

И. С. КУЛАЕВ, В. И. МЕЛЬГУНОВ, Л. А. ЯКОВЛЕВА
О ВЛИЯНИИ 8-АЗААДЕНИНА НА ОБМЕН ФОСФОРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ У АУКСОТРОФНЫХ ПО АДЕНИНУ МУТАНТОВ
NEUROSPORA CRASSA

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 26 XII 1969)

При инкубации ауксотрофного по аденину мутанта *N. crassa ad-6 28610* в среде, содержащей 50 мг/л 8-азааденина, сильно подавляется прирост биомассы, ингибируется поглощение ортофосфата среды и нарушается фосфорилирование нуклеотидов адениловой системы (¹, ²). В связи с этим возник вопрос о том, является ли ингибирующее действие 8-азааденина специфичным для данного мутанта и не связано ли оно с наличием определенной мутации в каком-либо из локусов, контролирующих биосинтез пуриновых нуклеотидов. Поэтому в настоящей работе было проведено сравнительное исследование действия 8-азааденина на рост и развитие, а также на фосфорный и нуклеиновый обмен у 6 ауксотрофных по аденину мутантов и 1 штамма дикого типа *N. crassa*.

После предварительного изучения ростовых характеристик были отобраны следующие мутанты: *ad-6 28610*, *ad-5 71104*, *ad-8 E6*, *ad-9 Y 154M37*, *ad-3A 38709* и *ad-3B 35203* *. В качестве дикого типа был взят штамм *Abbott H4A*. Мутанты *ad-6* имеют нарушения в цепи реакций, предшествующих замыканию имидазольного кольца пуриновых нуклеотидов во время их синтеза *de novo*; *ad-5*-мутанты не способны образовывать 5-формамидо-4-имидазолкарбоксамидрибонуклеотид (³); *ad-8*-мутанты блокированы по превращению ИМФ в сукцинил-АМФ (⁴); *ad-3A*-мутанты недостаточны по синтетазе 5-амино-4-имидазол-N-сукцилкарбоксамидрибонуклеотида (⁵). Точная характеристика мутаций у мутантов *ad-3B* и *ad-9* неизвестна.

Культуры исследуемых штаммов выращивали в колбах на качалках при температуре 30°. Подготовку материала для засева проводили по методике, описанной Лаком (⁶). Для культивирования использовали синтетическую среду Видла и Тейтума (⁷), к которой при выращивании мутантов добавляли аденин в концентрации 50 мг/л. Для определения прироста биомассы и общего фосфора мицелий после 17 час. роста на среде с аденином (в случае мутантов *ad-3A* и *ad-3B* — после 20 час.) отфильтровывали от последней, промывали средой того же состава, но без аденина, и затем делили на две части. Одну часть (контроль) культивировали дальше на свежей среде с аденином, а другую (опыт) переносили на среду, в которой аденин был замещен на равное количество (50 мг/л) 8-азааденина. В пробах, которые брали через каждые 2 часа, определяли содержания общего фосфора и сухой вес мицелия.

Для выявления тех фосфорных соединений, биосинтез которых нарушается в присутствии антимаболита, в качестве исходного брали мицелий после 18 час. роста в нормальных для исследуемого штамма условиях, а контрольный и опытный варианты в этом случае анализировали после 6 час. последующей инкубации на новых средах.

Фракционирование фосфорных соединений проводили по схеме, включающей параллельное применение модифицированных методов Лангена и Лисса и Шмидта и Таннгаузера (⁸). Для этого после обработки материала 0,5 N HClO₄ при 0—4° не экстрагируемый кислотой остаток делили на две части. Одну из них далее использовали для получения солюбилимой (насыщенный раствор NaClO₄ при 0°), щелочерастворимой (0,05 N

* Данные мутанты были любезно предоставлены нам проф. Горовицем (Калифорнийский технологический институт, США) и доктором Огатой (Fungal Genetics Stock Center, США), за что мы приносим им глубокую благодарность.

