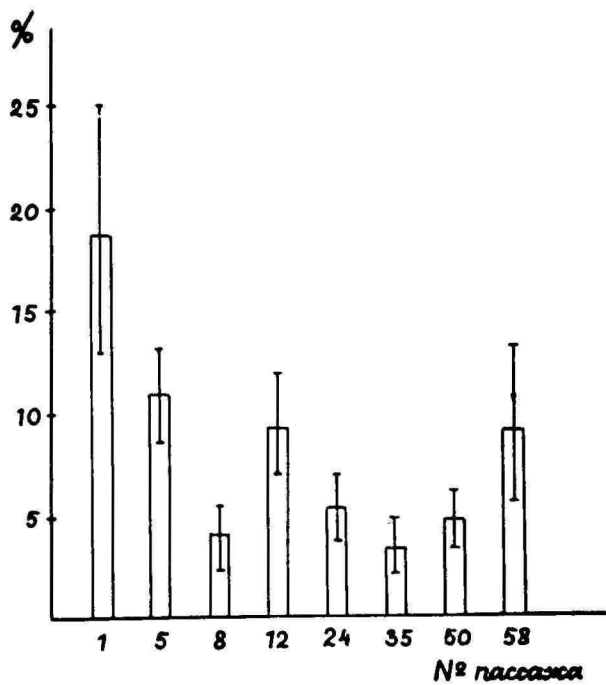
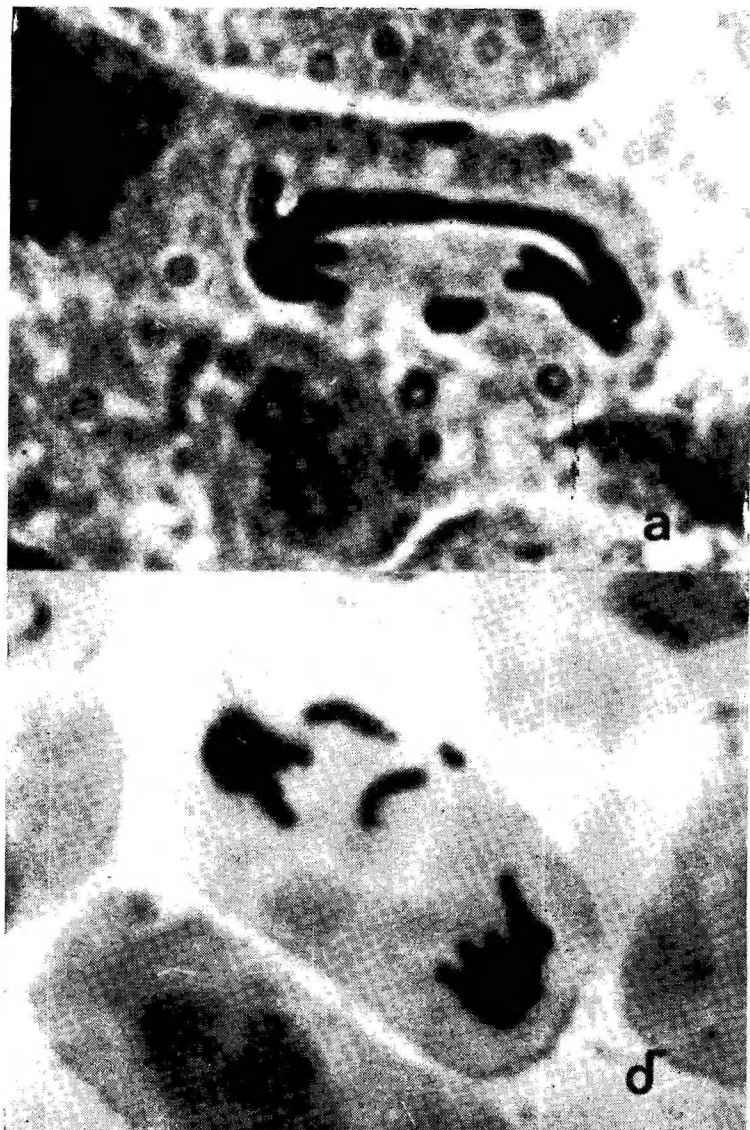


Рис. 9. Динамика частоты (%) aberrативных ана- и телофаз в каллусе креписа (штамм Г).



Рис. 10. Клетки в каллусе креписа (штамм А): а) полиплоидная метафаза с абберантными хромосомами, б) абберантная анафаза.  $\times 2800$ ,



Подписи к рисункам статьи Х. Каллак и М. Ваппер «Сравнение цитогенетической активности 2,4-Д *in vivo* и *in vitro* на примере тканей *Crepis capillaris*»

Рис. 1. Аберративное расхождение хромосом в клетках креписа: а) анафаза с мостиком и фрагментом ( $\times 3020$ ), б) телофаза с отставшими хромосомами и фрагментом.  $\times 2520$ .



Рис. 2. Кариотипы в каллусных клетках креписа: а) диплоидный, б) анеуплоидный с aberrативной хромосомой.  $\times 2600$ .

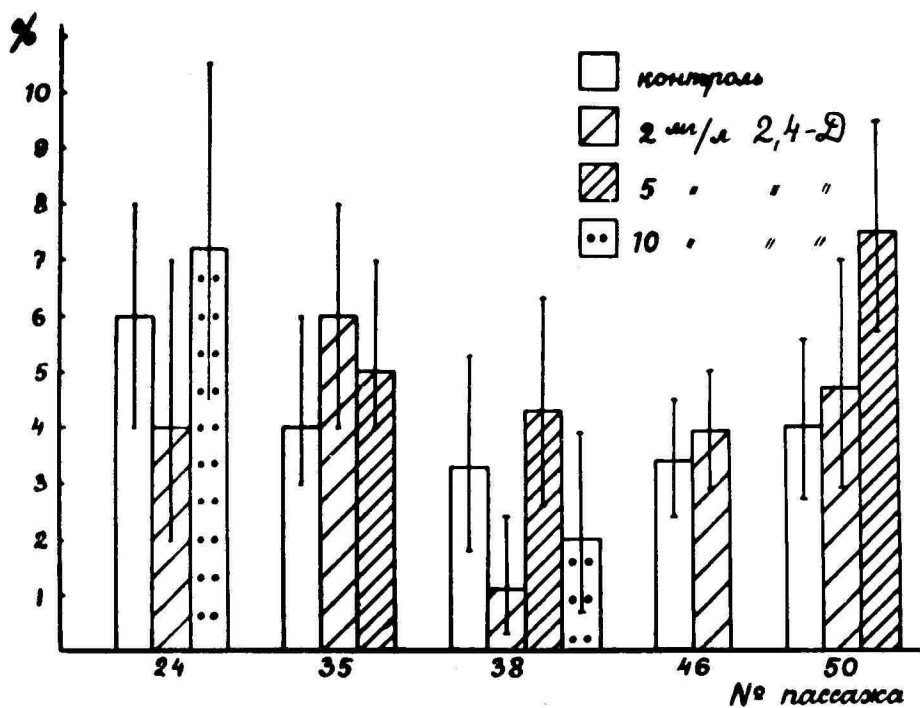


Рис. 3. О воздействии 2,4-Д на частоту (%) aberrативных ана- и телофаз в каллусных клетках креписа.

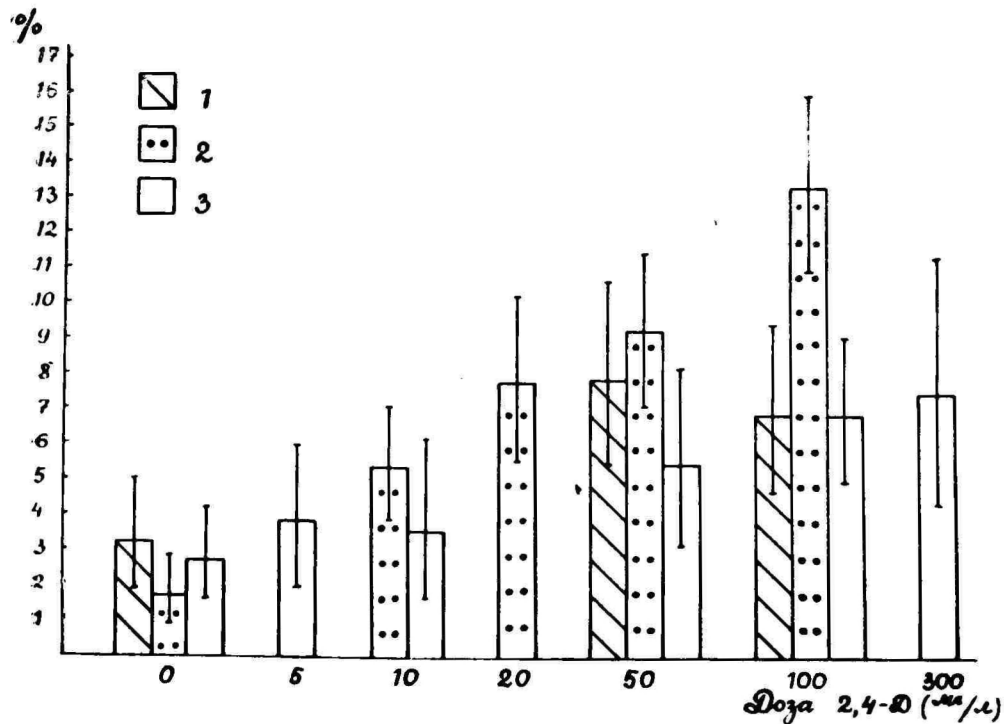


Рис. 4. О воздействии 2,4-Д на частоту (%) aberrативных ана- и телофаз в меристематических клетках первичных корешков клеписа. 1 — действие 2,4-Д на воздушно-сухие семена в течение 12 часов; 2 — действие 2,4-Д на прорастающие семена в течение 12 часов; 3 — действие 2,4-Д на прорастающие семена в течение 4 часов.

