

Т. В. БУЛЬДЯЕВА, С. Н. КУЗЬМИНА, И. Б. ЗБАРСКИЙ

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕРНЫХ ОБОЛОЧКАХ И ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 4 III 1971)

В настоящее время можно считать установленным, что изолированные ядра лимфоцитов тимуса способны эстерифицировать неорганический фосфат. Фосфорилирование в ядрах тимуса сопряжено с окислительными процессами, протекающими в ядре и, таким образом, является окислительным фосфорилированием (¹⁻³). С другой стороны, способность клеточных ядер других тканей, например печени, к окислительному фосфорилированию подвергалась сомнению, и большинство исследователей, работающих в этой области, до последнего времени считали, что она ограничена ядрами лимфоидных клеток (^{1,2}). Тем не менее, в литературе имеются сообщения, указывающие на то, что ядра клеток печени содержат ферменты тканевого дыхания (⁴⁻⁶) и что изолированные ядра клеток печени способны поглощать кислород (⁴⁻⁸). Окислительные системы ядра, по-видимому, сосредоточены в ядерных мембранах (^{5,6,8}).

Указания на то, что ядра печени крысы включают P^{32} в кислоторастворимую фракцию и что это включение подавляется ингибиторами тканевого дыхания (^{4,7}), говорят в пользу фосфорилирующего характера дыхания печеночных ядер.

Учитывая, что в прежних исследованиях (^{6,8}) была выявлена очень высокая окислительная активность изолированных ядерных оболочек, в настоящей работе была поставлена задача выяснить, в какой мере она коррелирует с их фосфорилирующей способностью.

Материалом исследования служила печень беспородных белых крыс обоего пола весом 170—200 г. Ядра выделяли в концентрированном растворе сахарозы (¹⁰). Контроль чистоты препаратов ядер вели с помощью биохимических тестов, световой и электронной микроскопии. Глюкозо-6-фосфатазная активность ядер была обычно в 5 раз ниже, чем в гомогенате ткани печени: отношение РНК к ДНК составляло около 0,2. Электронномикроскопические исследования ядерных препаратов свидетельствовали об отсутствии заметных цитоплазматических загрязнений.

Изолированные ядерные оболочки получали посредством инкубации изолированных ядер в гипотоническом фосфатном буфере с последующим ультрацентрифугированием в прерывистом градиенте сахарозы (¹¹). Ядерные оболочки, полученные таким образом, не содержат заметных загрязнений и сохраняют обе ядерные мембраны и аппарат пор (¹¹). Их чистоту контролировали электронномикроскопически. Изолированные ядра и ядерные оболочки инкубировали в солевой среде, содержащей глюкозу, при 30° в течение 30 мин. Инкубацию останавливали охлаждением. Ядра и ядерные оболочки изолировали из инкубационной среды центрифугированием. Кислоторастворимые нуклеотиды экстрагировали 4% $HClO_4$, и осадок промывали 2% $HClO_4$. Кислые центрифугаты соединяли, нейтрализовали КОН и после получасового стояния центрифугированием удаляли $KClO_4$. При постановке опыта с инкубацией ядер в атмосфере азота ядра и ядерные оболочки инкубировали на воздухе в течение 15 мин. За-

тем часть пробы отбирали и в ней останавливали инкубацию HClO_4 , а остаток помещали в атмосферу азота. Через 15 мин. от пробы быстро отбирали вторую порцию, остаток инкубировали на воздухе 15 мин. Дальнейшую экстракцию кислоторастворимых нуклеотидов проводили как обычно.

Определение АТФ проводили как энзиматическим методом, так и по включению P^{32} . В первом случае использовали систему глюкоза — гексокиназа — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа. Прирост НАДФ-Н определяли спектрофотометрически при 340 мμ (¹²).

