

И. С. КУЛАЕВ, И. А. КРАШЕНИННИКОВ, Т. П. АФАНАСЬЕВА

О ЛОКАЛИЗАЦИИ И СОСТОЯНИИ ПОЛИФОСФАТОВ И ПОЛИФОСФАТАЗ В КЛЕТКАХ ГРИБОВ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 20 III 1969)

Для изучения внутриклеточной локализации и физиологической роли отдельных соединений в настоящее время широко применяется метод выделения субклеточных структур. Однако в случае неорганических полифосфатов исследователи сталкиваются с рядом трудностей, связанных с наличием в клетках самых различных организмов полифосфатаз, гидролизующих полифосфаты до более мелких фрагментов или до ортофосфата^(1,6). Харольд и Миллер⁽⁷⁾, изучая локализацию полифосфатов в клетках *Neurospora crassa*, наблюдали в процессе разрушения мицелия этого гриба значительный гидролиз содержащихся в нем неорганических полифосфатов. Подобные результаты были получены в нашей лаборатории⁽⁸⁾, а также другими авторами⁽⁹⁻¹¹⁾ при изучении ряда микроорганизмов. Однако подробно этот вопрос не изучался.

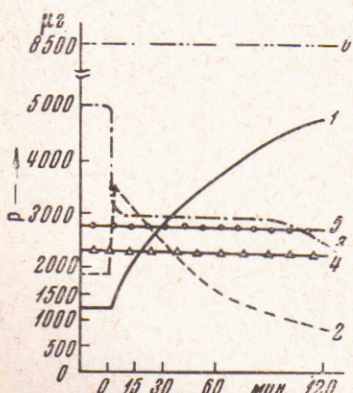


Рис. 1. Изменение содержания некоторых фосфорных соединений при инкубации гомогената клеток *N. crassa* при 0—4°. Среда выделения 0,35 *M* маннит. Время — от начала разрушения. 1 — ортофосфат, 2 — кислоторастворимые полифосфаты, 3 — кислотонерастворимые полифосфаты, 4 — фосфаты сахаров, 5 — фосфолипиды, 6 — нуклеиновые кислоты

При исследовании локализации различных фракций полифосфатов у *Neurospora crassa* и *Endomyces magnusii* нами было обнаружено, что в клетках указанных грибов присутствуют активные полифосфатазы. В настоящей работе мы изучили кинетику действия полифосфатаз при разрушении клеток этих организмов.

В случае *N. crassa* разрушение клеток мицелия, росшего 18 час.⁽¹²⁾, проводили механически, растирая его при 0—2° в ступке в течение 40—60 сек. Полученный при этом гомогенат суспендировали далее в 0,35 *M* растворе маннита и также на холоду инкубировали в течение разных промежутков времени — до 2 час. Клетки 12-часовой культуры *E. magnusii* обрабатывали ферментным препаратом из *Helix pomatia*⁽¹³⁾ для получения протопластов в течение 40 мин. Затем суспензию протопластов гомогенизировали в среде, содержащей 0,5 *M* сахарозу, 0,0028 *M* ЭДТА, 0,25 *M* трис-НСl рН 7,4 и 1,2% альбумин, при 0—2° в течение 2 мин. в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат также на холоду инкубировали еще в течение 1 часа. Через определенные интервалы времени при исследовании обоих объектов брали пробы для определения количества полифосфатов разных фракций.

Фракционировали полифосфаты при помощи модифицированного⁽¹⁴⁾ метода Лангена и Лисса⁽¹⁵⁾ на кислоторастворимую, солерастворимую и кислотонерастворимую фракции. В случае *E. magnusii* наиболее полимерные кислотонерастворимые полифосфаты делили на щелочерастворимые и экстрагируемые горячей хлорной кислотой.