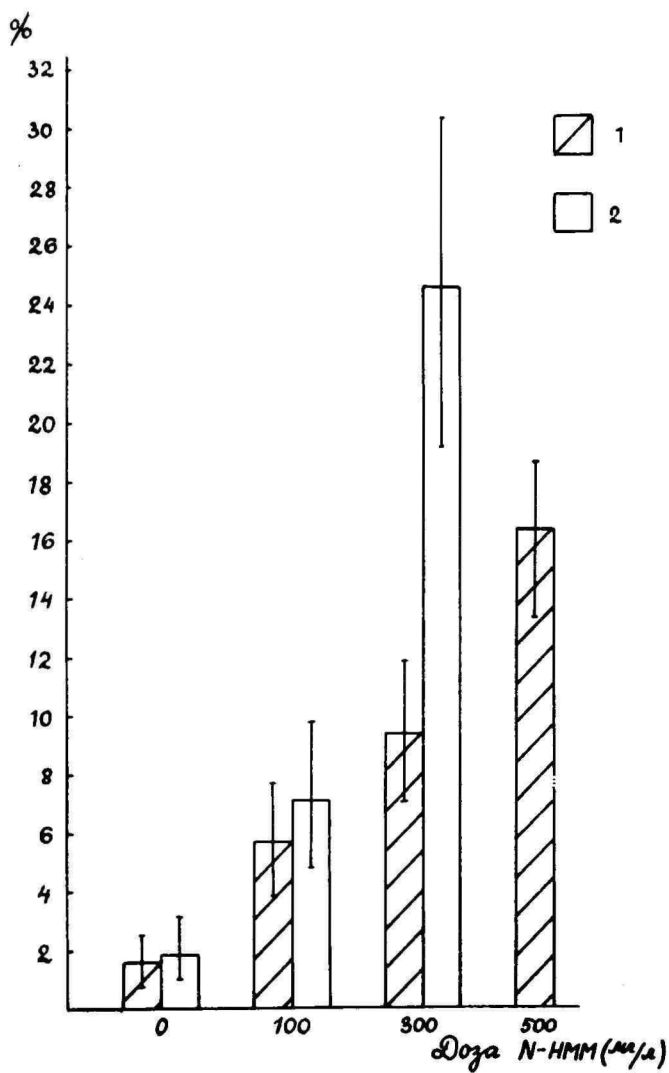


Рис. 5. О воздействии НММ на частоту (%) aberrативных ана- и телофаз в меристематических клетках первичных корешков чечевицы. 1 — воздушно-сухие семена; 2 — прорастающие семена.

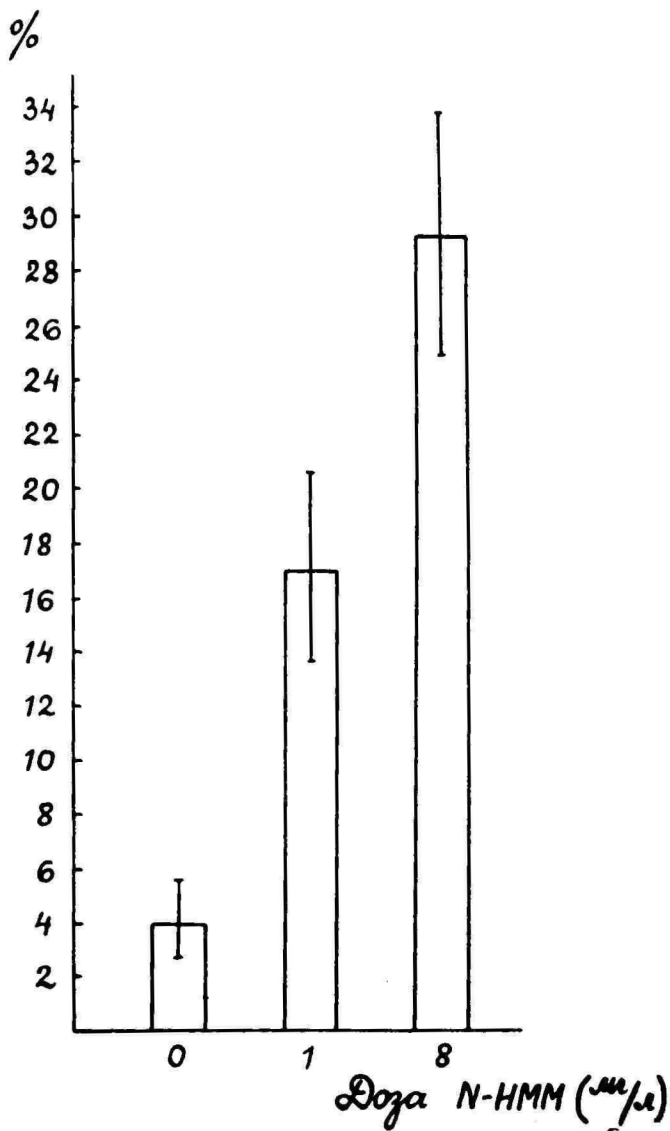


Рис. 6. О воздействии НММ на частоту (%) aberrативных ана- и телофаз в каллусных клетках креписа.

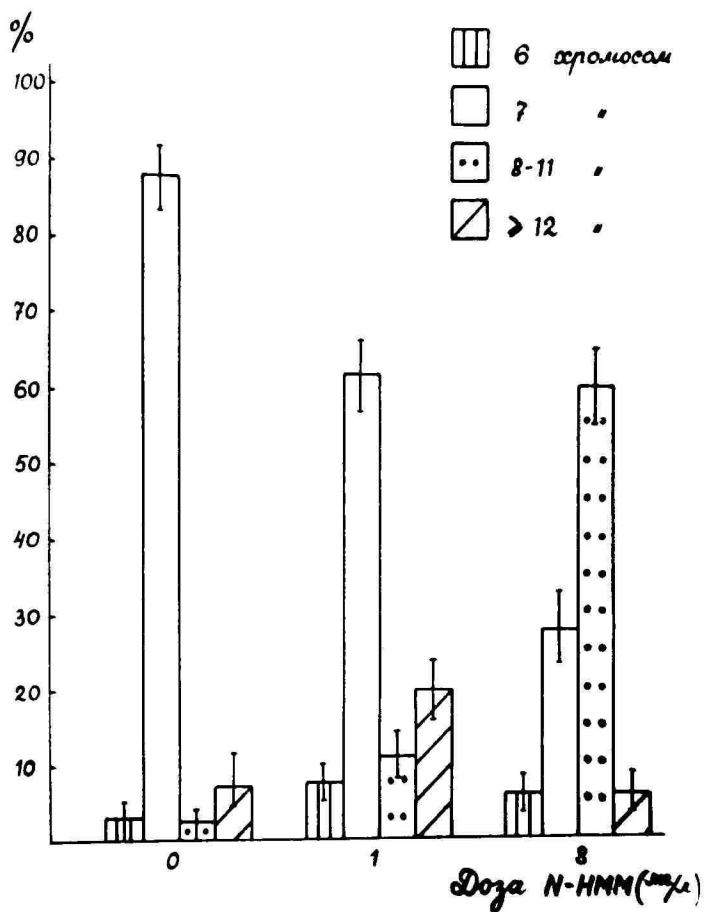


Рис. 7. О воздействии НММ на соотношение (%) разноплодных клеток в каллусной культуре креписа.

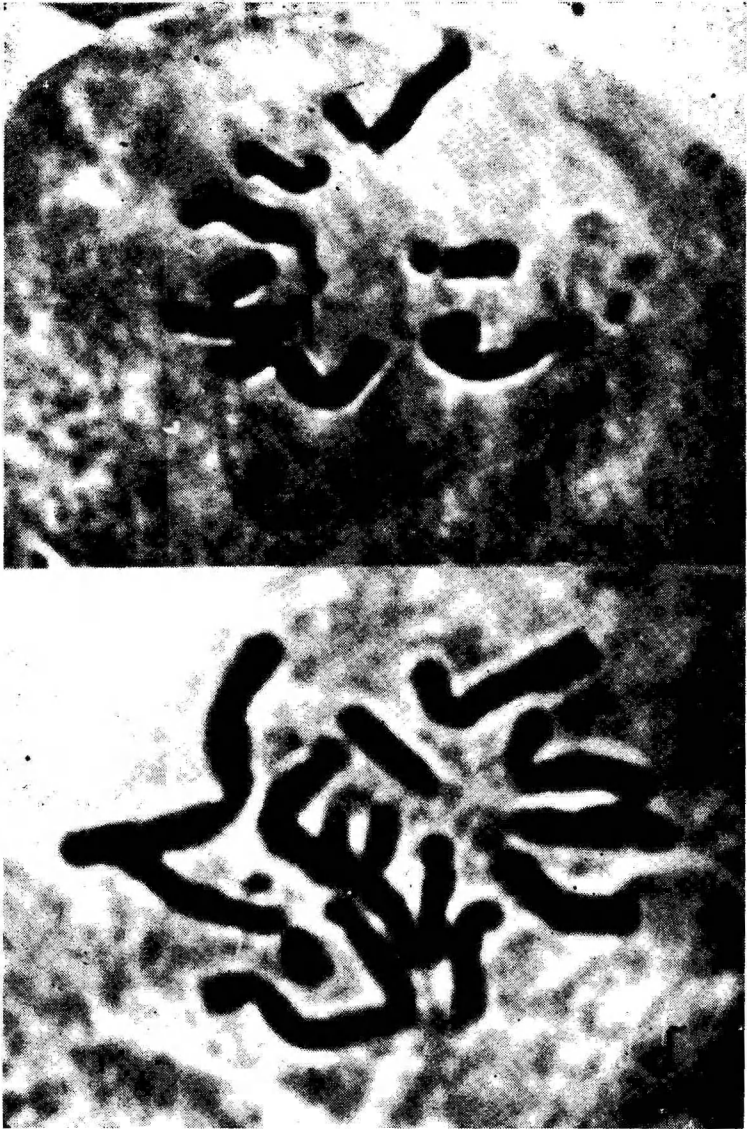
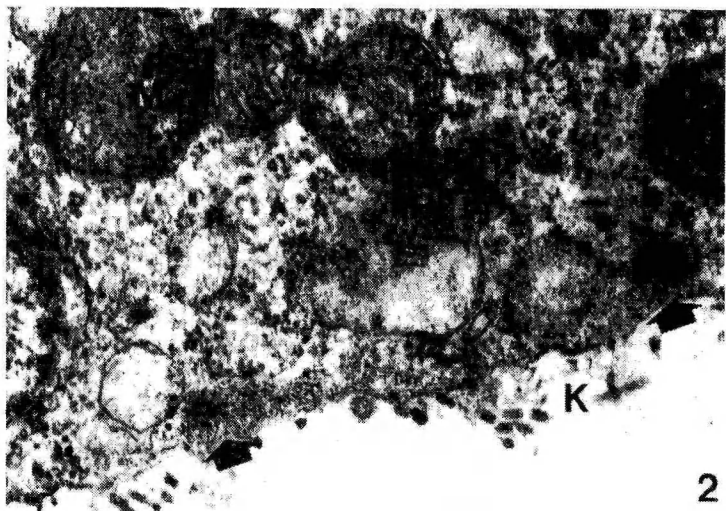
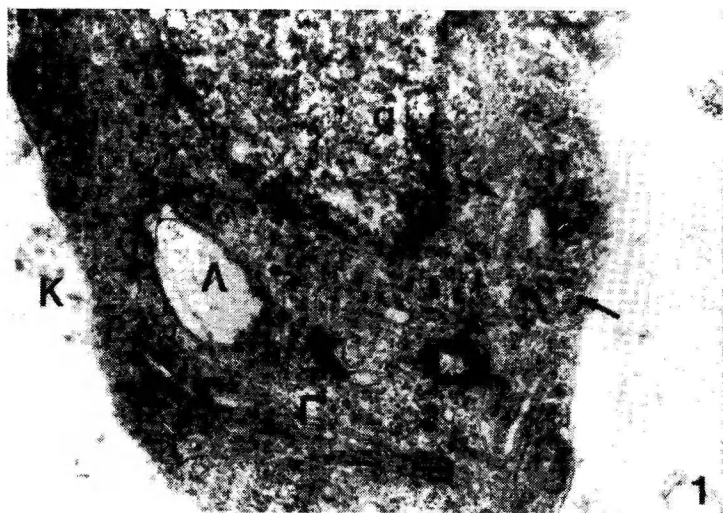


Рис. 8. Метафазы со структурными мутациями в калусных клетках креписа, появляющимися под воздействием НММ: а)  $2n=8$  ( $\times 2340$ ), б)  $2n=14$  ( $\times 2700$ ).



