

И. В. ЗЕЛЕНЕВА, Э. Е. ХАВКИН

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЯГИВАЮЩИХСЯ КЛЕТКАХ КОРНЯ КУКУРУЗЫ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 26 V 1972)

В растягивающихся клетках корня с разной скоростью увеличивается активность почти всех ферментов гликолиза (¹). Это увеличение обусловлено, по всей видимости, синтезом ферментных белков (²), однако неясно, связаны ли наблюдаемые изменения в соотношении гликолитических ферментов с определенным балансом скоростей их синтеза и распада.

Если в активно растущих тканях животных обновление белков надежно доказано (³), то в растительных тканях распад белков может быть затруднен из-за высокой концентрации специфических ингибиторов протеолитических ферментов в наиболее молодых тканях и органах (⁴). Нам неизвестны экспериментальные доказательства распада белка в растущих клетках. Наиболее надежные методы для изучения распада ферментных белков основаны на определении удельной радиоактивности очищенных препаратов ферментов (⁵). Эти методы пока не используются при работе с растительными тканями, обычно исследователи ограничиваются измерениями активности ферментов после полного блокирования синтеза белка или РНК специфично действующими ингибиторами (^{3, 5}).

Мы использовали этот подход для того чтобы выяснить, связано ли увеличение активности гликолитических ферментов с их новообразованием и существует ли обновление этих ферментов и кодирующих их и РНК в фазе клеточного растяжения. В настоящем сообщении приведены данные, полученные при изучении поведения трех ферментов гликолиза: гексокиназы (2.7.1.1) (ГК), фосфоглицераткиназы (2.7.2.3) (ФГК) и фосфопируватгидратазы (4.2.1.11) (ФПГ). Активность ГК, одного из ключевых ферментов гликолиза, наиболее быстро увеличивается при растяжении клеток корня. Два других фермента интересны тем, что они входят в так называемую константную группу ферментов, соотношение активностей которых сравнительно постоянно для большого числа обследованных тканей растений и животных (^{1, 6}). В связи с этим предполагается, что синтез этих ферментов каким-то образом скоординирован (через трансляцию общей для всех ферментов иРНК (⁷) или с помощью других регуляторных механизмов (^{8, 9})).

На корни двухдневных проростков кукурузы гибрид Буковинский 3 ставили метки тушью на расстоянии 2 и 4 мм от кончика, и проростки переносили в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой или раствором ингибиторов. Для анализов использовали отрезки 2–4 мм (исходный контроль) и отрезки корня между метками, раздвинувшимися за 6 час. растяжения в темноте при 27–28°. Активность ГК, ФГК и ФПГ и содержание растворимого белка и белкового азота определяли описанными ранее методами (^{1, 2}). Поскольку число клеток между метками не изменяется в процессе растяжения, все расчеты на один отрезок эквивалентны расчету на «среднюю» клетку. В качестве ингибиторов синтеза белка мы использовали два антибиотика, различным образом нарушающих функционирование рибосом (¹⁰), — актидион (циклогексимид) и пуромицин фирмы «Серва», ФРГ. Отсутствие побочного действия этих антибиотиков на дыхание и проницаемость клеток корня в условиях наших опы-

тов было проверено специальными исследованиями (¹¹, ¹²). Кристаллический препарат активномицина D («Реанал», Венгрия) использовали в концентрациях, обеспечивающих полное подавление синтеза всех типов РНК в корнях проростков сои (¹³), только в этом случае можно быть уверенным в прекращении синтеза иРНК (¹⁴).

Представленные на рис. 1 результаты опытов позволяют сопоставить степень подавления роста клеток накопления белка и увеличения активности трех ферментов за период, охватывающий почти всю фазу растяже-