NaOH при 0—4°) и экстрагируемой горячей хлорной кислотой (0,5 N HClO₄ при 90—100°) фракций неорганических полифосфатов, а вторую последовательно экстрагировали спиртом и эфиром при комнатной температуре (фракция фосфолипидов), 0,75 N KOH при 37° (фракция РНК) и 0,5 N HClO₄ при 90—100° (фракция ДНК). Сорбцию нуклеотидов холодного хлорнокислого экстракта на активированный уголь Карборафин проводили, как описано ранее (9). Содержание кислоторастворимых неорганических полифосфатов, ортофосфата и других фосфорных соединений в холодном хлорнокислом экстракте опреде-

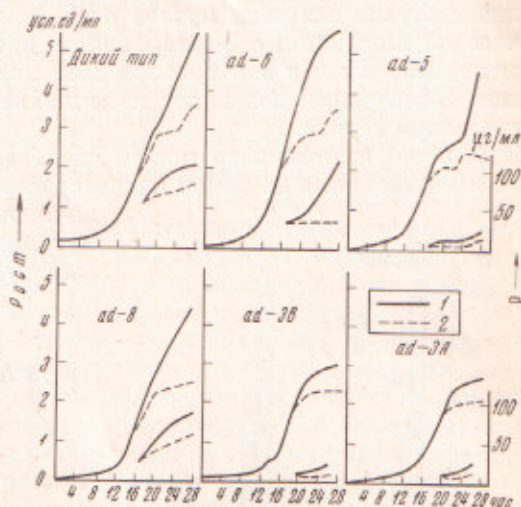


Рис. 1. Действие 8-азаденина на рост и накопление фосфора в мицелии различных штаммов *N. crassa*. 1 — прирост биомассы и накопление фосфора в нормальных условиях; 2 — то же в присутствии 8-азаденина. 1 усл. ед. равна 10 мг сухого веса мицелия

ляли по методу Ле Пажа в модификации Зайцевой (10). Определение различных форм фосфора проводили по методу Беренблюма и Чейна в модификации Вейль-Малербе и Грина (11). Полученные данные были пересчитаны в микрограммах Р на 100 мл среды (2).

Судя по характеру кривых, изображенных на рис. 1, действие 8-азаденина на исследованные нами ауксотрофные по аденину мутанты *N. crassa* в общем достаточно неспецифично. У всех изученных штаммов, включая и штамм дикого типа, антиметаболит тормозит прирост биомассы и накопление общего фосфора в мицелии. Этим исследуемый гриб отличается от различных представителей дрожжей (12), у которых 8-азаденин, подавляя рост и развитие нуждающихся в аденине мутантов, не действует на культуры дикого типа. Проявление ингибирующего действия антиметаболита у разных штаммов зависит, однако, от времени экспозиции. Так, у штаммов дикого типа и *ad-8* при переносе на среду с 8-азаденином наблюдается своего рода лаг-период, во время которого не удается выявить значительных различий между накоплением биомассы в контрольном и опытном вариантах. У остальных штаммов подобный лаг-период менее выражен или даже совсем отсутствует. Вызываемые 8-азаденином изменения накопления фосфора выражены более четко, чем изменения прироста биомассы.

В связи с этим было интересно выяснить, на какие же конкретно типы фосфорных соединений действует 8-азаденин.

Для дальнейшего исследования были отобраны такие штаммы, которые несколько отличались по характеру действия 8-азаденина на ход кривых накопления биомассы и общего фосфора. Данные по распределению фосфорных соединений по фракциям представлены на рис. 2.

Как видно из диаграммы, 8-азаденин практически не влияет на содержание внутриклеточного ортофосфата в мицелии *N. crassa*, хотя он и подавляет, как известно (2), поглощение фосфата у этого гриба. У всех изученных штаммов длительное 6-часовое воздействие антиметаболита приводит к подавлению накопления кислоторастворимых нуклеотидов, особенно сильно выраженному у *N. crassa* дикого типа. Наблюдаемое увеличение содержания нуклеотидов в контрольном варианте у исследованных мутантов может быть связано с усилением биосинтеза нуклеотидов у мутантов при переносе на новую среду с аденином. В пользу такого предположения

свидетельствуют полученные нами в предварительных опытах данные о том, что при 18-часовом выращивании в нормальных условиях аденин среды полностью поглощается мицелием мутанта *ad-6*.