Подписи к рисункам статьи Ю. Кярнера «Явление аутофагоцитоза при переводе клеток в тканевую культуру»

Рис. 1. Фибробласт из подкожной соединительной ткани 9-суточного эмбриона курицы. Стрелки указывают на микротрубочки. Я — ядро; С — шероховатая эндоплазматическая сеть; Г — комплекс Гольджи; Л — лизосома; К — коллаген. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 24\ 000$ .

Рис. 2. Пучки микрофиламентов (стрелки) под плазматической мембраной в фибробласте эмбриона курицы. М — митохондрии; К — коллаген. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 75\ 000$ .

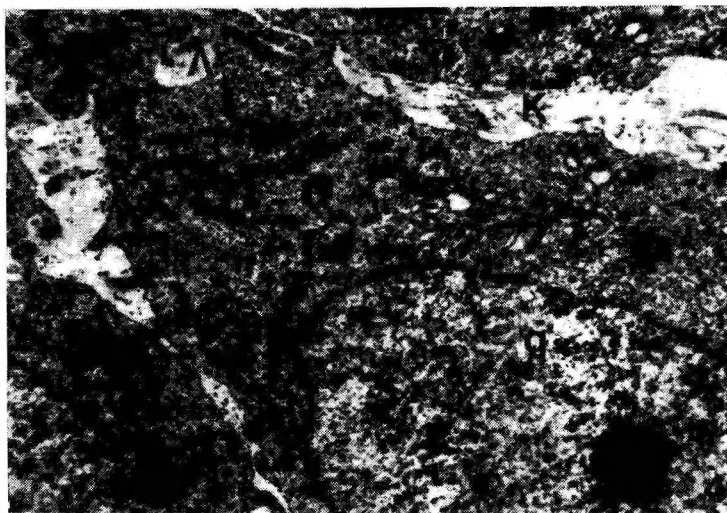
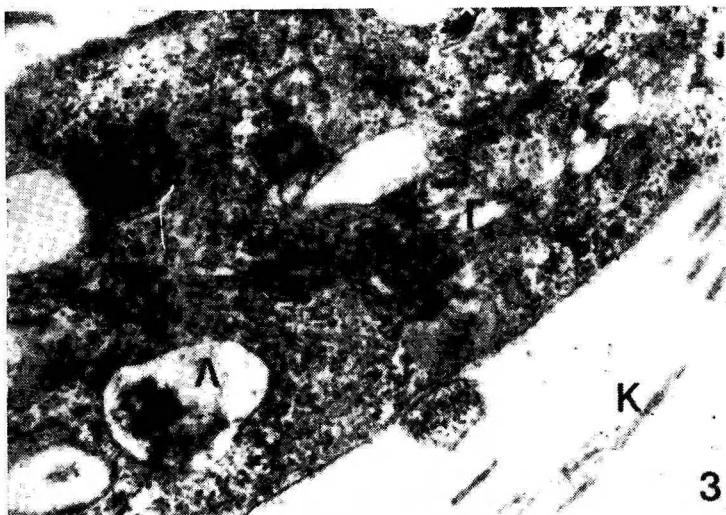


Рис. 3. Фибробласт из подкожной соединительной ткани 9-суточного эмбриона курицы. Стрелки указывают на аутофагосому. Г — комплекс Гольджи; Л — лизосома; М — митохондрии; К — коллаген. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 36\ 000$ .

Рис. 4. Фибробласты из подкожной соединительной ткани 9-суточных эмбрионов курицы после трипсинизации и последующего центрифугирования. Обозначения как на рис. 1.  $\times 14\ 000$ .

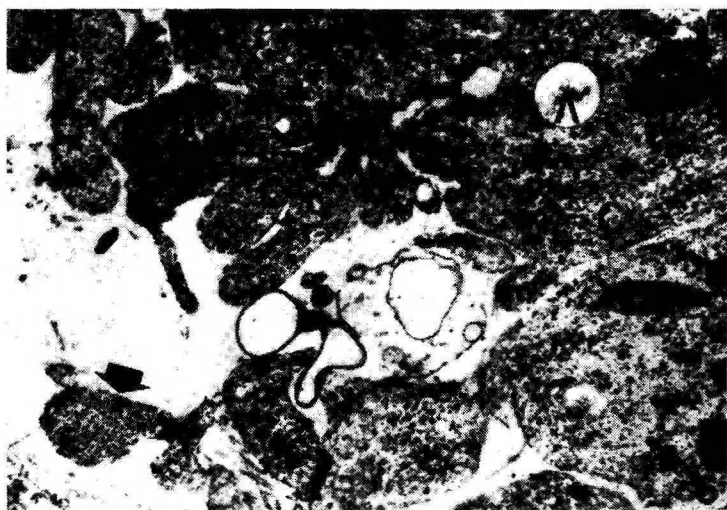
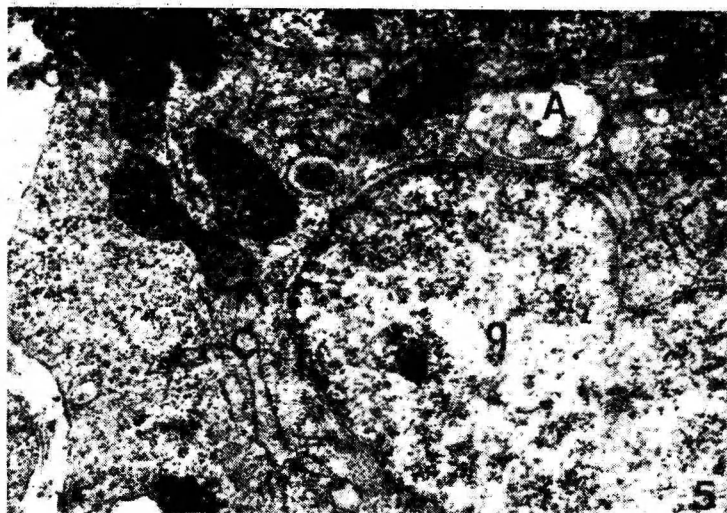


Рис. 5. Фибробласты после диссоциации и центрифугирования. А — аутофагосома. Другие обозначения как на рис. 1.  $\times 20\ 000$ .

Рис. 6. Округлые выросты, наполненные рибосомами, на поверхности фибробластов после их диссоциации и центрифугирования. После очевидного отрыва выроста рибосомы видны в виде моносом (стрелок). Между выростами мембранный дебрис. Остальные обозначения как на рис. 1. Глутаральдегид-тетраоксид осмия.  $\times 14\ 000$ .

