

В. В. ШИНЕВИЧ, Э. П. БЕРС, Г. Г. ПАССКЕЛЬ

## ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ НА РАСТВОРИМЫЙ СУММАРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС И ИЗОФЕРМЕНТЫ CHLORELLA

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 10 VI 1969)

В последние годы повышается интерес к изучению действия различных факторов среды на клетки в связи с выяснением их роли в приспособлении растительных организмов к окружающим условиям (1). Выясняются эндогенные механизмы, обеспечивающие адаптивные эффекты и активацию при различных альтерирующих воздействиях.

Широкие возможности в изучении физико-химических изменений белков как субстанциональной основы изменений, происходящих в клетках под влиянием внешней среды, открываются в связи с разработкой новых методов изучения белковых комплексов и открытием феномена множественности молекулярных форм ряда энзимов. Особый интерес в связи с этим представляют одноклеточные организмы, в частности низшие водоросли. Однако именно белковые компоненты и изоферменты низших водорослей изучены значительно меньше, чем у каких-либо других животных и растительных объектов.

В настоящей работе рассматривается влияние ряда ингибиторов отдельных биохимических процессов на состав растворимого белкового комплекса и активность некоторых изоэнзимов на примере протококковой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, № 157. Культура была получена из лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета. Выращивание водорослей проводилось в установке системы ИФР нашей модификации на среде Тамия.

На середине линейной фазы роста водоросли центрифугировали и пересевали на полный питательный раствор (контроль) и на ту же среду, содержащую соответствующий антибиотик или антиметаболит: актиномицин D (100 мкг/мл), пуромин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (3 мг/мл), 8-азогуанин ( $10^{-3}$  M), этионин ( $10^{-2}$  M). Указанные концентрации были выбраны на основании литературных данных (2-5) и предварительных экспериментов. Густота засева — 40 млн/мл. Действие ингибиторов наиболее ярко проявлялось к 72 часу, после чего клетки собирали центрифугированием и разрушали с целью получения растворимого суммарного белкового комплекса (6). Разделение белка осуществляли методом дискового электрофореза в геле полиакриламида. В качестве красителя использовали «coomassie brilliant blue R-250». Выявление ферментов проводили гистохимическими методами после электрофоретического разделения белкового комплекса (7, 8). Исследовали глюкозо-6-РО<sub>4</sub>-дегидрогеназу (D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза, Н.Ф. 1.1.1.49), малатдегидрогеназу (L-малат: НАД-оксидоредуктаза, Н.Ф. 1.1.1.37), глютаматдегидрогеназу (L-глютамат: НАД-оксидоредуктаза, Н.Ф. 1.4.1.3.), алкогольдегидрогеназу (алкоголь: НАД-оксидоредуктаза, Н.Ф. 1.1.1.1.), фосфатазу кислую (фосфогидролaza моноэфиров ортофосфорной кислоты, Н.Ф. 3.1.3.2.), фосфатазу щелочную (фосфогидролaza моноэфиров ортофосфорной кислоты, Н.Ф. 3.1.3.1.) и неспецифические эстеразы.

После окончания стресс-воздействия и возвращения в нормальные условия культивирования наблюдалась незначительная лаг-фаза в ходе роста водорослей, длительность которой зависела от природы ингибитора. В даль-

нейшем имело место восстановление нормальных темпов роста, характера деления клеток и образование близкой к исходной электрофоретической картины суммарного растворимого белкового комплекса и зимограмм изученных ферментов.