Фракционировали полифосфаты при помощи модифицированного⁽¹⁴⁾ метода Лангена и Лисса⁽¹⁵⁾ на кислоторастворимую, солерастворимую и кислотонерастворимую фракции. В случае *E. magnusii* наиболее полимерные кислотонерастворимые полифосфаты делили на щелочерастворимые и экстрагируемые горячей хлорной кислотой.

Прежде чем переходить к анализу данных, касающихся поведения полифосфатов, важно было выяснить, что происходит с другими фосфорными соединениями в процессе разрушения клеток и при последующей инкубации. Этот вопрос был решен нами при работе с мицелием *N. crassa*. На рис. 1 видно, что содержание большинства фосфорных соединений клеток — нуклеиновых кислот, фосфолипидов и фосфатов сахаров — не изменялось ни в процессе разрушения клеток, ни при инкубации гомогенатов при 0—2°. Аналогичная картина была выявлена и у *E. magnusi*.

Данные по изменению содержания разных фракций полифосфатов в процессе разрушения клеток *N. crassa* и *E. magnusi* и последующей инку-

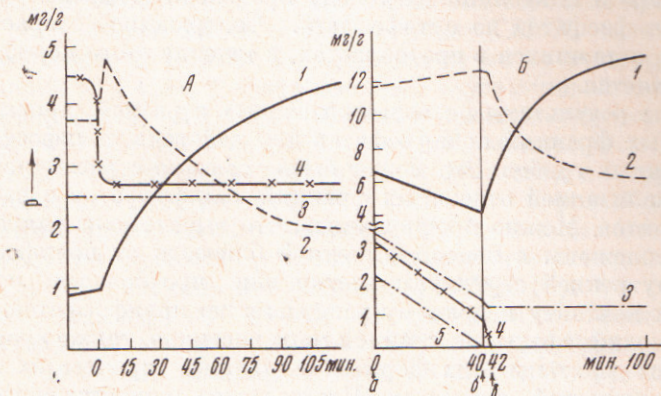


Рис. 2. Изменение содержания различных фракций высокомолекулярных полифосфатов и ортофосфата при разрушении клеток *N. crassa* (А) и *E. magnusi* (Б) и их последующей инкубации при 0—2°. Расчет на сухой вес клеток. 1 — ортофосфат, 2 — кислоторастворимые полифосфаты, 3 — солерастворимые полифосфаты, 4 — щелочерастворимые полифосфаты, 5 — полифосфаты, экстрагируемые горячей хлорной кислотой. а — клетки, б — протопласты, в — гомогенат

бации полученных гомогенатов представлены на рис. 2, на котором видно, что в количестве отдельных фракций полифосфатов происходят существенные изменения. Уже за первые 40—60 сек. разрушения клеток *N. crassa* при 0—2° в клетках резко уменьшается содержание наиболее полимерных кислотонерастворимых полифосфатов и параллельно увеличивается количество кислоторастворимых полифосфатов. Интересно, что в это время, так же как и в последующий период инкубации, содержание солерастворимых полифосфатов остается неизменным.

Полученные данные позволяют предположить, что в первые же секунды разрушения клеток *N. crassa* начинают активно функционировать деполимеризующие полифосфатазы, которые расщепляют наиболее полимерные полифосфаты кислотонерастворимой фракции до более мелких кислоторастворимых фрагментов, минуя солерастворимую фракцию. В последующий период кислоторастворимые полифосфаты начинают постепенно гидролизироваться до ортофосфата. Эти данные, во-первых, указывают на то, что в клетках *N. crassa* есть по крайней мере два типа полифосфатаз — одни, гидролизующие длинные молекулы полифосфатов внутри цепи с образованием более коротких фрагментов, и другие, гидролизующие молекулы с концов цепи с образованием ортофосфата. Интересно, что на солерастворимые полифосфаты эти ферменты вообще в данных условиях не действовали. Это может свидетельствовать о том, что имевшиеся в клетках *N. crassa* фракции полифосфатов по-разному атаковались полифосфатазами, и, следовательно, они находятся в клетке (так же, как, по-видимому, и в гомогенате) в различном состоянии. В частности, солерастворимая фракция

остаётся вообще недоступной для гидролизующего действия полифосфатаз.