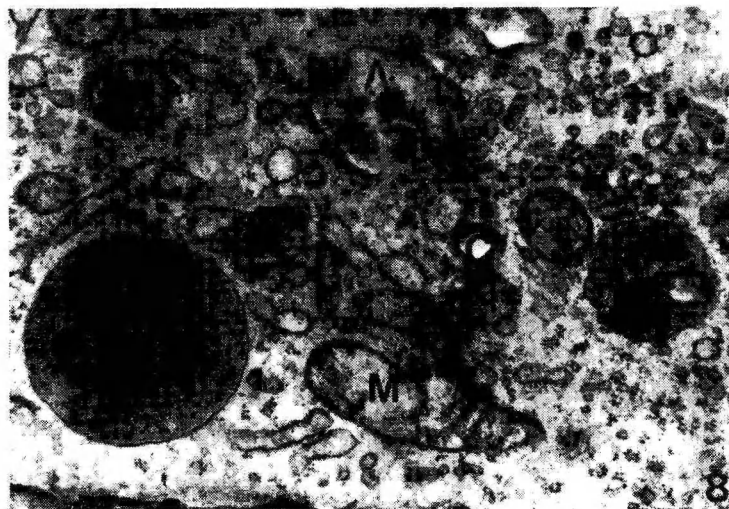
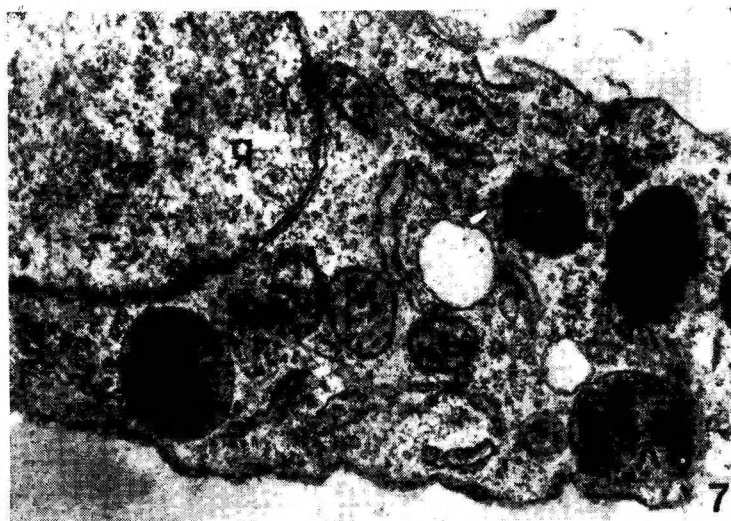
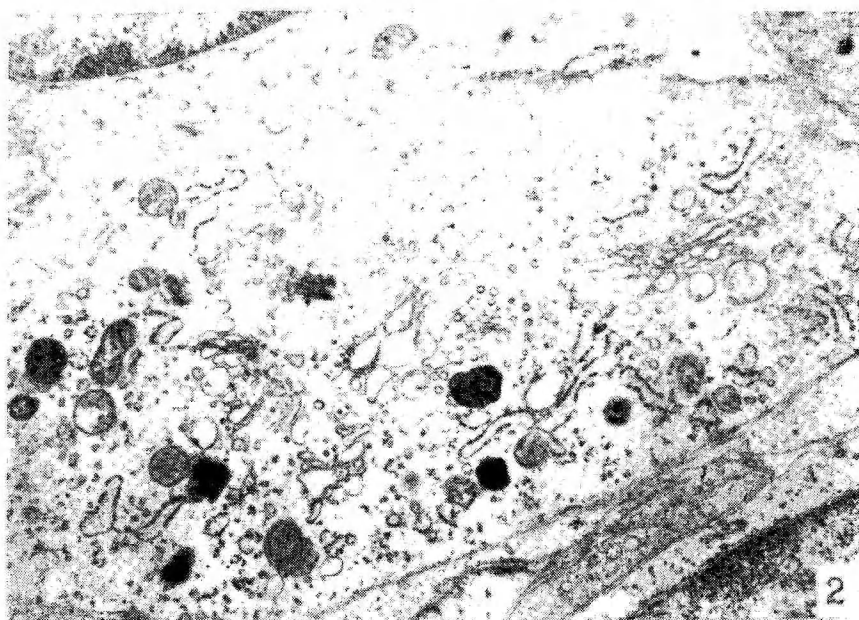
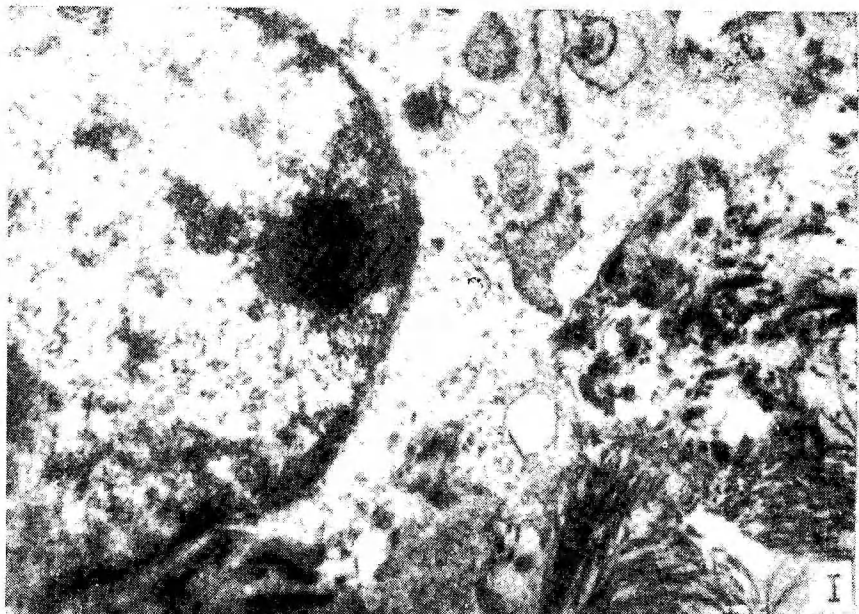


Рис. 7 и 8. Фибробласты, прикрепленные и расплавленные по стеклу, на второй день после посева. Обозначения как на рис. 1 и 2. Глутаральдегид-тетраоксид осмия. Рис. 7 —  $\times 22\ 000$ ; рис. 8 —  $\times 28\ 000$ .



Подписи к рисункам статьи А. Пийрсоо «Изучение стромальных клеток кровеносной ткани в тканевой культуре»

Рис. 1. Фибробласт с межклеточными коллагеновыми волокнами.  $\times 12\,000$ .

Рис. 2. Цитоплазма ретикулярной клетки.  $\times 9000$ .

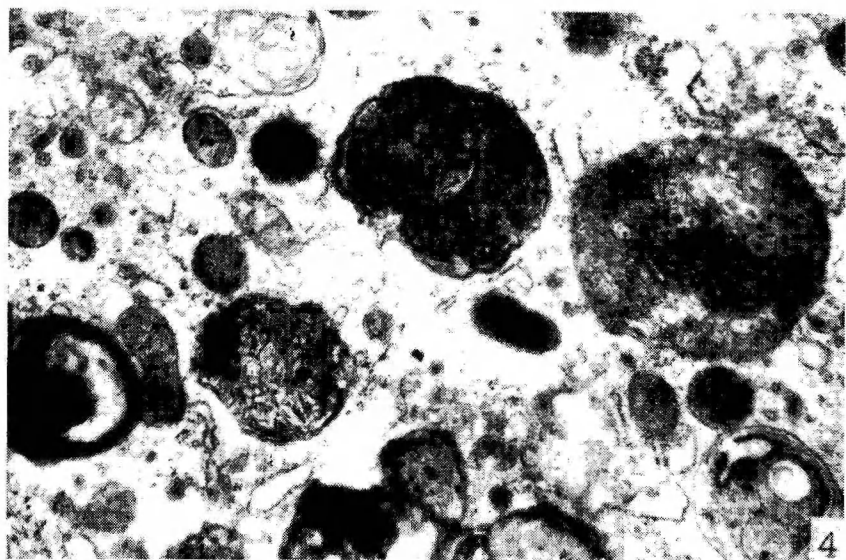
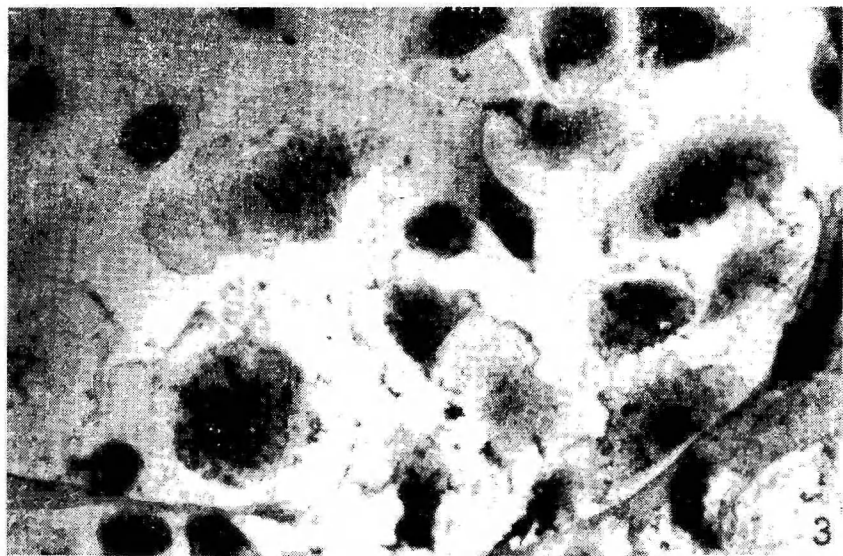


Рис. 3. Распластанные мононуклеарные фагоцитозы.  $\times 1400$ .

Рис. 4. Цитоплазма высокодифференцированного мононуклеарного фагоцита.  
 $\times 18\ 000$ .

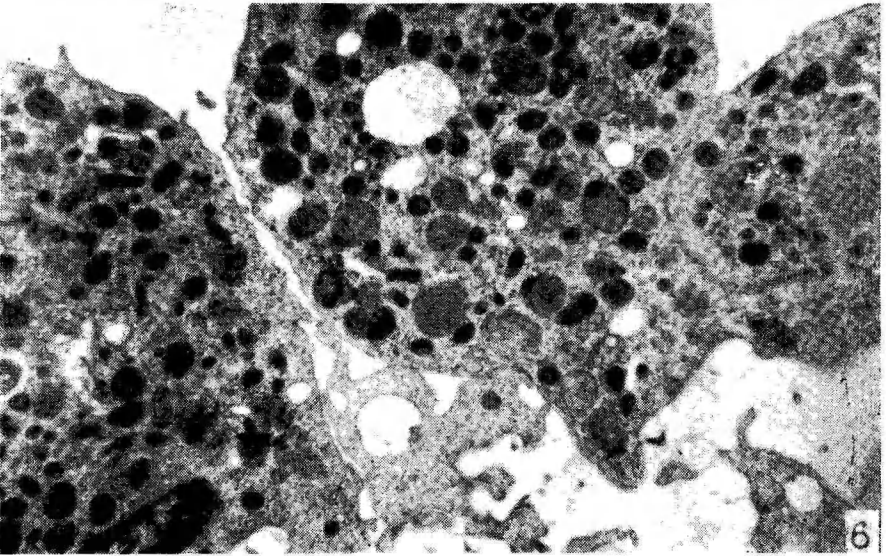
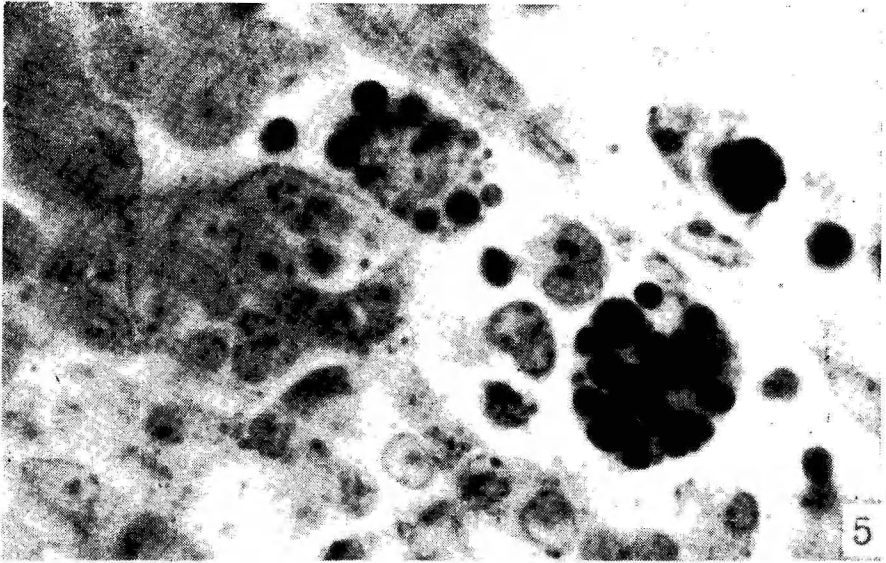


Рис. 5. Высокодифференцированные мононуклеарные фагоциты с обломками эритроцитов в цитоплазме.  $\times 1200$ .

