

В. Р. ШАТИЛОВ, Г. С. КАЛОШИНА,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

**ИНДУКЦИЯ НАДФ-СПЕЦИФИЧНОЙ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
У ХЛОРЕЛЛЫ**

Ранее из клеток хлореллы, выращенных на среде с KNO_3 , нами были получены высокоочищенные препараты глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и изучены ее свойства в присутствии обоих кофакторов — НАД и НАДФ⁽¹⁾. Поскольку не было обнаружено существенных различий ни при очистке, ни при изучении свойств, то предположили, что в клетках хлореллы, выращенной на среде с KNO_3 , обе активности принадлежат одному и тому же ферменту, подобному ГДГ из печени животных. Было высказано также предположение, что этот фермент является конститутивным.

При выращивании хлореллы на среде с аммонием происходило резкое увеличение НАДФ-ГДГ-активности при неизменной НАД-ГДГ-активности. Это было отчетливо показано в работах В. Л. Кретовича с сотрудниками

Таблица 1

Влияние аммония над
НАДФ-ГДГ-активностью

Концентр. (NH_4) ₂ SO ₄ , 10 ⁻³ М	Белок, мг/мл	Удельная активность		I / II
		НАД- ГДГ (I)	НАДФ- ГДГ (II)	
0 (контроль) *	5,6	342	150	2,3
0,246	6,2	310	165	1,8
0,492	5,9	325	234	1,4
1,23	4,6	325	473	0,6
2,46	5,9	395	507	0,6
2,46 **	5,0	395	180	2,2

* На среде с KNO_3 .
** Плюс актидион 5 мг/мл.

Таблица 2

Динамика увеличения
НАДФ-ГДГ-активности во времени

Инкубация на среде с (NH_4) ₂ SO ₄ (2,46·10 ⁻³ М)	Белок, мг/мл	Удельная активность		I / II
		НАД- ГДГ (I)	НАДФ- ГДГ (II)	
— (контроль) *	5,6	535	214	2,4
15 мин.	5,6	535	224	2,4
30 мин.	5,5	525	223	2,2
1 час.	6,9	460	244	1,9
3¼ часа	7,9	320	306	1,1
5 час.	7,6	340	570	0,6

* На среде с KNO_3 .

(², ³) как на несинхронной, так и синхронной культуре хлореллы. Увеличение НАДФ-ГДГ-активности в синхронной культуре хлореллы полностью блокировалось циклогексимином в концентрации 2,5—5 мкг/мл (3). Эти данные указывали на синтез фермента de novo. Задачей настоящей работы являлось доказательство того, что аммоний индуцирует синтез нового в клетке хлореллы фермента — специфичной к НАДФ ГДГ.

Объектом исследования являлись клетки термофильного штамма *Chlorella rupeoidosa* Pringsheim 82 Т. Выращивание культуры, получение бесклеточных экстрактов и определение активностей проводили как описано ранее (4). Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса (5) и Орнштейна (6), определение активностей после электрофореза — по методу Термана (6).

Вначале была прослежена зависимость НАДФ-ГДГ-активности от концентрации аммония в среде. Клетки, выращенные на среде с KNO_3 , собирали центрифугированием, промывали водой и переносили на среду эквивалентного объема, содержащую различные концентрации $(NH_4)_2SO_4$.

После 3 час. инкубации клеток на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в них определяли НАД- и НАДФ-ГДГ-активности. Из полученных результатов, представленных в табл. 1, видно, что НАДФ-ГДГ-активность увеличивается по мере возрастания концентрации аммония в среде, в то время как уровень НАД-ГДГ-активности остается практически неизменным. Соотношение НАД- и НАДФ-ГДГ-активностей изменяется от 2,3 в контрольном варианте до 0,6. Циклогексими́д в концентрации 5 $\mu\text{г}/\text{мл}$ полностью прекращал увеличение НАДФ-ГДГ-активности, и соотношение активностей в этом варианте оставалось равным контрольному.