По характеру действия на рост и деление клеток исследованные ингибиторы можно разделить на две группы. Актиномицин D и пурамицин в использованных нами концентрациях не оказывали влияния на интенсив-

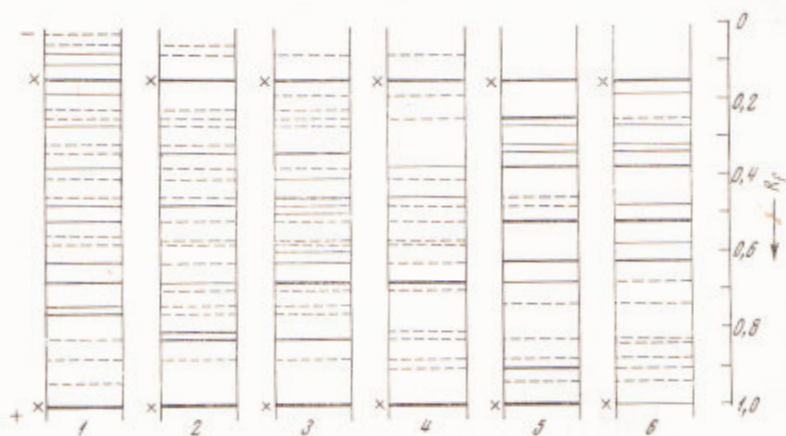


Рис. 1. Электрофореграммы суммарного белкового комплекса *Chlorella*. Крестиком отмечен белок, связанный с хлорофиллом. 1 — контроль, 2 — хлорамфеникол, 3 — 8-азогуанин, 4 — этионин, 5 — актиномицин D, 6 — пурамицин

ность деления *Chlorella*. К аналогичному выводу пришли другие авторы (9). Специфическое воздействие актиномицина D на ростовые процессы протококковых водорослей, очевидно, обусловлено относительно высоким содержанием в них ДНК (10), ее видовой специфичностью (11) или наличием длительно живущей мРНК (12). Характер влияния пурамицина

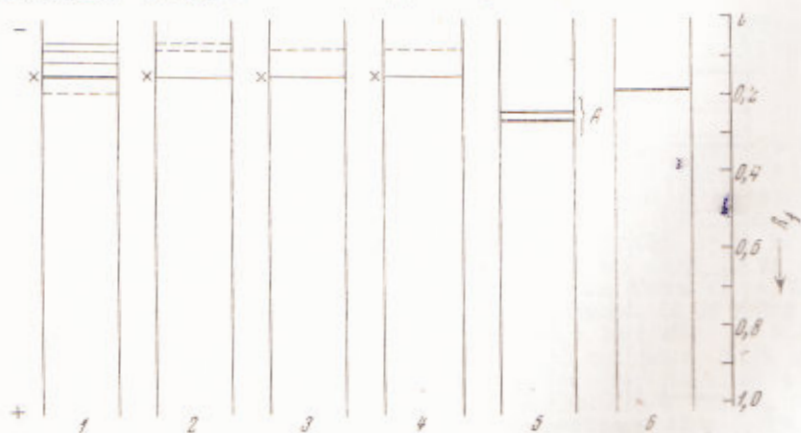


Рис. 2. Зимограммы глюкозо-6-Р<sub>0</sub>-дегидрогеназы. А — активность у основных фракций суммарного белкового комплекса (отсутствует в контроле). Остальные обозначения те же, что на рис. 1

может быть связан с подавлением синтеза белков-репрессоров (13) и новообразованием ряда ферментов.

Вторая группа ингибиторов, включающая хлорамфеникол, 8-азогуанин и этионин, полностью задерживала деление клеток. Однако в то время как хлорамфеникол целиком подавлял ростовые процессы, при действии 8-азогуанина и особенно этионина размеры клеток увеличивались. Для *Chlorel-*



la ellipsoidea подобную же картину наблюдал Тамияя (2). При рассмотрении электрофореграммы суммарного белкового комплекса (рис. 1) необходимо отметить снижение числа фракций, различное для отдельных ингибиторов. Оно сильнее всего выражено в тех случаях, когда сохранялись процессы роста (этионин) или деление клеток (актиномицин D, пуромин). Вместе с тем, наблюдалось наличие многих общих фракций, характерных для данного генотипа, независимо от природы ингибитора ( $R_f$  0,15;