Рис. 6. Мононуклеарные фагоциты с электронноплотными гранулами.  $\times 9000$ .

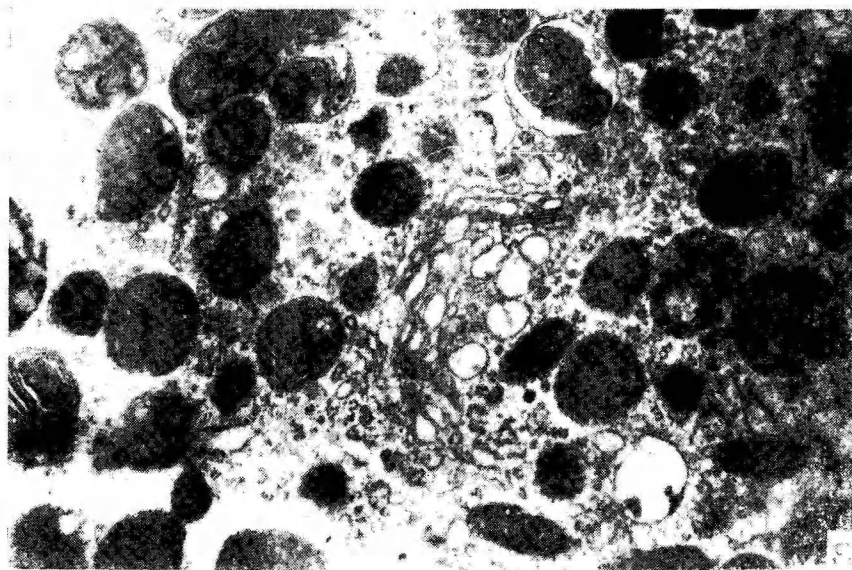
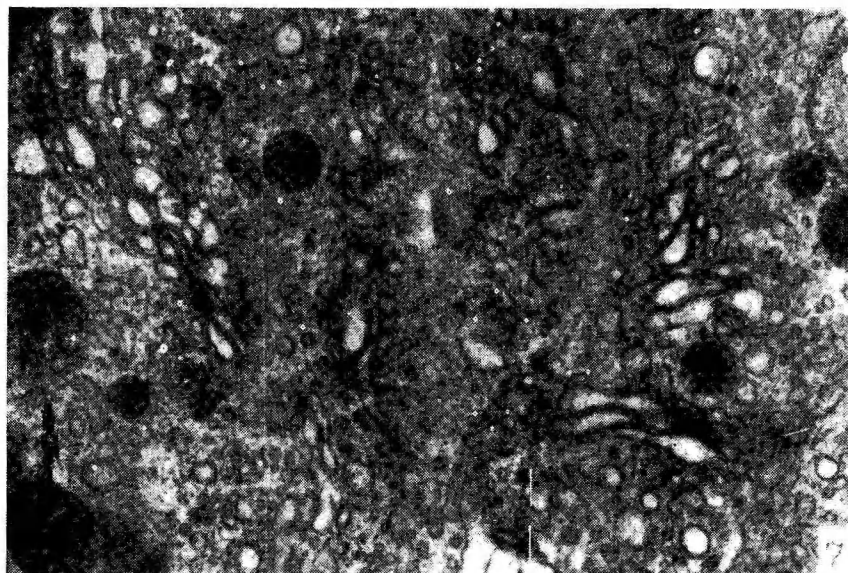


Рис. 7. Зона пластинчатого комплекса в цитоплазме мононуклеарного фагоцита с электронноплотными гранулами.  $\times 21\ 000$ .

Рис. 8. Цитоплазма мононуклеарного фагоцита с электронноплотными гранулами. Миелоидные фигуры в плотных тельцах.  $\times 19\ 000$ .

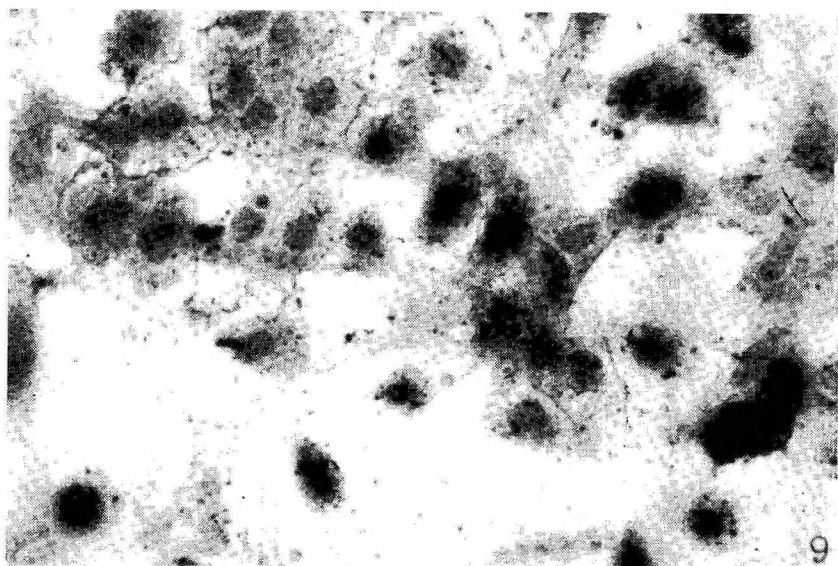
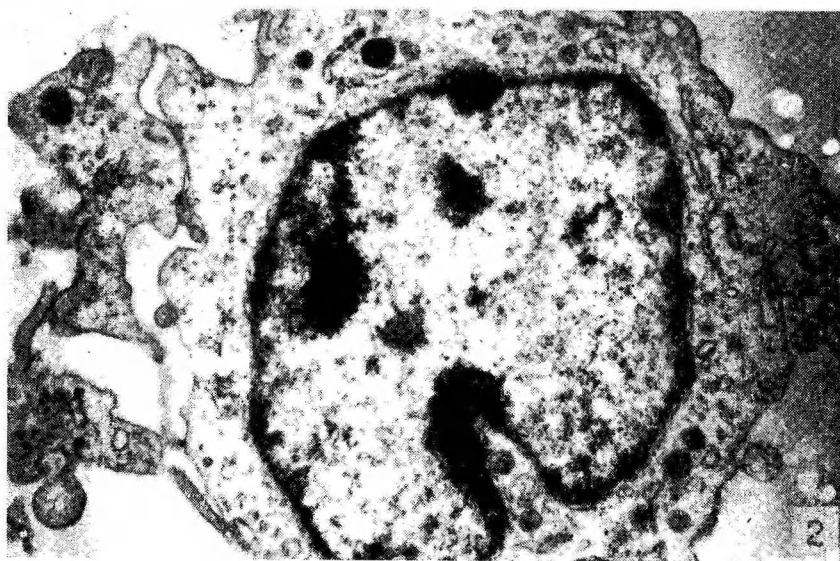
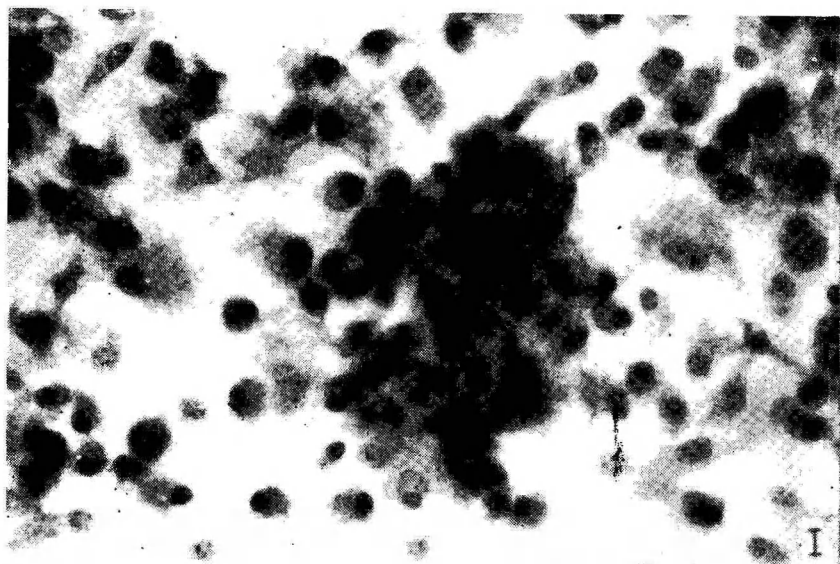


Рис. 9. Эпителиморфный пласт эндотелиальных клеток.  $\times 1400$ .  
Рис. 10. Тяжи и трабекулы эндотелиальных клеток.  $\times 1400$ .



Рис. 11. Эндотелиальные клетки с базальной мембраной.  $\times 9000$ .

Рис. 12. Разрастания мезотелиальных клеток.  $\times 450$ .



Подписи к рисункам статьи А. Пийрсоо «Кроветворение в культуре эмбриональной селезенки»

Рис. 1. Колония недифференцированных мононуклеарных фагоцитов.  $\times 340$ .

Рис. 2. Монобласт.  $\times 3200$ .