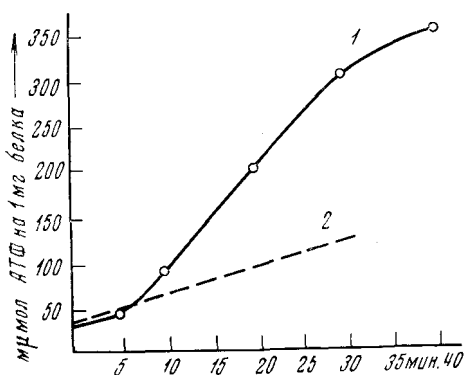


Рис. 1

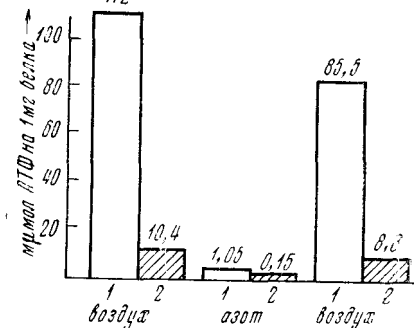


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика фосфорилирования в изолированных ядерных оболочках ядер печени крысы. Инкубационная среда содержала (в мол/л): KCl 0,15, MgCl_2 0,005, фосфатный буфер 0,01 M , pH 7,4, глюкоза 0,005, около 1,5 мг белка ядерных оболочек. На пробу добавляли НАД-Н5 $\mu\text{мол}$. Инкубация при 30°. АТФ определяли энзиматическим методом. Инкубация в присутствии НАД-Н (1) и без НАД-Н (2)

Рис. 2. Фосфорилирование в изолированных ядерных оболочках и ядрах печени крысы в атмосфере воздуха и азота. Каждая инкубация 15 мин. при 30°. Условия опыта см. табл. 1. 1 — ядерные оболочки, 2 — ядра

При определении включения P^{32} в АТФ ядрами и ядерными оболочками методом тонкослойной хроматографии кислые экстракты концентрировали до малых объемов (0,2—0,3 мл) под вакуумом при 35—40° и наносили на пластинку с тонким слоем ДЭАЕ-целлюлозы, разгоняли в 0,04 N HCl в течение 15—20 мин., подсушивали при 80° в течение 15 мин. и выявляли пятна на ультрахемископе (¹³). В качестве свидетелей использовали смесь АТФ, АДФ и АМФ. Пятно, соответствующее АТФ, соскабливали и в небольшом объеме воды наносили на мишени. При инкубации ядер или ядерных оболочек в среде, содержащей высокую концентрацию ионов кальция или магния, а также в атмосфере азота, пятно соответствующее АТФ, как правило отсутствовало. В этих случаях использовали участок целлюлозы на уровне свидетеля. Мишени считали на торцевом

Таблица 1

Включение P^{32} в АТФ ядрами и ядерными оболочками клеток печени крысы (мμ мол на 1 мг белка)

Структуры	Без добавок	+ цитохром с	+ цитохром с + НАД-Н	+ цитохром с + НАД-Н + сукцинат	+ цитохром с + НАД-Н + цианид	+ цитохром с + НАД-Н + 2,4-ДНФ
Ядра	5,4	21	42	22,5	2,1	0,5
Ядерные оболочки	45,3	141	333	279	138	1,5

Примечание. Инкубационная среда содержала (в мол/л): KCl 0,15, MgCl_2 0,005, фосфатный буфер pH 7,4 0,01, глюкоза 0,005; P^{32} 1,25 μCi , около 8 мг ядерного белка и около 0,7 мг белка ядерных оболочек. Инкубация 30 мин. при 30°. Объем пробы 5 мл. На пробу добавляли: цитохром с 12 $\mu\text{мол}$., НАД-Н 5 $\mu\text{мол}$., цианид 5 $\mu\text{мол}$., ДНФ 2,5 $\mu\text{мол}$.. Приведены средние 6—8 опытов.

счетчике БФЛ-25. Белок определяли по Лоури. Гистоны получали экстракцией дезоксирибонуклеопротеидной фракции изолированных ядер 0,5 N H_2SO_4 , глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу получали из дрожжей.