Изменения содержания РНК у всех штаммов коррелируют в основном с изменениями содержания нуклеотидов. Единственным исключением в данном случае является мутант *ad-8*, у которого содержание РНК после 6-часовой инкубации с 8-азаденином превышает содержание РНК как в исходном, так и в контрольном мицелии. Вместе с тем, как отмечалось выше, 8-азаденин подавляет накопление кислоторастворимых нуклеотидов и в этом случае.

Из всего изложенного можно сделать вывод, что ингибирующее действие 8-азаденина на обмен кислоторастворимых нуклеотидов не связано, по-видимому, с какой-либо конкретной мутацией в цепи биосинтеза пуриновых нуклеотидов и проявляется лишь

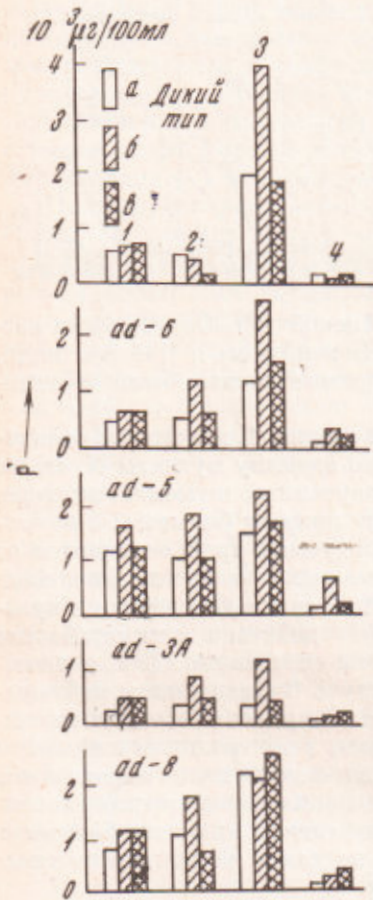


Рис. 2

Рис. 2. Содержание фосфора в различных фракциях, полученных из мицелия различных штаммов *N. crassa* после выращивания в нормальных условиях и в присутствии 8-азаденина. 1 — ортофосфат, 2 — кислоторастворимые нуклеотиды, 3 — РНК, 4 — ДНК, а — 18 час. роста в нормальных условиях (исходное), б — 18 + 6 час. роста в нормальных условиях (контроль); в — 18 час. роста в нормальных условиях + 6 час. роста на среде с 8-азаденином (опыт)

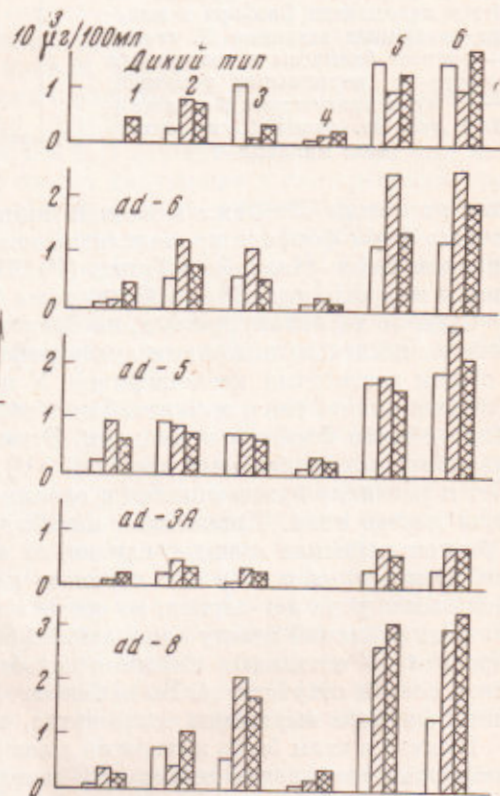


Рис. 3

Рис. 3. Содержание фосфора в различных фракциях неорганических полифосфатов, полученных из мицелия различных штаммов *N. crassa* после выращивания в нормальных условиях и в присутствии 8-азаденина. 1 — кислоторастворимые полифосфаты, 2 — солерастворимые полифосфаты, 3 — щелочерастворимые полифосфаты, 4 — полифосфаты горячего хлорнокислого экстракта, 5 — сумма кислотонерастворимых полифосфатов, 6 — сумма полифосфатов мицелия. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

на стадии последующего фосфорилирования уже синтезированных нуклеозидмонофосфатов (^{1, 2}), что, в свою очередь, приводит к подавлению синтеза РНК у *N. crassa*.