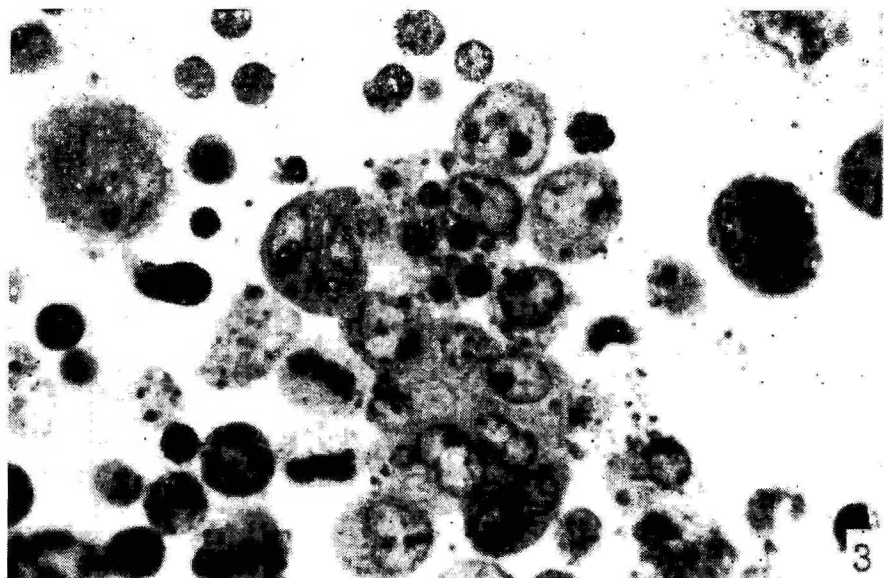
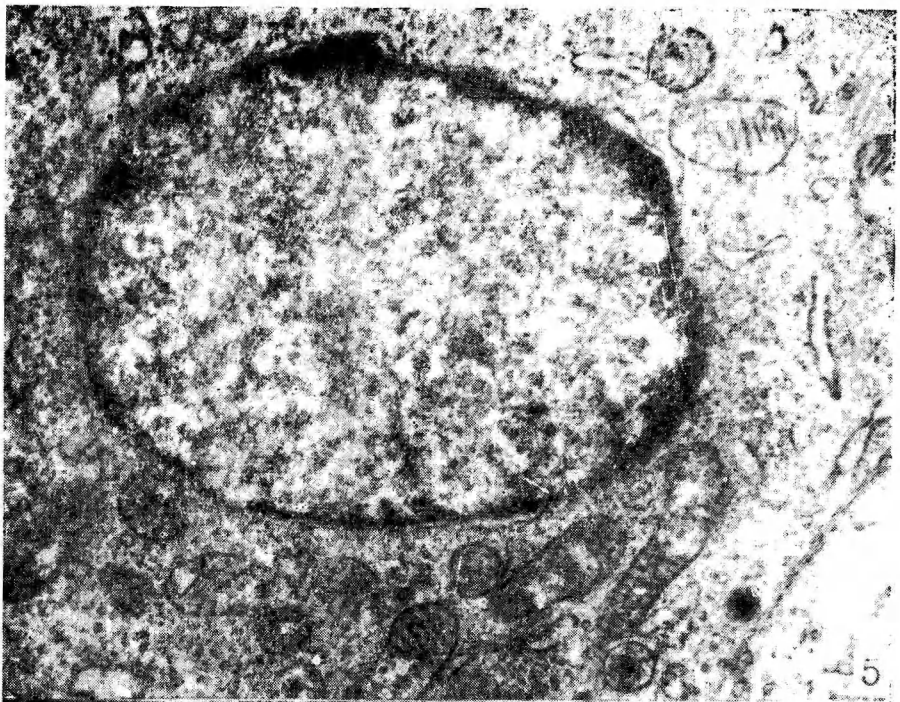
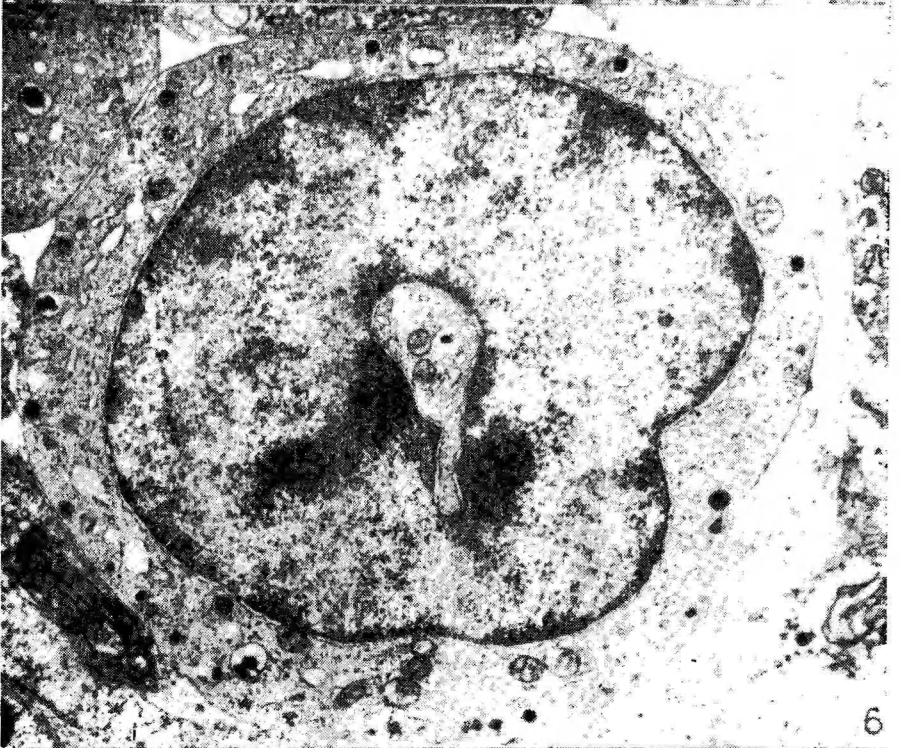


Рис. 3. Колония миелоидных клеток.  $\times 1200$ .

Рис. 4. Митоз предшественника нейтрофильного гранулоцита.  $\times 1500$ .



5



6

Рис. 5. Миелобласт.  $\times 12\,000$ .

Рис. 6. Промиелоцит с кольцевидным ядром.  $\times 12\,000$ .

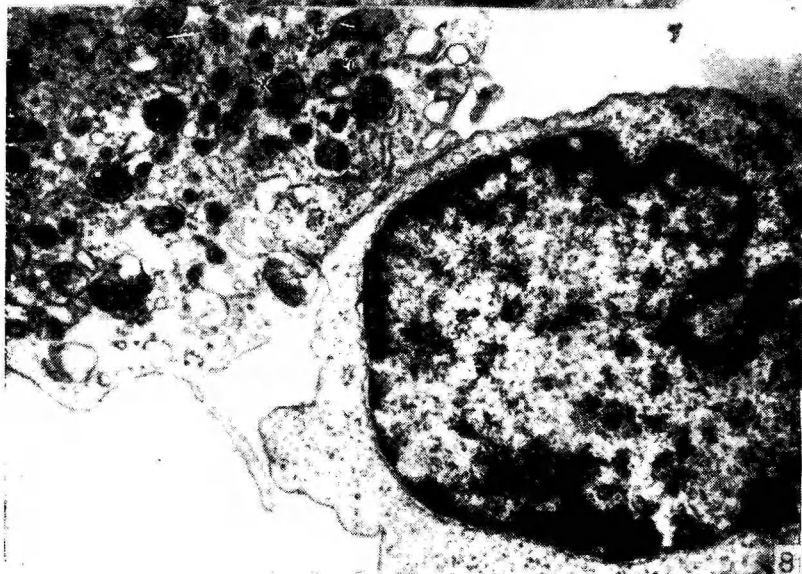
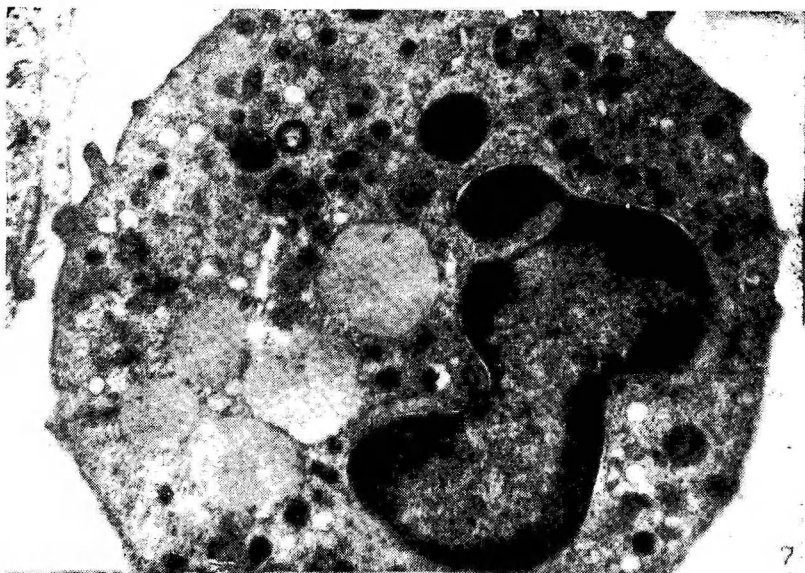


Рис. 7. Миелоцит со специфическими гранулами в цитоплазме.  $\times 12\,000$ .  
Рис. 8. Контакт предшественника нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарного фагоцита с электронноплотными гранулами.  $\times 8800$ .

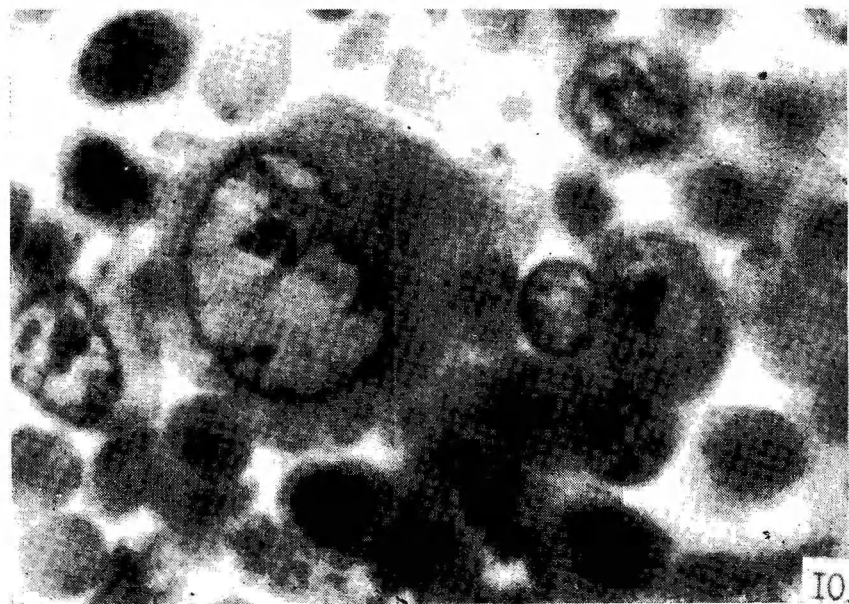
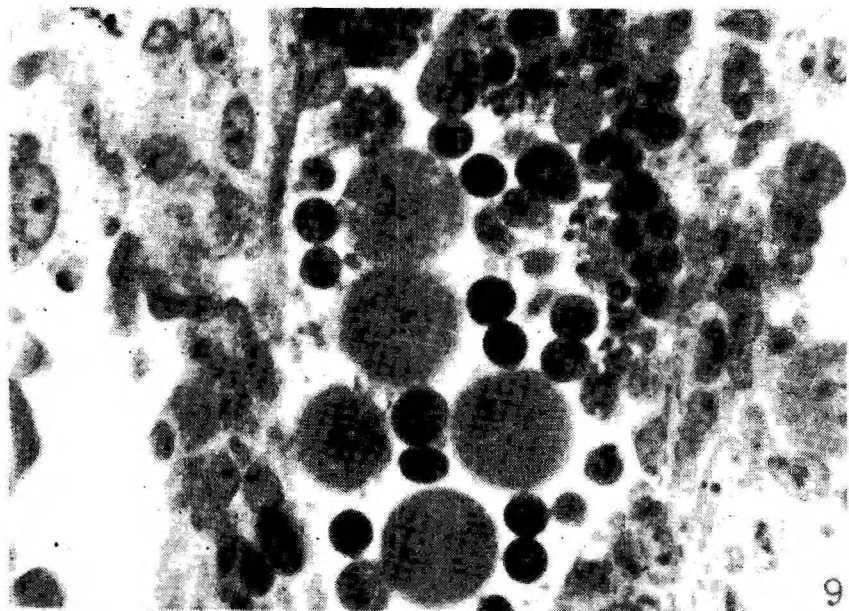


Рис. 9. Смешанная колония мегакарицитов и гранулоцитов.  $\times 1200$ .  
Рис. 10. Мегакариобласт.  $\times 2500$ .