Была прослежена динамика увеличения НАДФ-ГДГ-активности во времени. Для этого выращенные на среде с KNO_3 клетки переносили на среду с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации $2,46 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ и через определенные интервалы времени определяли активности. Полученные данные (табл. 2) показывают, что увеличение НАДФ-ГДГ-активности наступает спустя 1 час инкубации, после чего начинает усиленно нарастать. Следует отметить, что увеличение активности совпадает по времени с увеличением общего количества белка в клетках. Уменьшение НАД-ГДГ-активности происходило, вероятно, за счет разбавления конститутивного фермента синтезирующимися белками.

При перенесении клеток, инкубированных в течение 5 час. на среде с аммонием, обратно на среду с эквивалентным по азоту количеством KNO_3 , происходило постепенное уменьшение НАДФ-ГДГ-активности, как это видно из табл. 3.

Соотношение активностей возрастало с 0,8 до 1,8. В этих условиях уменьшение НАДФ-ГДГ-активности, очевидно, объясняется деградацией фермента, а не его ингибированием. KNO_3 , как это было показано ранее (7), не оказывает ингибирующего действия *in vitro* ни на НАД-, ни на НАДФ-ГДГ-активности. Полученные данные указывали на то, что аммоний индуцирует в клетках хлореллы синтез другой ГДГ, специфичной к НАДФ. Для более убедительного доказательства этого явления был проведен электрофорез на полиакриламидном геле с последующим определением обеих активностей тетразолиевым методом. Для анализа были взяты экстракты из клеток, выросших на среде с KNO_3 , и из этих же клеток, но предварительно выдержанных на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в течение 5 час.



Рис. 1. Зимограммы ГДГ из клеток хлореллы: I — выращенных на среде с KNO_3 ; II — выращенных на среде с KNO_3 и выдержанных 5 час. на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 1 — НАД-ГДГ-активность; 2 — НАДФ-ГДГ-активность; а — конститутивная НАД(Ф)-ГДГ; б — индуцированная НАДФ-ГДГ

Таблица 3
Влияние KNO_3 на индуцированную НАДФ-ГДГ

Инкубация на среде с KNO_3	Белок, мг/мл	Удельная активность		1/2
		НАД-ГДГ (1)	НАДФ-ГДГ (2)	
— (контроль)*	4,3	840	1050	0,8
30 мин.	4,1	875	1100	0,8
1 час	4,7	870	700	1,2
2 часа	2,4	870	570	1,5
3 часа	3,1	1050	570	1,8

* Клетки после 5 час инкубации на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Из схемы зимограмм, приведенных на рис. 1, видно, что в клетках хлореллы, выращенных как на среде с KNO_3 , так и на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержится конститутивная ГДГ (а), весьма активная с НАД и значительно менее активная с НАДФ. Вместе с тем очевидно, что при перенесении хлореллы со среды с KNO_3 на среду с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у нее появляется вторая, очень активная ГДГ, специфичная к НАДФ (б).

Таким образом, данные электрофоретического исследования подтверждают выдвинутое ранее предположение о том, что в клетках хлореллы существует конститутивная ГДГ, специфичная как к НАД, так и (значительно менее) к НАДФ. Наряду

с этим полученные данные свидетельствуют о том, что аммоний индуцирует синтез ГДГ, специфичной к НАДФ.

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

Поступило
17 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 409 (1969). ² В. И. Романов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. и микробиол., 1, 494 (1966). ³ Н. Г. Томова, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 249 (1969). ⁴ B. J. Davies, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 404 (1964). ⁵ L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 321 (1964). ⁶ D. A. Thurgan, C. Palin, M. V. Lausock, Nature, 207, 193 (1965). ⁷ В. Л. Кретович, Н. Г. Томова, З. Г. Евстигнеева, Биохимия, 35, 278 (1970).