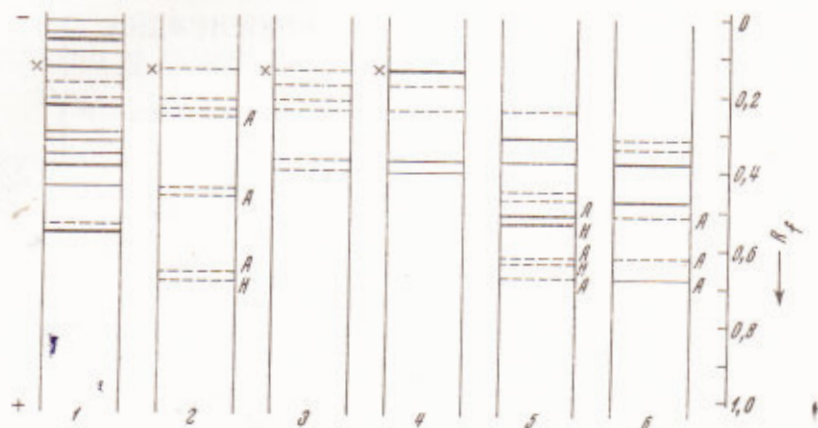


Рис. 3. Зимограммы малатдегидрогеназы. А — активность у основных фракций суммарного белкового комплекса (нет в контроле); Н — активность у фракций суммарного белкового комплекса, новообразующихся при действии ингибиторов. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

0,25; 0,38; 0,48; 0,52; 0,63; 0,68; 0,83; 0,88; 1,00). Фракции с подвижностью 0,15 и 1,0 соответствовали хлорофилл-белковому комплексу.

Изменение свойств белкового комплекса под влиянием антибиотиков и антиметаболитов, конформационные и другие перестройки его молекул,

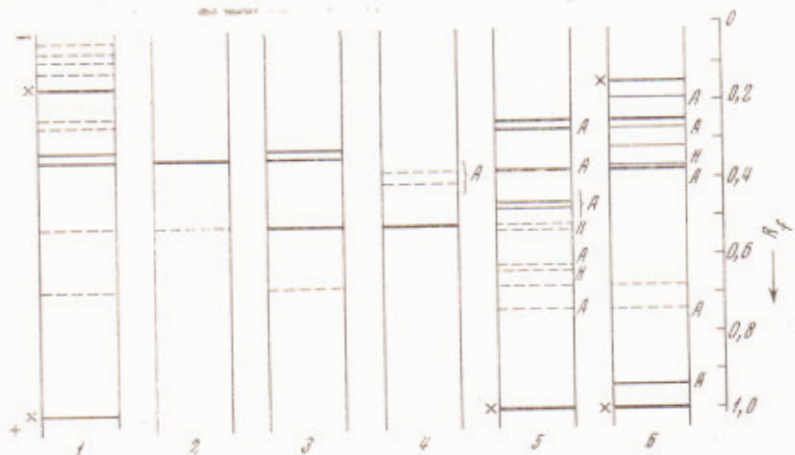


Рис. 4. Зимограммы эстеразы. Обозначения те же, что на рис. 1—3

изменения матричной активности и соответствующая репрессия или депрессия синтеза белков — все это, очевидно, привело к появлению новых или исчезновению имевшихся белковых фракций. Анализ зимограмм глюкозо-6-РО<sub>4</sub>-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы и эстеразы (рис. 2—4) обнаружил общее снижение числа изоформ ферментов опытных вариантов по сравнению с контролем (кроме эстеразы в варианте с актиномицином D). В ряде случаев установлено появление ферментативной активности в

неактивных ранее фракциях суммарного белкового комплекса. Последнее может рассматриваться как результат непосредственного воздействия ингибиторов на белковые молекулы и образование в них активных центров. Кроме того, следует отметить, что ряд новых фракций, возникших под влиянием отдельных ингибиторов, несли активность определенных ферментов. Аналогичная картина наблюдалась при изучении изоферментных спектров глутаматдегидрогеназы. Обнаружено увеличение числа изоформ кислой фосфатазы, возникающее при действии некоторых ингибиторов. Оно имело место за счет проявления активности во вновь образовавшихся белковых фракциях и, возможно, было связано с освобождением так называемой латентной кислой фосфатазы (14). Все исследованные ингибиторы вызывали появление изоферментов алкогольдегидрогеназы, отсутствующей в контроле; 8-азогуанин и актиномицин D — дополнительно еще и щелочной фосфатазы.