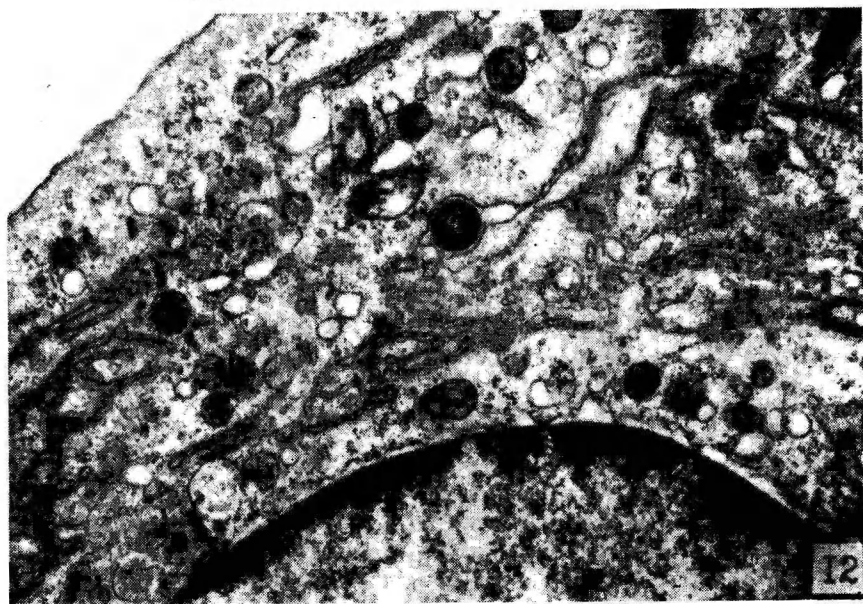
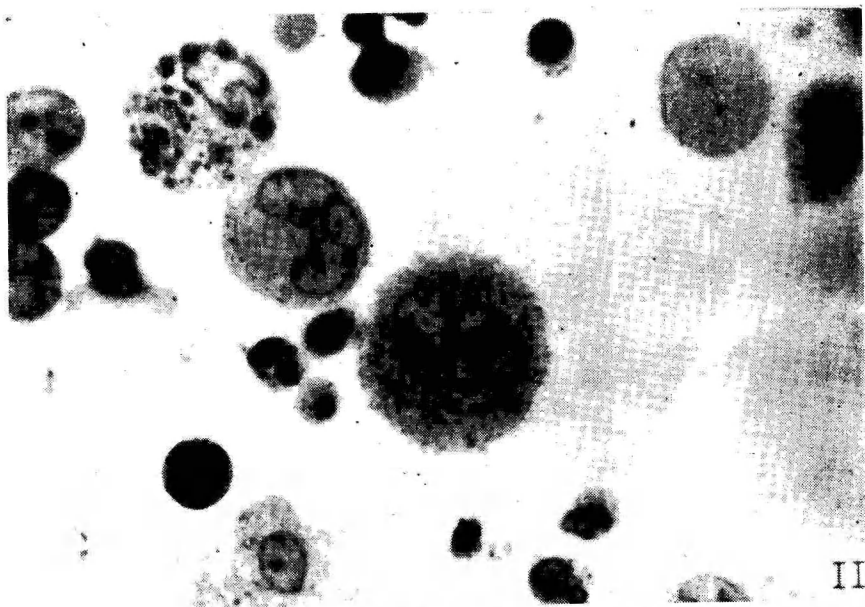
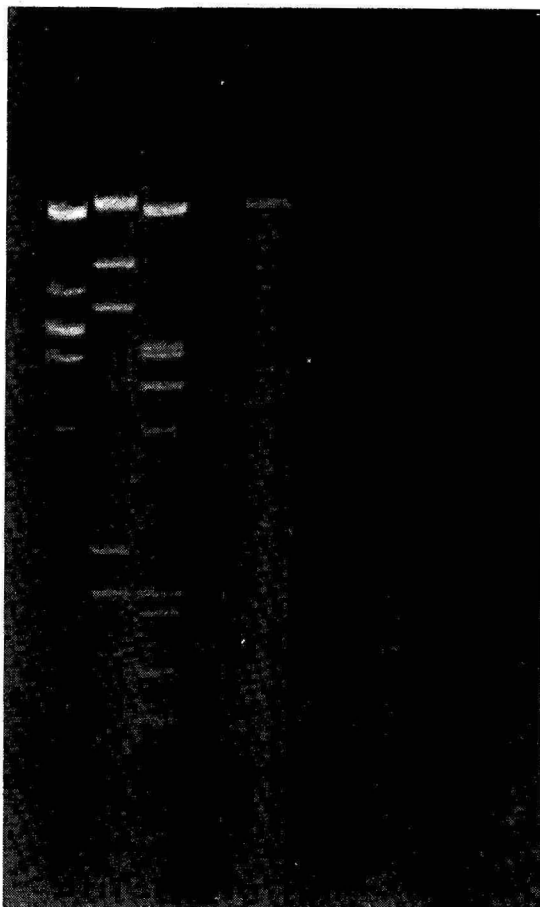
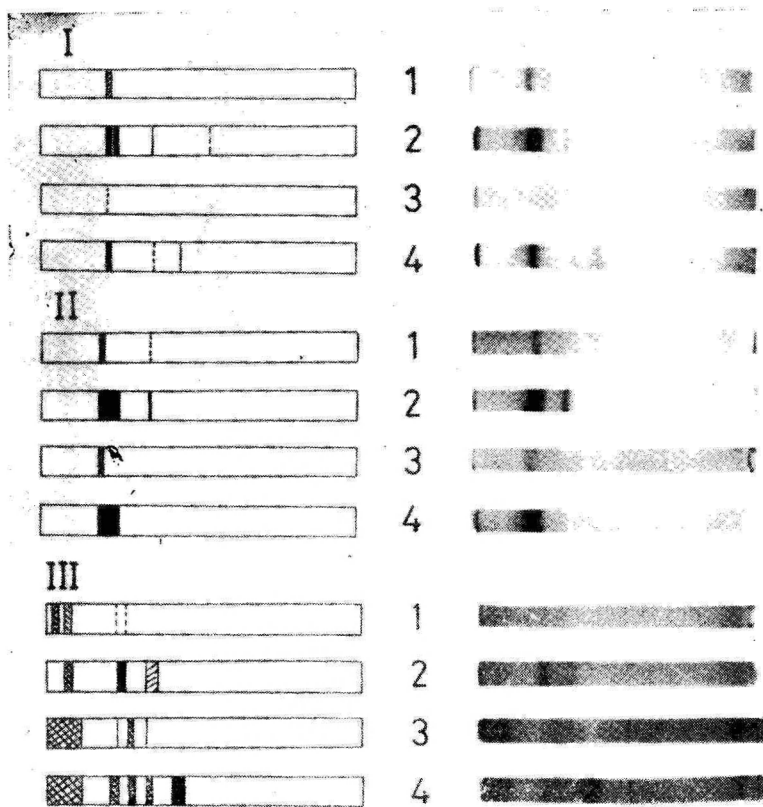


Рис. 11. Промегакариоцит.  $\times 1200$ .  
Рис. 12. Цитоплазма мегакариоцита.  $\times 1900$ .



**Подписи к рисункам статьи Я. Хабихта, Р. Виллемса и А. Хейнару «Определение ситов связывания РНК-полимеразы *E. coli* на ДНК TOL-плазмид»**

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле ДНК TOL\*-плазмиды и ее рестрикционных фрагментов в опытах связывания РНК-полимеразы *E. coli* на соответствующей ДНК. 1 — ДНК фага + *Eco* RI; 2 — ДНК фага + *Hind* III; 3 — ДНК фага (*Eco* RI + *Hind* III); 4 — фрагмент TOL\* ДНК (*Hind* III-B), связывающийся с РНК-полимеразой; 5 — не связывающиеся с РНК-полимеразой фрагменты TOL\* ДНК (*Hind* III); 6 — ДНК TOL\*-плазмиды, связывающейся с РНК-полимеразой; 7 — ДНК TOL\*-плазмиды, не связывающейся с РНК-полимеразой; 8 — аналогично 6, но без полимеразы; 9 — аналогично 7, но без полимеразы.



Подписи к рисункам статьи Э. Хейнару и Р. Кангура «Изоформы алкоголь-дегидрогеназы у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* и *Pichia ripus*»

Рис. 1. Электрофореограммы изоформ алкоголь-дегидрогеназы (1,2) и *P. ripus* (3,4), выращенных на средах с различными источниками углерода. I — глюкоза; II — этанол и III — метанол; 1,3 — субстрат метанол; 2,4 — субстрат этанол.

**РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА  
МЕТАНОЛА У МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ. Ала-  
мьяэ Т.О., Смигскер Я.А. - Уч. зап. Тартуоко-  
го гос. ун-та, вып. 583 . Труды по цитоло-  
гии и генетике III, 1983, с. 5-14.**

Исследовано образование алкогольоксидазы (АО), каталазы (К), формальдегиддегидрогеназы (ФДГ) и форматдегидрогеназы (ФД) у девяти мутантов *Pichia pinus*, потерявших способность расти на метаноле, и у четырех видов дрожжей, неусваивающих метанол. У двух аллельных мутантов обнаружено полное отсутствие образования ФД и заметное подавление образования других изученных ферментов. У двух мутантов, способных к образованию АО, не обнаружили дополнительного образования К на среде с метанолом. Предполагается, что образование АО и К контролируется автономными механизмами.