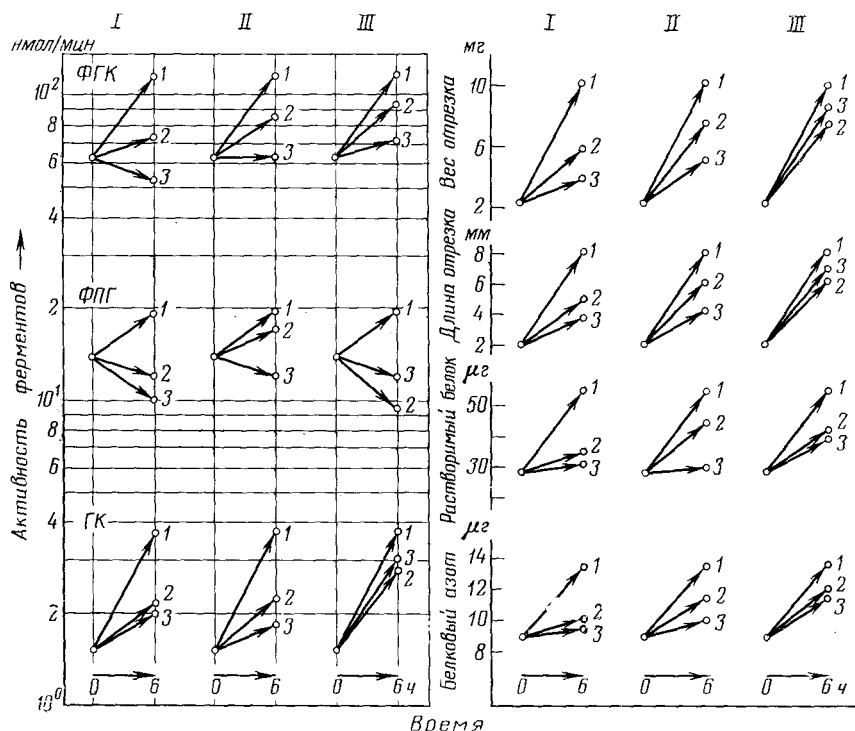


Рис. 1. Рост клеток, накопление белка и увеличение активности ферментов гликолиза в зоне между метками 2 и 4 мм за 6 час. растяжения в отсутствие ингибитора (I) или при низком (2) и высокой (3) концентрации антибиотиков. Все величины рассчитаны на 1 отрезок (38 тыс. клеток). I — актидион 0,4 и 0,8 $\mu\text{г/мл}$; II — пурамицин 100 и 200 $\mu\text{г/мл}$; III — актиномицин 5 и 10 $\mu\text{г/мл}$

ния, в зависимости от концентрации антибиотика и того, какое звено в синтезе белков при этом ингибируется.

Актидион в равной мере подавлял накопление белка и увеличение активности ГК и ФГК при концентрации антибиотика 0,4 $\mu\text{г/мл}$, однако с увеличением концентрации до 0,8 $\mu\text{г/мл}$ реакция двух ферментов становилась различной: уровень ФГК, как и общего белка, падал ниже уровня исходного контроля, в то время как активность ГК продолжала, хотя и медленнее, увеличиваться. Активность ФПГ падала чуть ниже исходной уже при 0,4 $\mu\text{г}$ актидиона в 1 мл, а при 0,8 $\mu\text{г/мл}$ составляла всего 70% от уровня исходного контроля. В сравнительно низкой концентрации (100 $\mu\text{г/мл}$) пурамицин одинаково влиял на накопление белка и увеличение активности ферментов, при 200 $\mu\text{г}$ антибиотика в 1 мл ГК становилась наиболее, а ФПГ — наименее устойчивым членом ряда, причем только уровень последней падал ниже исходного. Таким образом, при полном прекращении синтеза и накопления белка замедлялось увеличение активности ГК, а накопление ФГК и ФПГ полностью прекращалось, и уровень этих ферментов даже снижался по сравнению с активностью в начале фазы клеточного растяжения. Можно полагать, что увеличение активности

трех ферментов в фазе растяжения целиком или по большей части определяется новообразованием соответствующих белков, которые обладают способностью к сравнительно быстрому обновлению.

Актиномицин D почти не затрагивал рост клеток, но приостанавливал накопление белка. Увеличение активности ГК замедлялось незначительно, независимо от концентрации ингибитора, в случае ФГК степень торможения зависела от дозы антибиотика, а уровень ФПГ снижался ниже исходного уже при 5 мкг актиномицина D в 1 мл среды. Если рассматривать полученные результаты как указание на неодинаковую стабильность иРНК, кодирующих различные белки клетки, то есть основания предполагать, что скорость обновления иРНК увеличивается в ряду: так называемые «белки, ответственные за растяжение», < ГК < ФГК < общий белок < ФПГ.