Опыты показали, что изолированные ядра и ядерные оболочки клеток печени крысы эстерифицируют неорганический фосфат. Ядерные оболочки в этом отношении в 8—10 раз активнее, чем интактные ядра, и приближаются к митохондриальной фракции (табл. 1).

Фосфорилирование ядер и ядерных оболочек стимулируется экзогенным цитохромом с и НАД-Н. Цианистый калий и 2,4-динитрофенол угне-

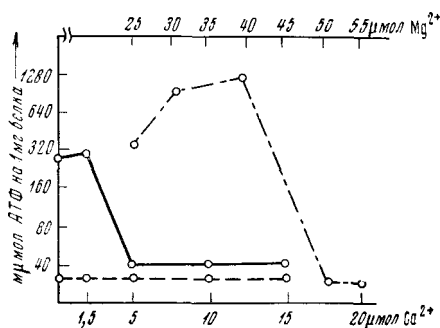


Рис. 3. Влияние ионов кальция и магния на фосфорилирование в изолированных ядрах и ядерных оболочках печени крысы. Условия опыта см. табл. 1. Фосфорилирование ядерных оболочек при действии Mg^{2+} (1), Ca^{2+} (2) и фосфорилирование в ядрах при действии Ca^{2+} (3)

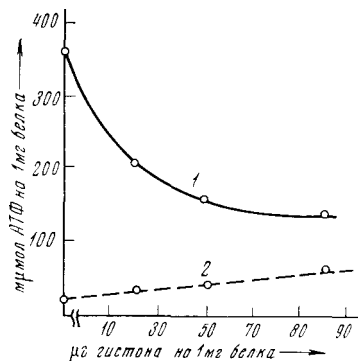


Рис. 4. Влияние гистонов на фосфорилирование в изолированных ядрах и ядерных оболочках печени крысы. Условия опыта см. табл. 1. 1 — ядерные оболочки, 2 — ядра

тают синтез макроэргического фосфата. Этот результат является важным аргументом в пользу того, что в ядрах и ядерных оболочках клеток печени крысы имеет место окислительное фосфорилирование.

В отличие от митохондрий, сукцинат в наших опытах не влиял на включение P^{32} в АТФ ядер и ядерных оболочек, что согласуется с данными об отсутствии в ядрах сукцинатдегидрогеназы (^{3, 5, 6, 8}).

Фосфорилирование в изолированных ядерных оболочках в присутствии экзогенного НАД-Н (который стимулирует фосфорилирование в 2—3 раза) интенсивно нарастает начиная с 10 мин. инкубации в течение 30 мин. (рис. 1). Пятнадцатиминутная инкубация в атмосфере азота снижает уровень АТФ в ядерных оболочках на 98%, в ядрах на 85%. Так же быстро осуществляется реосинтез АТФ. Пятнадцатиминутная реинкубация в аэробных условиях восстанавливает 80% утилизованной АТФ (рис. 2).

Согласно литературным данным, одной из особенностей фосфорилирования в изолированных ядрах тимуса является нечувствительность его к действию ионов кальция (^{3, 14}). Однако в наших опытах фосфорилирование ядерных оболочек, в отличие от интактных ядер, оказалось чувствительным к разбавляющему эффекту кальция, подобно тому как это имеет место в митохондриях (рис. 3). Так, 5 μmol на 1 мг мембранного белка угнетает фосфорилирование в среднем на 80%. Отсутствие эффекта кальция на фосфорилирование в интактных ядрах может зависеть от связывания кальция полианионами ядра.

Известно, что ядерное фосфорилирование нечувствительно к низким концентрациям ионов магния, тогда как высокие концентрации ионов магния, введенные в инкубационную среду, оказывают выраженное подавляющее действие (^{3, 14}). В наших опытах фосфорилирование интактных ядер оказалось нечувствительным к 40 μmol магния на 1 мг ядерно-

го белка. Совсем иным оказалось влияние концентрации магния на фосфорилирование ядерной оболочки (рис. 3). Ионы магния в количестве 30 $\mu\text{мол.}$ на 1 мг мембранного белка стимулируют синтез макроэргического фосфата ядерными оболочками в среднем в три раза. Дальнейшее увеличение концентрации магния до 40 $\mu\text{мол.}$ на 1 мг белка продолжает стимулировать эстерификацию неорганического фосфата.