УДК 576.311.3:578.085.23:591.044

**СЕЛЕКТИВНОСТЬ АУТОФАГОЦИТОЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ  
РАЗНЫХ АНТИМЕТАБОЛИТОВ. Вейдебаум Т.И., Кяр-  
нер Ю.К. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та,  
вып. 583. Труды по цитологии и генетике III,  
1983, с. 15-24.**

Добавление нейтрального красного (5 мкг/мл) или актиномицина Д (0,5 мкг/мл) в питательную среду вызывало увеличение общего количества лизосом, а добавление колхицина (5 мкг/мл) - уменьшение. В опытах с нейтральным красным шероховатая эндоплазматическая сеть распадается очагами на мелкие пузырьки и облака аморфного электронноплотного вещества, а при колхицине вместо цистерн скопляются липидные включения с миелоидными фигурами. В первом случае очаги подвергаются сегрегации, а во втором - аутофагоцитоз подавлен. В опытах с актиномицином Д поглощаются целые цистерны эндоплазматической сети. Итак, подтверждается гипотеза Лифейфера о качественной регуляции аутофагоцитоза. Очевидно и то, что аутофагоцитоз не является единственным механизмом круговорота оргanelл, а часть из них разлагается в цитоплазме без сегрегации.

Библи. - 45, рис. - 6.

О КАРИОТИПИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК В ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ. Каллак Х.И. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике Ш, 1983, с. 25-36.

Представлены данные об определенных тенденциях карiotипической изменчивости и формировании штаммов с модальными наборами в длительных каллусных культурах у гаплопаппуса, гороха и креписа. В каллусных штаммах может сохраняться характерный для исходных тканей диплоидный карiotип, но в большинстве случаев образуется новый (эуплоидный или анеуплоидный) карiotип, отличающийся от того же у первичных экcплантатов. Наряду с карiotипически гомогенными культурами формируются миксоплоидные культуры с определенным соотношением разноплоидных клеток. Карiotипически разные штаммы могут дифференцироваться также в каллусной культуре, имеющей общее происхождение и выращенной в одинаковых постоянных условиях. Карiotипическую дифференцировку каллусных штаммов связывают с отбором, факторами которого, кроме условий культивирования, могут быть также межклеточные соотношения.

Библ. - 29; рис. - 10

СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ 2,4-Д и НММ *in vivo* и *in vitro* НА ПРИМЕРЕ ТКАНЕЙ *SVE-PIS CAPILLARIS*. Каллак Х., Ваппер М. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике Ш, 1983, с. 37-49.

В статье изложены данные о цитогенетических эффектах воздействия 2,4-Д и НММ на меристематические клетки зародышевых корешков и каллусные клетки креписа. Повышение концентрации 2,4-Д в среде питания до токсического уровня (10 мг/л) не вызывает заметных цитогенетических изменений в клетках каллуса, а в клетках первичных корешков под воздействием химиката (5-300 мг/л) достоверно увеличивается количество аберративных ана- и телофаз. Супермутаген НММ вызывает цитогенетические изменения как в меристематических клетках первичных корешков (в дозе 100-500 мг/л), так и в каллусных клетках креписа (в дозе 1 или 8 мг/л). Инертность подопытного каллусного штамма креписа в отношении цитогенетического воздействия 2,4-Д связывается с длительным отбором в культуре клеток, наиболее приспособленных к содержанию химиката в среде питания.

Библ. - 32; рис. - 8.

ИЗУЧЕНИЕ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА КАТЕХОЛ-2,3-ОКСИГЕНАЗЫ НА УРОВНЕ ИНТАКТНЫХ КЛЕТОК. Килья А.Х. Касак Л.А., Хейнару А.Л. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике Ш, 1983, с. 50-62.

Разработана новая методика определения индукции синтеза катехол-2,3-оксигеназы (K230) на уровне интактных клеток. Были оптимизированы состав питательной среды, количество добавлений микроэлементов, концентрация субстрата и клеток в реакционной смеси, а также условия культивирования микробов при аэрации культуры. В опытах удалось получить полную индукцию синтеза K230 до размножения основной части микробов в изучаемой популяции. Активность K230 и некоторых других специфических для *TOI*-плазмиды ферментов можно определить уже в микробной суспензии, имеющей оптическую плотность, равную 0,005 при 580 нм.

Библ. - 25, рис. - 3, табл. - 3.

УДК 582.282.23.095:576.85I.095:577.I53

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ У ДЕНИТРИФИКАТОРА *BACTERIUM AGILE VAR. HARTLEBII*.

Кухлберг Л., Вязранд Р. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике III, 1983, с. 63-69.

Исследовали влияние источников углерода и азота на образование ферментов (Ф) цикла трикарбонных кислот (ЦТК) у *Bacterium agile var. hartleebii*. Синтез Ф ЦТК подавляется на среде с глюкозой (Гл) и активируется на среде с сукцинатом (С) и с переходом клеток от применения аммиака на использование нитрата. На среде с Гл и С синтез Ф ЦТК остается репрессированным и активируется добавлением в среду циклического АМФ. Предполагается, что одним из механизмов регуляции синтеза Ф ЦТК является опосредованная циклическим АМФ катаболическая репрессия.

Табл. - 3, библ. - 12 назв.

УДК 576.3II:578.086.3.

ЯВЛЕНИЕ АУТОФАГОЦИТОЗА ПРИ ПЕРЕВОДЕ КЛЕТОК В ТРАНСВУЮ КУЛЬТУРУ. Кярнер М.К. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике III, 1983, с. 70-78.

Диссоциация трипсином подкожной соединительной ткани 9-суточных куриных эмбрионов вызывает в цитоплазме фибробластов следующие изменения: увеличение количества аутолизосом, расширение мешочков комплекса Гольджи и местами кламатоз богатых рибосомами выростков. Прикрепленные и распластанные на стекле фибробласты характеризуются малой плотностью цитоплазмы, везикуляцией комплекса Гольджи, отсутствием микротрубочек и обилием лизосом. Обсуждается роль условий диссоциации и последующей культивации в активации и повреждении клеток.

Библ. - 37, рис. - 8.

ИЗУЧЕНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ. Пайрсоо А. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике III, 1983, с. 79-87.

В условиях тканевых культур кусочковых эксплантатов селезенки эмбрионов и новорожденных мышей происходит специфическая дифференцировка и рост разных типов стромальных клеток - фибробластов, ретикулярных клеток, эндотелиальных клеток, типичных мононуклеарных фагоцитов или макрофагов и мононуклеарных фагоцитов со многими электронноплотными гранулами. В работе приведена морфологическая характеристика всех типов стромальных клеток и обсуждается вопрос об их гистогенезе.

Библ. - 28, рис. - 12.

КРОВЕТВОРЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СЕЛЕЗЕНКИ. Пайрсоо А. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике, III, 1983, с.88-95.

Тканевые культуры кусочковых эксплантатов селезенки эмбрионов и новорожденных мышей являются подходящими моделями для изучения дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов, мононуклеарных фагоцитов и мегакариоцитов. В этих направлениях кроветворение поддерживается в течение многих недель. Происходящая *in vitro* дифференцировка гранулоцитов и мегакариоцитов в общих чертах морфологически не отличается от дифференцировки *in vivo*. Клетки из ряда мононуклеарных фагоцитов не достигают зрелости и они сохраняются в культуре на стадии монобластов - промоноцитов. Установлены межклеточные контакты клеток из дифферона нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных фагоцитов со многими электронноплотными гранулами.

Библ. - 28, рис. - 12.

ИЗОФОРМЫ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ У МЕТАНОЛУ-УСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЕЙ *Candida boidinii* И *Pichia pinus* Хейнару Э.Х., Кангур Р.О. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып.583. Труды по цитологии и генетике, III, 1983, с. II5-II9.

Приведены данные об изоферментном составе алкогольдегидрогеназы и их субстратной специфичности у метанолусваивающих дрожжей *C. boidinii* и *P. pinus* при различных режимах выращивания. Найдена только одна изоформа алкогольдегидрогеназы, образование которой не репрессируется глицеролом. У всех изоформ, которые проявляются как типичные NAD-зависимые алкогольдегидрогеназы, имеется низкое сродство к метанолу. С переходом клеток на использование метанола индуцируется синтез двух белков ( $Rf$  0,04 и 0,09), которые могут быть и изоформами алкогольоксидазы.

Рис. - 3, библи. - 12 назв.

КОЛЕБАНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ПЕРОКСИСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ МЕТАНОДУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЕЙ. Симискер Я.А., Таллсеп Э.А., Кийввер Р.К. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике III, 1983, с. 96-106.

Исследована динамика активностей алкогольоксидазы, каталазы, формальдегид и формат дегидрогеназы в клеточном цикле у метанодусваивающих дрожжей *Candida boidinii* и *Pichia pinus*. Активность алкогольоксидазы (АО) зависит от стадий клеточного цикла. В образующихся при почковании дочерних клетках активность АО низкая. Максимальная активность АО в клетках обнаруживается перед окончанием линейного роста клеток. Резкое уменьшение активности АО происходит при почковании. Активности каталазы (К), формальдегид- и форматдегидрогеназы в клеточном цикле существенно не колеблются. Предполагается, что контроль синтеза и активностей двух функционально и структурно связанных пероксисомных ферментов (АО и К) осуществляется автономными механизмами.

Биол. - II; рис. - 4; табл. - I.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ E COLI НА ДНК ТОЛ-ПЛАЗМИД. Хабихт Я.К., Виллемс Р.Л.-Э., Хейнару А.Л. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 583. Труды по цитологии и генетике III, 1983, с. 107-114.

В работе разработана методика выделения высокоочищенных препаратов ТОЛ-плазмидных ДНК из штаммов *Pseudomonas putida*, не требующая применения ультрацентрифугирования в градиенте плотности  $\text{CaCl}_2$ . Показано, что РНК-полимераза *E coli* транскрибирует  $p^{WVO}$  и  $\text{TOI}^X$  -плазмидные ДНК. Установлено связывание РНК-полимеразы *E coli* на  $\text{Hind III}$ -В фрагменте  $\text{TOI}^X$  ДНК. Этот фрагмент имеет около 22 тысяч пар оснований и присутствует во всех делеционных мутантах ТОЛ-плазмид.

Биол. - 9, рис. 3.