Однозначная интерпретация результатов опытов с антибиотиками затруднена по нескольким причинам. Во-первых, мы не изучали с помощью изотопных методов кинетику подавления синтеза иРНК и белка в описанной выше системе. Правда, в нашем случае изменения активности ферментов хорошо коррелируют с накоплением общего и растворимого белка, а быстрое специфичное действие антибиотиков подтверждается литературными данными (¹³, ¹⁵, ¹⁶). Во-вторых, при работе с такой сложной системой, как растущие клетки, трудно учесть косвенное влияние антибиотиков на синтез и стабильность ферментных белков, например, через нарушение синтеза специфичных протеаз, регулирующих распад этих ферментов (⁵, ¹⁷) и т. п. Если распад белка идет с одинаковой скоростью при нормальном росте клеток и в отсутствие синтеза белка, после введения антибиотиков, то ингибиторный метод действительно позволяет расчленить синтез и распад ферментных белков в растущих клетках. Если же распад происходит только при подавлении синтеза белка или резко при этом усиливается, его следует рассматривать, по-видимому, как побочное действие антибиотиков. В зрелых клетках корня снижение активности ферментов наблюдается и в отсутствие антибиотиков, спустя 6–10 час. после завершения растяжения, еще более заметно снижается активность гликолитических ферментов в стареющих coleoptилах кукурузы: так, например, уровень ГК падает в 5 раз по сравнению с фазой растяжения (¹). Поэтому распад ферментных белков как следствие только побочного действия антибиотиков представляется нам маловероятным. В-третьих, косвенные эффекты ингибиторов могут быть связаны с инактивацией или ингибированием ферментов, с активацией латентных форм ферментов или синтезом ингибиторов белковой природы (³, ⁵). Мы сравнили изменения активности ферментов в зависимости от концентрации белка в бесклеточных экстрактах ткани из контрольного варианта и варианта с актидионом до и после очистки от низкомолекулярных соединений на сефадексе Г-25. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в корне нет активаторов или ингибиторов гликолитических ферментов в измеримых количествах. К такому же выводу пришли Фаулер и Рис (¹⁸), изучавшие влияние бесклеточных экстрактов из отрезков корня гороха на активность чистых препаратов гликолитических ферментов.

Таким образом, можно считать доказанным, что увеличение активности трех ферментов гликолиза вызвано новообразованием ферментных белков, а не активацией латентных предшественников. Скорость синтеза ферментов превышает скорость распада в растягивающихся клетках, но, по-видимому, отстает от последней с началом старения. Изменения уровня фермента на последовательных этапах роста клетки определяются подвижным соотношением скоростей синтеза и распада каждого белка, причем три изученные нами фермента гликолиза заметно различаются по скорости распада. Активность ГК и ФГК по-разному увеличивается за фазу растяжения. Если накопление ГК и ФГК не пропорционально скорости их распада, следует ожидать заметных различий в скорости синтеза этих двух ферментов и в стабильности соответствующих иРНК. Результаты наших опы-

тов не позволяют пока сделать определенный вывод о том, координирован ли синтез ФГК и ФПГ. В опытах с актиномицином D эти ферменты достаточно четко различаются по стабильности их иРНК, и это трудно согласовать с гипотезой об общем опероне для константной группы ферментов (⁷). Можно ожидать, что увеличение продолжительности контакта ткани с ингибиторами и изучение динамики ферментов в зрелых клетках позволит получить дополнительные сведения о сущности координированного накопления ферментов.

Авторы благодарят чл.-корр. АН СССР Ф. Э. Реймерса за внимание к работе и Н. Л. Клячко за полезную дискуссию, а также А. И. Антипину, Л. И. Лысенкову, А. Н. Лямкину, Е. В. Савостьянову и Л. В. Троценко за проведение вспомогательных анализов.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
25 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Зеленева, Э. Е. Хавкин, *Онтогенез*, **2**, 311 (1971).
- ² E. E. Khavkin et al., *Proc. II Intern. Sympos. Ecology and Physiology of Root Growth*, Potsdam, 1972.
- ³ R. T. Schimke, D. Doyle, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 929 (1970).
- ⁴ C. A. Ryan et al., *Plant Physiol.*, **43**, 589 (1968).
- ⁵ P. Filner et al., *Science*, **165**, 358 (1969).
- ⁶ D. Pette, *Naturwiss.*, **22**, 597 (1965).
- ⁷ P. D. Mier, D. W. K. Cotton, *Nature*, **209**, 1022 (1966).
- ⁸ В. С. Ренин, В кн.: *Механизмы интеграции клеточного обмена*, Л., 1967, стр. 205.
- ⁹ Ю. Г. Юровицкий, Л. С. Мильман, *Биохимия*, **36**, 1130 (1971).
- ¹⁰ S. Pestka, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 697 (1971).
- ¹¹ Э. Е. Хавкин и др., *Физиол. раст.*, **18**, 42 (1971).
- ¹² Э. Е. Хавкин, Ю. Я. Мазель, *Физиол. раст.*, **17**, 452 (1970).
- ¹³ C. J. Lin, J. L. Key, *Plant and Cell Physiol.*, **9**, 953 (1968).
- ¹⁴ I. H. Goldberg, P. A. Friedman, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 775 (1971).
- ¹⁵ T. Rees, J. A. Bryant, *Phytochemistry*, **10**, 1183 (1971).
- ¹⁶ J. S. Fletcher, H. Beevers, *Plant Physiol.*, **43**, 365 (1971).
- ¹⁷ M. Zucker, *Plant Physiol.*, **43**, 365 (1968).
- ¹⁸ M. W. Fowler, T. Rees, *Biochim. et biophys. acta*, **201**, 33 (1970).