Более высокие концентрации магния (50—60 $\mu\text{мол.}$ на 1 мг белка) резко тормозят фосфорилирование ядерных оболочек, подавляя эстерификацию на 96%. Заметное стимулирование магнием фосфорилирования ядерных оболочек, при отсутствии такого же эффекта на интактных ядрах, вероятно может зависеть от тех же причин, что и неодинаковое действие кальция в ядрах и ядерных оболочках.

Влияние гистонов на ядерное фосфорилирование изучено мало. Однако имеющиеся данные указывают на то, что энергетические процессы ядер тимуса, в отличие от митохондрий, нечувствительны к гистонам в количестве до 100 $\mu\text{г}$ на 1 мг сухого веса препарата (³). Это наблюдение дало основание высказать предположение, что нуклеиновые кислоты ядер защищают ядерный механизм фосфорилирования (⁴).

Мы нашли, что гистоны в концентрации 10 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка подавляют фосфорилирование ядерных оболочек печени крысы на 30%, а в более высоких концентрациях (50—100 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка) ингибируют его на 70—75% (рис. 4). Таким образом, фосфорилирование ядерных оболочек оказалось чувствительным к угнетающему действию гистонов, так же как и в митохондриях. В случае изолированных ядер печени гистоны даже несколько стимулировали фосфорилирование, что можно объяснить повышением проницаемости ядер для экзогенного НАД-Н в присутствии гистонов (¹⁵).

По характеру действия кальция, магния и гистонов фосфорилирование ядерных оболочек скорее аналогично митохондриальному, чем отличается от него. Отсутствие эффекта этих соединений с выраженным положительным зарядом в ядрах, вероятно, связано с высоким содержанием в ядре полианионов, прежде всего нуклеиновых кислот.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Th. Conover, In: Current Topics in Bioenergetics, 2, N. Y.—London, 1967, p. 235.
² I. Betel, H. M. Klowen, In: The Cell Nucleus Metabolism and Radiosensitivity, London, 1966, p. 281. ³ B. S. McEwen, V. G. Allfrey, A. Mirsky, J. Biol. Chem., 238, 758, 2571, 2579 (1963). ⁴ W. D. Currie, N. Davidian et al., Arch. Biochem. and Biophys., 113, 156 (1966). ⁵ И. Б. Збарский, А. А. Покровский и др., ДАН, 181, № 4, 993 (1968). ⁶ R. Berezney, L. K. Funk, F. L. Crane, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, № 1, 93 (1970). ⁷ R. Penniall, S. M. Liu, J. P. Saunders, Biochim. et biophys. acta, 76, 170 (1963). ⁸ С. Н. Кузьмина, Н. К. Монахов и др., ДАН, 191, № 1, 215 (1970). ⁹ A. E. DiGirolamo, E. C. Henshaw, H. N. Hiatt, J. Molec. Biol., 8, 479 (1964). ¹⁰ К. А. Перевощикова, Л. Н. Делекторская и др., Цитология, 10, № 5, 573 (1968). ¹¹ И. Б. Збарский, Усп. совр. биол., 67, № 3, 323 (1969). ¹² M. D. Ioshi, V. Jagannathan, In: Methods in Enzymology, 9, 1966, p. 371. ¹³ P. Grippo, M. Iaccarino et al., Biochim. et biophys. acta, 95, 1 (1965). ¹⁴ К. И. Данчева, Биохимия, 33, 583 (1968). ¹⁵ М. А. Таршис, Б. А. Король, В кн. Метаболизм клеточного ядра и ядерно-цитоплазматические отношения, Киев, 1970, стр. 12.