Полученные экспериментальные данные позволили установить характер субстанциональных изменений в клетках водорослей при действии ингибиторов, различных по механизму своего действия. Наряду с частыми специфическими реакциями клеток на изученные альтерирующие воздействия, обращает на себя внимание определенный неспецифический характер обнаруженных изменений, выявленный как на уровне электрофоретической картины суммарного белкового комплекса, так и при сравнении зимограмм отдельных ферментов. Любой из исследованных ингибиторов вызывал некоторое снижение числа белковых фракций и изоформ отдельных ферментов, появление новых молекулярных форм энзимов, а также новообразование ряда ферментов. Определенная монотонность изменений физико-химических характеристик растворимого белкового комплекса, вызываемых исследованными агентами (паранекроз), может рассматриваться в свете денатурационной теории клеточного повреждения (15, 16).

Множественность молекулярных форм ферментов, вероятно, обеспечивает определенный уровень обмена при паранекротическом состоянии клеток водорослей, способствует их выживаемости и реактивации и может рассматриваться как один из механизмов клеточного гомеостаза.

Ленинградский государственный университет  
им. А. А. Жданова

Поступило  
9 VI 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. Biebl, *Protoplasmatische Ökologie der Pflanzen*, Wien, 1962. <sup>2</sup> H. Tamiya, Y. Morimura, M. Yokota, *Arch. Mikrobiol.*, **42**, № 1, 4 (1962). <sup>3</sup> I. Morris, *Arch. Mikrobiol.*, **54**, № 2, 160 (1966). <sup>4</sup> S. Aaronson, B. B. Eddenbogen et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **27**, № 5, 535 (1967). <sup>5</sup> J. Eisenstadt, G. Brawerman, *Biochim. et biophys. acta*, **76**, № 2, 319 (1963). <sup>6</sup> Э. П. Берс, В. В. Пиневич, К. П. Резник, *Вестн. Ленингр. ун-ва, сер. биол.*, № 21, в. 4, 47 (1966). <sup>7</sup> G. R. Honold, G. L. Farkas, M. A. Stahman, *Cereal Chem.*, **43**, № 5, 517 (1966). <sup>8</sup> K. Rudolph, M. A. Stahman, *Plant Physiol.*, **41**, № 3, 389 (1966). <sup>9</sup> W. Tappner, O. Kandler, *Zs. Pflanzenphysiol.*, **58**, № 1, 24 (1967). <sup>10</sup> В. В. Пиневич, Л. Ф. Никифорова, *Вестн. Ленингр. ун-ва, сер. биол.*, № 15, в. 3, 97 (1964). <sup>11</sup> А. Н. Белозерский, А. С. Спириц, *Усп. совр. биол.*, **41**, в. 2, 144 (1956). <sup>12</sup> В. М. Sweeney, C. P. Tuffli, R. H. Rubin, *J. Gen. Physiol.*, **50**, № 3, 647 (1967). <sup>13</sup> О. Н. Кулаева, Н. Л. Клячко, *Физиол. раст.*, **14**, в. 5, 926 (1967). <sup>14</sup> H. W. J. Pagetli, M. Weintraub, U. M. Rink, *Canad. J. Bot.*, **40**, № 12, 1723 (1966). <sup>15</sup> Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, *Реакция живого вещества на внешние воздействия*, М., 1940. <sup>16</sup> В. Я. Александров, *Регуляторные процессы в клетках*. В кн.: *Руководство по цитологии*, М.—Л., 1966, стр. 590.