К такому же выводу можно прийти и при анализе данных по изменению содержания отдельных фракций полифосфатов в процессе постепенного разрушения клеток *E. magnusii*, вызванного снятием клеточной стенки и последующей гомогенизацией освободившихся протопластов. В результате лизиса клеточных стенок значительное количество наиболее полимерных полифосфатов гидролизуется с образованием менее полимерной кислоторастворимой фракции, содержание которой в этот период несколько увеличивается. При последующем разрушении протопластов в гомогенизаторе и инкубации на холоду происходит гидролиз кислоторастворимых полифосфатов до ортофосфата. Содержание солерастворимых полифосфатов, оставшихся в протопластах, в течение этого периода фактически не изменяется.

Полученные результаты позволяют говорить о разной степени доступности отдельных фракций полифосфатов для действия полифосфатаз клеток исследованных грибов. Это может быть связано с различной внутриклеточной локализацией отдельных фракций полифосфатов и расщепляющих их ферментов. Можно предположить, что высокомолекулярные полифосфаты расположены в непосредственной близости от полифосфатаз, и нарушение внутренней структуры клетки или протопласта немедленно приводит к их контакту и полному расщеплению полифосфатов. Кислоторастворимые полифосфаты, по крайней мере частично, также сравнительно легко доступны действию этих ферментов, однако процесс их гидролиза идет с гораздо меньшей скоростью. Что касается солерастворимой фракции, то эта часть полифосфатов не легко подвергается действию полифосфатаз и находится в каком-то особом, хорошо защищенном состоянии.

Можно думать, что полифосфатазы дают возможность клетке поддерживать тот или иной уровень различных фракций полифосфатов, а в случае необходимости обеспечивать быстрое перераспределение этих соединений по фракциям, локализованным в разных частях клетки и выполняющим различные функции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 III 1969

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Ingelman, Н. Malmgren, *Acta chem. scand.*, **2**, 365 (1948). ² В. Ingelman, Н. Malmgren, *Acta chem. scand.*, **3**, 157 (1949). ³ Н. Malmgren, *Acta chem. scand.*, **3**, 1331 (1949). ⁴ Н. Malmgren, *Acta chem. scand.*, **6**, 16 (1952). ⁵ Н. Mattenheimer, *Zs. Physiol. Chem.*, **303**, 115 (1956). ⁶ И. С. Кулаев, А. Н. Белозерский, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, в. 3, 354 (1962); в. 4, 502 (1962). ⁷ F. M. Harold, A. Miller, *Biochim. et biophys. acta*, **50**, 261 (1961). ⁸ И. С. Кулаев, V Международн. биохим. конгр. Реф. сообщ., II, 1961. ⁹ G. Drews, *Acides ribonucleiques et polyphosphates. Structure, synthese et fonctions. Coll. Intern. CNRS, Paris, 1962*, p. 533. ¹⁰ D. E. Hughes, A. Muhammed, *Acides ribonucleiques et polyphosphates. Structure, synthese et fonctions. Coll. Intern. CNRS, Paris, 1962*, p. 591. ¹¹ Н. Souza, *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 344 (1967). ¹² И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, Н. К. Кокурина, *Биохимия*, **31**, 850 (1966). ¹³ И. С. Кулаев, Т. П. Афанасьева, М. П. Беликова, *Биохимия*, **32**, 539 (1967). ¹⁴ И. С. Кулаев, А. Н. Белозерский и др., *ДАН*, **30**, 667 (1960). ¹⁵ P. Langen, *E. Liss, Biochem. Zs.*, **330**, 455 (1958). ¹⁶ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников и др., *ДАН* **177**, 229 (1967).