Степень и характер влияния 8-азааденина на накопление неорганических полифосфатов варьирует в зависимости от времени экспозиции и от того, насколько тот или иной мутант приближается по своим характеристикам к дикому типу. В предварительных опытах с 17- или 16-часовым мицелием дефицитного по аденину мутанта *ad-6* мы наблюдали некоторую стимуляцию биосинтеза неорганических полифосфатов при кратковременной инкубации (соответственно 1 или 2 часа) с 8-азааденином. При рассмотрении диаграммы, представленной на рис. 3, видно, что при более длительной, 6-часовой, инкубации 18-часового мицелия 8-азааденин не только не стимулирует, а, напротив, подавляет накопление неорганических полифосфатов у мутантов *ad-6*, *ad-5* и *ad-3A*. При данной экспозиции с антиметаболитом стимуляция накопления неорганических полифосфатов наблюдается только у *N. crassa* дикого типа и приближающегося к нему по характеристикам мутанта *ad-8*. По своему характеру действие 8-азааденина на отдельные фракции полифосфатов у этих двух штаммов несколько различается, хотя в целом следует отметить, что 6-часовая инкубация с антиметаболитом приводит не только к замедлению процессов утилизации уже образованных полифосфатов, но и к усилению биосинтеза высокополимерных полифосфатов, о чем можно судить по увеличению фракции полифосфатов, экстрагируемых горячей хлорной кислотой, т. е. именно той фракции, в которой происходит синтез полифосфатов (¹³). Аналогичная стимуляция биосинтеза неорганических полифосфатов при 6-часовой инкубации с 8-азааденином была продемонстрирована Урбанеком (¹⁴) при менее детальном исследовании суммарной фракции полифосфатов у 12-часового мицелия *N. crassa* дикого типа.

Особо следует отметить наблюдаемую во всех случаях прямую корреляцию между накоплением РНК и солерастворимых полифосфатов. Этот факт хорошо согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными о наличии тесной связи между накоплением солерастворимых полифосфатов и азотистым обменом у дрожжей (¹⁵) и о присутствии солерастворимых полифосфатов в клеточных ядрах *N. crassa*.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. С. Кулаев, X. Урбанек, ДАН, 169, № 4, 958 (1966). ² И. С. Кулаев, В. И. Мельгунов, Биохимия, 32, 5, 913 (1967). ³ H. Bernstein, J. Gen. Microbiol., 25, 1, 41 (1961). ⁴ N. H. Giles, C. W. H. Partridge, N. J. Nelson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 43, 4, 305 (1957). ⁵ C. R. Fisher, Biochim. et biophys. acta, 178, 2, 380 (1969). ⁶ D. J. L. Luck, J. Cell Biol., 16, 483 (1963). ⁷ G. W. Beadle, E. L. Tatum, Am. J. Bot., 32, 678 (1945). ⁸ И. С. Кулаев, В. М. Вагабов, Биохимия, 32, 2, 253 (1967). ⁹ М. С. Крицкий, И. С. Кулаев, Биохимия, 28, 4, 694 (1963). ¹⁰ Г. Н. Зайцева, А. Н. Белозерский, Л. П. Новожилова, Биохимия, 24, в. 6, 1054 (1959). ¹¹ H. Weil-Malherbe, H. Green, Biochem. J., 49, 1, 286 (1954). ¹² G. Harris, I. C. MacWilliam, Biochim. et biophys. acta, 95, 2, 205 (1965). ¹³ И. С. Кулаев, А. Н. Белозерский, Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 354; 4, 502 (1962). ¹⁴ H. Urbanek, Acta Soc. Bot. Polon., 36, 2, 347 (1967). ¹⁵ I. S. Kulaev, T. P. Afanasieva, Antonie van Leeuwenhoek J. Serol., 35, Suppl., B-29 (1969).